

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Estudos Cariotípicos na Família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo.

Júlia Yamagishi Costa

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Júlia Y. Costa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de
Mestre em Ciências
Biológicas na área de
Biologia Vegetal.

Eliana Regina Forni Martins

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Regina Forni-Martins

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 8e
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C823e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 50857
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD _____

CM00173036-1

BIB ID 260377

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C823e

Costa, Júlia Yamagishi

Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no
estado de São Paulo/Júlia Yamagishi Costa. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Eliana Regina Forni-Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

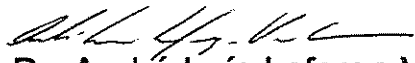
1. Cromossomos. 2. Citotaxonomia. 3. Hibridação in situ. I.
Forni-Martins, Eliana Regina. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 07/06/2002

Banca examinadora:



Profa. Dra. Eliana Regina Forni-Martins (orientadora)



Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela



Profa. Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

02243430

À meus pais e minha irmã Martha.

*“O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de andar pelas estradas
Olhando para a direita e para a esquerda,
E de, vez em quando olhando para trás...
E o que vejo a cada momento
É aquilo que nunca antes eu tinha visto,
E eu sei dar por isso muito bem...
Sei ter o pasmo essencial
Que tem uma criança se, ao nascer,
Reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo...

Creio no mundo como num malmequer,
Porque o vejo. Mas não penso nele
Porque pensar é não compreender ...

O Mundo não se fez para pensarmos nele
(Pensar é estar doente dos olhos)
Mas para olharmos para ele e estarmos de acordo...

Eu não tenho filosofia: tenho sentidos...
Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é,
Mas porque a amo, e amo-a por isso,
Porque quem ama nunca sabe o que ama
Nem sabe por que ama, nem o que é amar ...
Amar é a eterna inocência,
E a única inocência não pensar...”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Eliana, por toda sua compreensão, paciência e confiança. Por todos os ensinamentos, conselhos e oportunidades.

Agradeço à FAPESP, pela bolsa de mestrado e apoio à pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o meu primeiro mês de curso.

À UNICAMP, Departamento de Botânica e Laboratório de Biossistemática por terem fornecido todas as condições de trabalho necessárias.

À Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Genética de Plantas e ao Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela pelo acolhimento e oportunidade de aprendizado concedidos.

Aos Professores do Departamento de Botânica da UNICAMP pelos conselhos e sugestões.

À Coordenadoria e Secretaria de Pós-Graduação por todas as informações e ajuda relativas aos trâmites burocráticos necessários.

À Prof^a Dr^a Maria do Carmo Estanislau do Amaral e Doutorando Emerson Ricardo Pansarin pelo auxílio na identificação das espécies e apoio ao trabalho.

À Prof^a Dr^a Vera Nisaka Solferini pelas valiosas colaborações e participação na pré-banca.

Ao Prof Dr André Luís Laforga Vanzela pelas sugestões ao trabalho.

À Prof^a Dr^a Julie Henriette Antoinette Dutilh pelo incentivo ao trabalho e sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Botânica – UNICAMP, especialmente à Iara pela ajuda nas técnicas, colaborações e amizade concedida durante todo este período e Renato Belinello pelo auxílio nas coletas.

Aos amigos Ricardo, Carlos Victor, Mariana, Andréa Corrêa, Christiano e Vanessa pela agradável convivência no laboratório, amizade, conselhos, broncas, sugestões, companhia em coletas, etc.

Ao Fábio Vitta, pelos valiosos conselhos com relação à tese.

À Luciana, minha amiga-irmã, que me incentivou nessa paixão pela biologia.

À Lilica, pela amizade e momentos de descontração compartilhados.

À todos os colegas pós-graduandos do Departamento.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	1
2. Capítulo 1: Karyotypic studies of some brazilian species of Alismataceae Vent.	10
2.1. Introduction	11
2.2. Material and Methods	14
2.3. Results	15
2.4. Discussion	22
2.5. Literature cited.....	27
3. Capítulo 2: Estudos cariotípicos em citótipos de <i>Echinodorus tennellus</i> (Martius) Buchenau (Alismataceae).....	30
3.1. Introdução	31
3.2. Material e Métodos	32
3.3. Resultados	34
3.4. Discussão	39
3.5. Bibliografia	43
4. Capítulo 3: Bandamento cromossômico e hibridação <i>in situ</i> em espécies de Alismataceae neotropicais.....	45
4.1. Introdução	46
4.2. Material e Métodos	49
4.3. Resultados	53
4.4. Discussão	65
4.5. Bibliografia	68
5. Conclusão Geral	70
6. Bibliografia Geral	71

TABELAS

1. Capítulo 1: Karyotypic studies of some Brazilian species
of Alismataceae Vent.

TABLE 117

2. Capítulo 3: Bandamento cromossômico e hibridação *in situ*
em espécies de Alismataceae neotropicais.

TABELA 150

TABELA 254

FIGURAS

1. Introdução Geral	
FIGURA 1	2
2. Capítulo 1: Karyotypic studies of some Brazilian species of Alismataceae Vent.	
FIGURA 1	18
FIGURA 2	19
FIGURA 3	20
FIGURA 4	21
3. Capítulo 2: Estudos cariotípicos em citótipos de <i>Echinodorus tennellus</i> (Martius) Buchenau (Alismataceae).	
FIGURA 1	36
FIGURA 2	37
FIGURA 3	38
FIGURA 4	38
4. Capítulo 3: Bandamento cromossômico e hibridação <i>in situ</i> em espécies de Alismataceae neotropicais.	
FIGURA 1	59
FIGURA 2	60
FIGURA 3	61
FIGURA 4	62
FIGURA 5	63
FIGURA 6	64

RESUMO

A família Alismataceae, ordem Alismatales, é composta por plantas aquáticas ou semi-aquáticas de folhas eretas ou flutuantes, que crescem em brejos ou solos encharcados. Dois dos 11 gêneros que compõem a família estão presentes nos neotrópicos. O gênero *Echinodorus* (26 espécies) possui cerca de 17 espécies no Brasil, sendo que nove ocorrem no estado de São Paulo. O gênero *Sagittaria* (25 espécies) possui cerca de seis espécies presentes no Brasil, com apenas três no estado de São Paulo. As plantas aquáticas apresentam uma série de problemas para a sistemática, pois muitas características morfológicas apresentam uma extensa plasticidade fenotípica, sendo muitas destas convergentes ou baseadas em aspectos não genéticos/hereditários. Com o objetivo de traçar tendências evolutivas/cariotípicas para o grupo e incorporar dados moleculares/citogenéticos para a família Alismataceae, foram investigadas nove espécies da família (incluindo uma ou mais populações de cada), através das técnicas convencional com Giemsa, bandamento C, bandamento CMA/DAPI e hibridação fluorescente *in situ* para a sequência 45S do DNAr. As espécies apresentaram cariótipos com $2n=22$ cromossomos, os quais variaram em comprimento (2,3 a $9,1\mu\text{m}$) mostrando-se altamente assimétricos (TF% entre 12,9 e 20,5). Os números cromossômicos reforçam $x=11$ como o provável número básico para o grupo. Foram documentadas duas populações triploides ($2n=33$) para a espécie *Echinodorus tennellus*, ambas apresentando anormalidades meióticas e alta inviabilidade de pólen, indicando a existência de citótipos para a espécie. Os procedimentos de bandamento cromossômico foram bastante eficientes para a caracterização de cada uma das espécies, indicando possível proximidade entre elas. Do mesmo modo, a hibridação *in situ* foi eficaz para demonstrar diferenças inter-populacionais nos sítios de hibridação em *Sagittaria rhombifolia*.

ABSTRACT

Alismataceae, order Alismatales, is composed of aquatic and semi-aquatic herbs, with emerged, submerged or floating leaves, growing in muddy and water-logged substrates. The family has 11 genera, two of which occur on the neotropical region. In Brazil, there are 17 species of *Echinodorus* (26 species) with nine in São Paulo state. In *Sagittaria* (25 species), there are six species in Brazil with only three in São Paulo state. Aquatic plants usually represent great problems for traditional systematics because a lot of morphological features exhibit extensive phenotypic plasticity and many characters are convergent or non-genetically based. In order to detect trends in the karyotypic evolution of this group as a whole, and incorporate molecular/cytogenetic data for the study of Alismataceae family, nine species (including one or more populations) of Alismataceae were investigated cytologically, with Giemsa staining, C-banding, CMA/DAPI banding and *in situ* hybridization with 45S rDNA sequence. All species presented $2n=22$ chromosomes, showing a basic number $x=11$ for both genera, with chromosome size varying from 2.3 to $9.1\mu\text{m}$ and a high asymmetry index (TF% between 12.9 to 20.5). Two triploid ($2n=33$) populations of *Echinodorus tennellus* were observed, both presenting meiotic abnormalities and significative pollen inviability. Banding procedures were efficient for species identification and detection of species similarity, together with *in situ* hybridization. In only one species, *Sagittaria rhombifolia*, inter-population differences in the number and position of hybridization sites were found.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Alismataceae Vent. - classe Liliopsida, subclasse Alismatidae, ordem Alismatales (CRONQUIST 1988) - é composta por plantas aquáticas ou semi-aquáticas, de folhas eretas ou flutuantes, que crescem em brejos ou solos encharcados. Membros da família podem ser reconhecidos pela presença de látex, placentação basal e frutos, em sua maioria, em forma de aquênios (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994). Dos 11 gêneros que compõem esta família, os dois maiores, *Echinodorus* e *Sagittaria*, estão presentes nos neotrópicos, com representantes no Brasil e no Estado de São Paulo. Os outros nove gêneros menores (com menos de 10 espécies cada) não possuem representantes nos neotrópicos (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994).

De acordo com HAYNES & HOLM-NIELSEN (1994), o gênero *Echinodorus* Rich. ex Engelm. possui cerca de 26 espécies, com aproximadamente 17 delas presentes no Brasil, com nove no Estado de São Paulo; o gênero *Sagittaria* L. possui cerca de 25 espécies, com aproximadamente seis presentes no Brasil, sendo uma no Estado de São Paulo. Entretanto, o levantamento realizado pelo projeto "Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo" (Fapesp), encontrou no Estado seis espécies do gênero *Echinodorus* (*E. tennellus* (Mart.) Buchenau, *E. grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli, *E. longipetalus* Micheli, *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli, *E. aschersonianus* Graebn. e *E. paniculatus* Micheli) e três espécies do gênero *Sagittaria* (*S. guayanensis* Kunth, *S. montevidensis* Cham. & Schltdl. e *S. rhombifolia* Cham.). Espécies de ambos os gêneros são apresentadas na FIGURA 1.



FIGURA 1: Espécies da família Alismataceae, no Estado de São Paulo, A) *Echinodorus grandiflorus* – folhas em meio à vegetação em Casa Branca, B) *Echinodorus pubescens* – em Pereira Barreto, C) *Echinodorus tennellus* – planta com flor em Itirapina e D) *Sagittaria rhombifolia* – plantas com flores femininas em Pereira Barreto.

As famílias Alismataceae e Limnocharitaceae se diferenciam das outras três famílias de Alismatales (Aponogetonaceae, Butomaceae e Hydrocharitaceae) em uma série de atributos, como lacuna esquizógena (tipo laticíferos) com látex, grãos de pólen biporados a poliporados, embrião fortemente curvado, entre outras (DAHLGREN *et al.* 1985). A delimitação das Limnocharitaceae, porém, é bastante discutida, tendo sido considerada por muito tempo como parte da família Butomaceae (RAO 1953). CHATIN (1856) observou, entretanto, que membros das Limnocharitaceae tinham características em comum com as Alismataceae e diferiam de *Butomus*. Em 1981, DAHLGREN e CLIFFORD incluíram a família Limnocharitaceae dentro da família Alismataceae e estabeleceram a ordem Alismatales como um grupo composto apenas pela família Alismataceae. Mais tarde, DAHLGREN *et al.* (1985) tornaram a reconhecer as Limnocharitaceae como uma família, incluindo na ordem Alismatales não só as Alismataceae e Limnocharitaceae como também outras três famílias: Aponogetonaceae, Butomaceae e Hydrocharitaceae. De acordo com o autor, a família Limnocharitaceae, por seus carpelos multiovulados com placentação laminar-dispersa e frutos foliculares, lembra superficialmente as Butomaceae, mais do que as Alismataceae, mas não se sabe até que ponto tais caracteres seriam derivados de um ancestral em comum ou teriam surgido por convergência. CRONQUIST (1988) separou a família Hydrocharitaceae, criando a ordem Hydrocharitales, e transferiu a família Aponogetonaceae para a ordem Najadales, composta pelas famílias Aponogetonaceae, Scheuzeriaceae, Juncaginaceae, Potamogetonaceae, Ruppiaceae, Najadaceae, Zannichelliaceae, Posidonaceae, Cymodoceaceae e Zosteraceae, restando na ordem Alismatales as famílias Alismataceae, Butomaceae e Limnocharitaceae.

Recentemente, a análise de seqüências do gene *rbcL* indicou duas maiores linhagens dentro das Alismatidae (LES *et al.* 1997), sendo uma delas composta por dois subclados contendo 1) Alismataceae e Limnocharitaceae e 2) Butomaceae, Hydrocharitaceae e Najadaceae. A outra linhagem é composta por 10 famílias onde 1) Scheuzeriaceae e Aponogetonaceae são basais; 2) um subclado é composto pelas famílias Lilaeaceae e Juncaginaceae; 3) outro subclado é composto por Cymodoceaceae, Posidoniaceae e Ruppiaceae e 4) um último subclado contém as famílias Zosteraceae, Zannichelliaceae e Potamogetonaceae. É interessante notar que o clado contendo

Limnocharitaceae e Alismataceae é altamente suportado, sendo demonstrado pelo alto valor da análise de bootstrap (100). Em uma análise combinada, porém baseando-se principalmente em análises do gene *rbcL*, JUDD *et al.* (1999) reconheceu dois maiores clados dentro de Alismatales, um contendo Alismataceae (incluindo Limnocharitaceae), Hydrocharitaceae e Butomaceae, e outro contendo Potamogetonaceae, Ruppiaceae, Zosteraceae, Posidoniaceae, Zannichelliaceae, Cymodocaceae e Najadaceae. A família Araceae foi estabelecida como grupo irmão das outras famílias da ordem Alismatales. Assim como estabelecido por DAHLGREN & CLIFFORD (1981), e podendo ser observado em LES *et al.* (1997), a família Limnocharitaceae foi novamente incluída dentro da família Alismataceae por JUDD *et al.* (1999).

De acordo com JUDD *et al.* (1999) as famílias Limnocharitaceae e Alismataceae apresentam uma série de características em comum, como serem aquáticas ou semi-aquáticas, herbáceas, rizomatosas, possuindo laticíferos e folhas emergentes, submergentes ou flutuantes; o gineceu é apocárpico, com três a muitos carpelos, ovários súperos, óvulos em número variado (comumente um por carpelo), com embrião fortemente curvado; o androceu é constituído por 6 a numerosos estames, com grãos de pólen bi a poliporados. As principais diferenças entre as duas famílias seriam o número de verticilos dos carpelos (dois ou mais em Alismataceae e usualmente um em Limnocharitaceae), tipo de placentação (basal em Alismataceae e parietal em Limnocharitaceae) e tipo de fruto (usualmente aquênios indeiscentes em Alismataceae e folículos deiscentes em Limnocharitaceae) (TOMLINSON 1982).

Várias espécies da família Alismataceae têm sido estudadas em diversos aspectos. Uma série de espécies possui valor medicinal (KWEON *et al.* 1996; SHIMIZU *et al.* 1994; RIVERA *et al.* 1994; MATSUDA *et al.* 1988). Estas plantas também podem ser importantes indicadores ambientais de qualidade da água (MAESSEN *et al.* 1992; SIDORSKII *et al.* 1991) e também trazem prejuízos ao invadirem culturas como o arroz (RAMSON & OELKE 1988; SHAD & KHAN 1988). Em Louisiana (EUA), espécies de *Sagittaria* foram utilizadas na construção de um filtro artificial de esgotos, sendo essenciais na diminuição da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e na redução do total de sólidos suspensos (TSS) (ZACHRITZ II & FULLER 1993).

As plantas aquáticas apresentam uma série de problemas para a sistemática. A perda de estruturas consideradas adaptativas à vida terrestre, como tecidos lignificados, e redução de cutícula são freqüentes, e uma série de caracteres considerados adaptativos à vida aquática, como folhas flutuantes, tecido aerenquimático etc., surgiram repetidamente entre grupos não relacionados de angiospermas aquáticas (Sculthorpe 1967 *apud* LES & HAYNES 1995; Haynes 1991 *apud* LES & HAYNES 1995). Muitas características morfológicas de plantas aquáticas exibem uma extensa plasticidade fenotípica, que é influenciada mais ambientalmente que geneticamente. Em um estudo realizado por WOOTEN (1986), plantas obtidas a partir de sementes de *Sagittaria falcata*, *S. lancifolia*, *S. platyphylla*, *S. rigida*, *S. isoetiformis* e *S. papillosa* foram cultivadas em solo encharcado ou solo submerso a 4.5, 12, 19.5 ou 27 cm. Observou-se que, em geral, a espessura e o comprimento das folhas são diminuídos pela submersão, enquanto que o comprimento dos pecíolos é aumentado. A interação espécie X profundidade da água foi significativa para a espessura de folhas emersas, comprimento das folhas e comprimento dos pecíolos, exceto para comprimento da folha de *S. lancifolia* e espessura e comprimento das folhas de *S. papillosa*. Os resultados indicaram que existe uma grande variabilidade intraespecífica, influenciada por características ambientais, assim como uma diferença genética entre espécies, que determinam como os fatores ambientais irão influenciar cada uma das espécies. Em um estudo anatômico, em duas variedades de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, SCREMIN-DIAS & BARROS (2001) observaram, principalmente pelo número de lacunas do aerênquima e presença de fibras nas folhas, que o ambiente pode causar variações consideráveis, chegando a causar problemas na identificação das variedades da espécie.

Estes elementos complicam o entendimento de homologias entre hidrófitas porque o estado dos caracteres possui uma grande probabilidade de serem convergentes ou baseados em aspectos não genéticos/hereditários (LES & HAYNES 1995).

A incorporação de dados moleculares e citogenéticos é vantajosa, pois tais características não representam adaptações ao ambiente aquático, como certos caracteres morfológicos. Uma série de estudos cromossômicos têm sido feitos em várias famílias de Alismatales (BOLKHOVSKIKH *et al.* 1969; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1994; GOLDBLATT 1984,

1988; MOORE 1973; DARLINGTON & WYLIE 1945). Através de uma análise cromossômica, RAO (1953) reforçou a idéia de distinção entre as famílias Limnocharitaceae e Butomaceae, verificando que o gênero *Butomus* (Butomaceae) apresentava características cromossômicas bastante distintas das observadas em Limnocharitaceae. Estudos realizados em Limnocharitaceae demonstram que neste grupo ocorre uma variação gradual no tamanho dos cromossomos (KENTON 1981; FORNI-MARTINS & CALLIGARIS, no prelo), enquanto que nas Butomaceae, ou em ordens próximas como as Najadales, os cariótipos são bimodais: com dois grupos de cromossomos com comprimentos perceptivelmente diferentes (GREILHUBER 1995).

Dentro das Alismataceae, o gênero *Echinodorus* possui apenas quatro espécies neotropicais documentadas quanto ao número cromossômico: *E. grandiflorus* com $n=11$ (LEPPER 1982), *E. subatalus* com $n=$ ca. 14 (COLEMAN & SMITH 1969), *E. grisebachii* com $2n=22$ (UCHIYAMA *et al.* 1989) e *E. bolivianus* com $2n=22$ (UCHIYAMA *et al.* 1989).

O gênero *Sagittaria* possui três das espécies presentes nos neotrópicos documentadas quanto ao número cromossômico: *S. guayanensis* com $n=11$ e $2n=22$ (LARSEN 1963; MEHRA & PANDITA 1979,1984; PANDITA 1979; SARKAR 1985), *S. montevidensis* com dois números diferentes descritos, $2n=20$ (TAYLOR 1925) e $2n=22$ (HARADA 1956), e *S. lancifolia* com $2n=22$ (BEAL 1960; BROWN 1946). De acordo com o cariótipo elaborado por MEHRA & PANDITA (1984), *S. guayanensis* possui os cromossomos variando gradualmente de 8,6 a 2,2 μm ; o maior par é metacêntrico, oito pares são subtelocêntricos, um par é telocêntrico e o menor é submetacêntrico, com o comprimento total da cromatina (CTC) igual a 101,02 μm .

Uma proposta de evolução cariotípica foi feita para a família Alismataceae por MEHRA & PANDITA (1984). Os autores analisaram o cariótipo de três espécies do gênero *Alisma* e duas espécies do gênero *Sagittaria* e propuseram um número básico de $x=6$ para a família. O número $n=6$, apresentado por um ancestral que teria todos os cromossomos metacêntricos, teria originado o número $n=7$ (*Alisma plantago-aquatica* e *A. gramineum*) através da fissão de um dos cromossomos metacêntricos na região do centrômero. O mesmo tipo de quebra cromossômica em outros quatro pares de cromossomos metacêntricos teria originado o número $n=11$, obtido para ambas as espécies do gênero *Sagittaria* (*S. sagittifolia* e *S. guayanensis*). A outra espécie de

Alisma, *A. lanceolatum*, com $n=13$, teria se originado de uma poliploidia do ancestral ($x=6$) seguida de uma quebra na região centromérica em um dos metacêntricos.

Através de características cromossômicas também é possível verificar relações de parentesco entre espécies, como foi feito para *Hydrocleys nymphoides* (Willd.) Buchenau ($2n = 16$) e *H. modesta* Pedersen ($2n = 14$), da família Limnocharitaceae. Estes cariótipos exibiram uma translocação Robertsoniana, ou seja, alteração do número cromossômico pela fusão de um cromossomo acrocêntrico ou telocêntrico a outro, com perda de um centrômero, formando um metacêntrico ou, então, pela fissão de um metacêntrico formando dois acrocêntricos (KENTON 1981).

Há casos em que o estudo cariomorfológico convencional não é suficiente para elucidar as relações cromossômicas, como ocorre com os gêneros *Drosera* (Droseraceae) e *Allium* (SHEIKH & KONDO 1995; VOSA 1985). A diferenciação linear dos cromossomos, envolvendo principalmente técnicas de bandamento e técnicas moleculares como a hibridação *in situ*, possibilita o uso de caracteres adicionais na análise citotaxonômica, que podem evidenciar as diferenças entre as espécies.

Dentre as técnicas de bandamento, utiliza-se o bandamento-C para identificar a quantidade e localização da heterocromatina constitutiva (SUMMER 1972) e coloração com fluorocromos para determinar a composição de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4'-6 diamidino - 2 fenilindol) evidencia seqüências de DNA repetitivas de adenina e timina (A - T), enquanto o CMA (cromomicina A₃) liga-se preferencialmente a regiões ricas em citosina e guanina (C - G). Além destas duas, pode-se utilizar coloração citoquímica específica com nitrato de prata, ou bandamento NOR (GOODPASTURE & BLOOM 1975), para identificar regiões organizadoras de nucléolo em cromossomos metafásicos e o número de nucléolos ativos, pois há uma especificidade para regiões de DNAr.

A hibridação *in situ* é um método preciso para localizar seqüências de ácidos nucléicos (tanto DNA quanto RNA) no citoplasma, organelas, cromossomos ou núcleo de material biológico (LEITCH *et al.* 1994). Em espécies de *Allium* (Alliaceae), foi feita a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para a detecção de uma seqüência repetitiva de DNA satélite (PICH *et al.* 1996). Esta foi

encontrada em todas as espécies pertencentes à mesma seção de *Alium cepa*, ou seja, sect. *Cepa*. As outras seções e subgêneros não revelaram a presença desta seqüência, com exceção de uma única espécie, *A. roylei*, pertencente à sect. *Oreiprason*, sugerindo que esta espécie está proximamente relacionada à sect. *Cepa*. Através deste estudo, os autores concluíram que provavelmente esta seqüência satélite teria evoluído já em ancestrais da sect. *Cepa* (PICH *et al.* 1996). Em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizada para localizar as seqüências de DNAr 5S e 18S-28S no tetraplóide *G. hirsutum* e nas espécies diplóides provavelmente ancestrais de *G. hirsutum* (*G. herbaceum*, *G. arboreum*, *G. raimondii* e *G. thurberi*) (HANSON *et al.* 1996). A multiplicidade, a variação em tamanho e número de sítios, e a falta de aditividade entre a espécie tetraplóide e seus prováveis ancestrais diplóides indicaram que o comportamento do loci de DNAr em algodão é consideravelmente mais complexo e dinâmico que o anteriormente imaginado pelos autores.

Além das técnicas de coloração, foram desenvolvidos métodos para aumentar o número de células em processo de divisão (através da sincronização do ciclo celular) e melhorar o espalhamento dos cromossomos, evitando sobreposição. O pré-tratamento de células em divisão, com drogas como o paradiclorobenzeno (PDB) e a 8-hidroxiquinoleína (8-HQ), é amplamente utilizado para clareamento do citoplasma e espalhamento dos cromossomos, através da quebra das fibras do fuso (SHARMA & SHARMA 1980).

Outros antimitóticos freqüentemente utilizados em pré-tratamento para estudos cromossômicos são a colchicina, o alfabromonaftaleno e até mesmo água gelada (SHARMA & SHARMA 1980; SILVAROLLA & AGUIAR-PERECIN 1994). A utilização de cicloheximida, um inibidor de síntese protéica, que promove a contração dos cromossomos em prófase e metáfase, misturado ao produto utilizado para pré-tratamento, tem também facilitado a análise de mitoses (BERTÃO 1998; SILVAROLLA & AGUIAR-PERECIN 1994).

O presente trabalho tem como objetivo a análise cariotípica de espécies da família Alismataceae, presentes no estado de São Paulo, utilizando metodologias de coloração comum e duas diferentes técnicas de bandamento cromossômico (C e CMA/DAPI), assim como a técnica de

hibridação fluorescente *in situ* (FISH), a fim de obter um maior detalhamento morfológico dos cromossomos e desse modo contribuir para o entendimento evolutivo e taxonômico do grupo.

CAPÍTULO 1

Karyotypic studies of some Brazilian species of Alismataceae Vent.¹

JÚLIA Y. COSTA and ELIANA R. FORNI-MARTINS*

**Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas,
CP6109, CEP 13083-970, Campinas – SP, Brazil*

ABSTRACT: Alismataceae family (sensu Cronquist) is a family composed of aquatic and semi-aquatic herbs, consisting of 11 genera and 75 species. In Brazil, only species belonging to the two major genera, *Echinodorus* Rich. ex Engelm. and *Sagittaria* L., are present. Chromosomes of species from both genera have been studied and the number $2n=22$ was common to all species. We present karyotypes for eight species, together with the asymmetry index (TF%) and total chromatin length (TCL). All karyotypes had high asymmetry and TCL, due to its large and mostly acrocentric chromosomes. Cytotaxonomic discussion is made, with special regard to chromosomal evolution inside the Alismatidae group.

Key words: Alismataceae, *Echinodorus*, *Sagittaria*, chromosomes, cytotaxonomy.

INTRODUCTION

The Alismataceae family, order Alismatales (Cronquist, 1988), is composed of aquatic and semi-aquatic, rhizomatous herbs, with emerged, submerged or floating leaves,

¹ Capítulo padronizado para publicação na revista *Annals of Botany*.

growing in muddy and water-logged substrates. Members of the family can be recognised by their milky sap, basal placentation and fruits mostly achenes (Haynes and Holm-Nielsen, 1994). The family consists of 11 genera and about 75 species native to tropical, subtropical, and subtemperate regions in both the Eastern and Western Hemispheres. In Brazil only the two major genera, *Echinodorus* and *Sagittaria*, are present.

Dahlgren and Clifford (1981) established the order Alismatales with just one family, Alismataceae, that included species previously assigned to the Limnocharitaceae. Later, Dahlgren *et al.* (1985) included in the order five different families: Aponogetonaceae, Butomaceae, Hydrocharitaceae, Limnocharitaceae and Alismataceae. Croquist (1988) separated Hydrocharitaceae as the only member of Hydrocharitales, and transferred the Aponogetonaceae family to the Najadales order (comprising Aponogetonaceae, Scheuzeriaceae, Juncaginaceae, Potamogetonaceae, Ruppiaceae, Najadaceae, Zannichelliaceae, Posidonaceae, Cymodoceaceae and Zosteraceae). The three remaining families (Alismataceae, Limnocharitaceae and Butomaceae) were kept in the order Alismatales. Judd *et al.* (1999), through a phylogenetic approach, using mainly the *rbcL* sequence, recognized two major clades in the Alismatales order. The first formed by Alismataceae (including Limnocharitaceae), Hydrocharitaceae and Butomaceae; and the second by Potamogetonaceae, Ruppiaceae, Zosteraceae, Posidoniaceae, Zannichelliaceae, Cymodocaceae and Najadaceae. The Araceae family appears as a subclade and was considered sister to the remaining families of the order. As in Dahlgren and Clifford (1981), the Limnocharitaceae was included in Alismataceae. Analysing evolution of hydrophily in Alismatidae, Les *et al.* (1997) obtained a consensus tree with the *rbcL* gene that grouped Alismataceae and Limnocharitaceae in the same clade, strongly supported by bootstrap values.

According to Judd *et al.* (1999), some shared morphological features also supported the inclusion of Limnocharitaceae inside Alismataceae, such as presence of laticifers, hypogynous flowers, three to many carpels, one to many ovules, curved embryo, six to many stamens and biforamate to multiforamate pollen grains. Main differences between the two families, given by Tomlinson (1982), are number of whorls of the carpels (two to many in Alismataceae and usually one in Limnocharitaceae), placentation (basal in Alismataceae and parietal in Limnocharitaceae) and fruits (indehiscent nutlets in Alismataceae and dehiscent follicles in Limnocharitaceae).

Members of Alismataceae, sensu Cronquist (1988), have been studied cytologically by some authors (Harada, 1956; Sharma and Chatterjee, 1967; Lepper, 1982; Mehra and Pandita, 1984; Uchiyama, 1989; Goldblatt, 1984, 1988; Goldblatt and Johnson, 1990, 1991, 1994) and yet just a few species, specially from the neotropics, are chromosomically documented. Haploid chromosome numbers of 5-13 have been reported, with 7-11 being the most common (Haynes and Holm-Nielsen, 1994). In both *Echinodorus* and *Sagittaria* (Table 1), the number $2n=22$ is the most frequent (Harada 1956; Sharma and Chatterjee 1967; Mehra and Pandita 1984).

The aquatic plants represent a lot of problems for traditional systematics. The loss or reduction of considered adaptative structures for terrestrial life as lignified tissue and cuticle are commonplace and some characteristics of aquatic plants as floating leaves, dissected submersed leaves, aerenchymatous tissue, etc., have arisen repeatedly among unrelated groups of aquatic angiosperms (Sculthorpe, 1967 *apud* Les and Haynes, 1995; Haynes, 1991 *apud* Les and Haynes, 1995). Furthermore, many morphological features exhibit extensive phenotypic plasticity that is influenced environmentally rather than genetically (Wooten, 1986; Scremin-Dias and Barros, 2001) and several leaf forms may

occur on the same plant (Judd *et al.*, 1999). All these elements complicate the understanding of the homologies among hydrophytes because the characters states have a high probability of being convergent or non-genetically based (Les and Haynes, 1995).

In order to trace the evolutionary karyotypic trends for the group as a whole, and incorporate molecular and cytogenetic data for the Alismataceae family, different species belonging to the two major genera of Alismataceae, *Echinodorus* and *Sagittaria*, were investigated chromosomically and compared with previous data available for the Alismatales, sensu Cronquist (1988).

MATERIAL AND METHODS

All species were collected in Brazil, in the states of São Paulo (SP) or Mato Grosso do Sul (MS), and are presented in Table 1. Mitotic studies were made from root tips collected in the wild, pre-treated in a mixture of saturated solution of paradichlorobenzene (PDB) and cycloheximide 0,009% (2:1) for 5 hours at 16-18°C and fixed in (1: 3) acetic-alcohol for 24 hours. The tips were washed in distilled water and hydrolysed in 5N HCl for 10 minutes at room temperature, squashed in a drop of 45% acetic acid. Slides were stained in Giemsa 2% and mounted permanently with Entellan. For calculating the size of the chromosomes at least 10 cells with good chromosome morphology, similar contraction and spreading were measured, and the mean length (L) was calculated for each chromosome pair. Satellites were only considered when observed in at least three cells of the same species. Nomenclature for centromeric position was that of Guerra (1986). The total chromatin length (TCL) and karyotypic symmetry (TF% rate), based on the short arm (S)

and on chromosome length (L) – $TF\% = 100 \Sigma S / \Sigma L$ (Huziwara, 1962), were calculated together with the CI (centromeric index) for a better comparison between karyotypes.

RESULTS

All species studied presented the same chromosome number, $2n=22$, with some karyotypic differences between species and no major differences between populations of the same species (Table 1). All species showed large chromosomes, with chromosome length varying gradually (Fig. 1, 2, 3 and 4). Chromosome size varied from 9.1 to 2.3 μm (Table 1), with *Echinodorus grandiflorus* presenting the smallest TCL (81.1 μm) and *E. longipetalus* the largest (121.1 μm).

Most of the chromosomes were found to be acrocentric with exception of the larger pair, which was always metacentric. Only *E. longipetalus* and *S. rhombifolia* presented not only the larger chromosome pair metacentric, but also the smallest chromosome pair metacentric/submetacentric respectively (Fig. 1 and 2). This high number of acrocentric chromosomes is demonstrated by the low TF% rate presented by all species studied, varying from 14.5 in *E. pubescens* to 18.7 and 20.5 in *S. rhombifolia* and *E. longipetalus* respectively (Table 1). This higher TF% rate showed by both species is justified by the presence of a second submetacentric/metacentric chromosome pair (Fig. 1 and 2).

Secondary constrictions were observed in at least one pair of acrocentric chromosomes, frequently the smallest pair, with exception of *E. tennellus* where satellites were not observed, and *E. longipetalus* and *S. rhombifolia* that showed secondary constrictions but

not in the smallest acrocentric pair. *E. macrophyllus* and *E. grandiflorus* were the only ones that presented two pairs with secondary constriction (Table 1, Fig. 1 and 2).

Due to the small number of cells obtained for *E. bolivianus*, we only present the diploid number and karyotypic formula obtained for this species ($2n=22$, Table 1, Fig. 3B).

TABLE 1: Data obtained for *Alismataceae* (*Echinodorus* e *Sagittaria*), showing populations analysed, voucher numbers, chromosome number at mitotic metaphase (2n), karyotypic formula (m=metacentric, sm= submetacentric, a=acrocentric), chromosome pair showing secondary constriction, range in mean chromosome length, symmetry index (TF%) and total chromatin length (TCL).

Species	Populations	Numbers (UEC)	2n	Karyotypic formula	Secondary constriction	Chromosome length (µm)	TF%	TCL (µm)
<i>E. aschersonianus</i> Graebn.	III	J.Y.C. 1011	22*	2m+20a	pair XI	7,5 - 2,8	16,1	87,7
<i>E. bolivianus</i> (Rusby) Holm-Niels.	VI	J.Y.C. 1101	22	2m+20a	-	-	-	-
<i>E. grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli	II, IV, V	J.Y.C. 1073, 091, 0103	22	2m+20a	pairs VI, XI	6,7 - 2,3	16,1	81,1
<i>E. longipetalus</i> Micheli	II, IV	J.Y.C. 1071, 1072	22*	4m+18a	pair IV	9,1 - 3,7	20,5	121,1
<i>E. macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	I		22*	2m+20a	pairs VIII, XI	6,7 - 2,9	12,9	86,6
<i>E. pubescens</i> (Mart.) Seub.	V	J.Y.C. 0102	22*	2m+20a	pair XI	8,6 - 2,9	14,5	106,4
<i>E. tennellus</i> (Mart.) Buchenau	III	J.Y.C. 1075	22*	2m+20a		8,5 - 2,9	15,2	100,8
<i>S. montevidensis</i> Cham. & Schltdl	I		22	2m+20a	pair XI	7,9 - 3,2	15,6	100,3
<i>S. rhombifolia</i> Cham.	II, IV, V	J.Y.C. 1012, 093, 1074, 0101	22*	2m+2sm+18a	pair IX	7,9 - 2,4	18,7	91,3

Populations: I) Campinas, SP - S 22°54'20", W 47°03'39"; II) Casa Branca, SP - 21°46'26", 47°05'11"; III) Itapetininga, SP - 23°35'30", 48°03'11"; IV) Itirapina, SP - 22°15'10", 47°49'22"; V) Pereira Barreto, SP - 20°38'18", 51°06'33"; VI) Bonito, MS - 21°20'28", 56°33'34". (*) indicate first documentation, (-) = not observed.

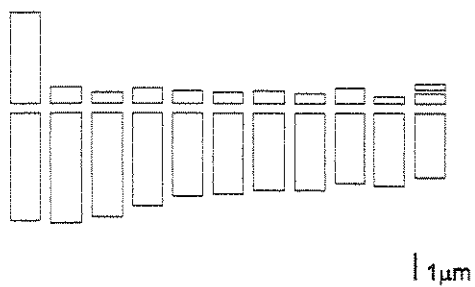
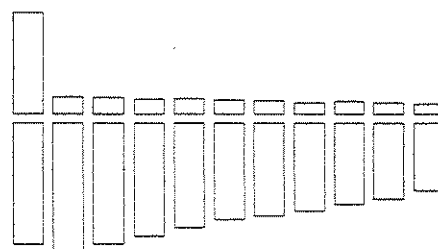
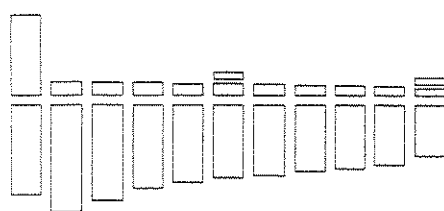
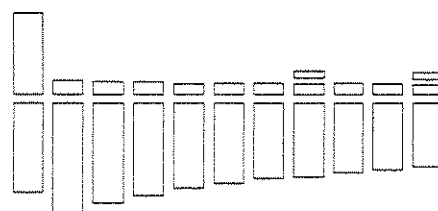
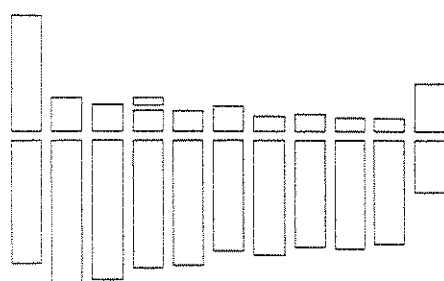
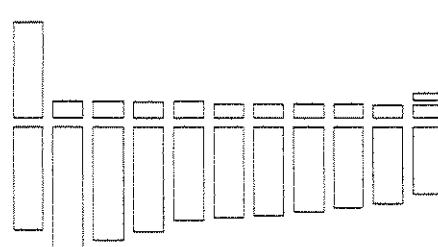
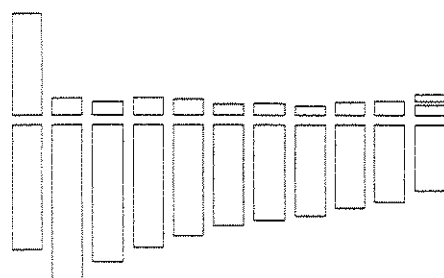
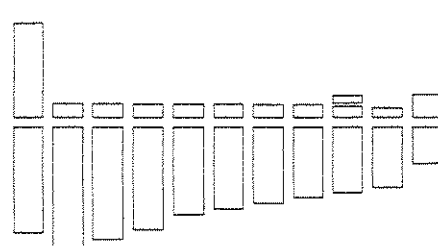
Echinodorus aschersonianus*Echinodorus tennellus**Echinodorus grandiflorus**Echinodorus macrophyllus**Echinodorus longipetalus**Sagittaria montevidensis**Echinodorus pubescens**Sagittaria rhombifolia*

FIGURE 1: Ideograms of each specie measured, indicating satellite position when present.

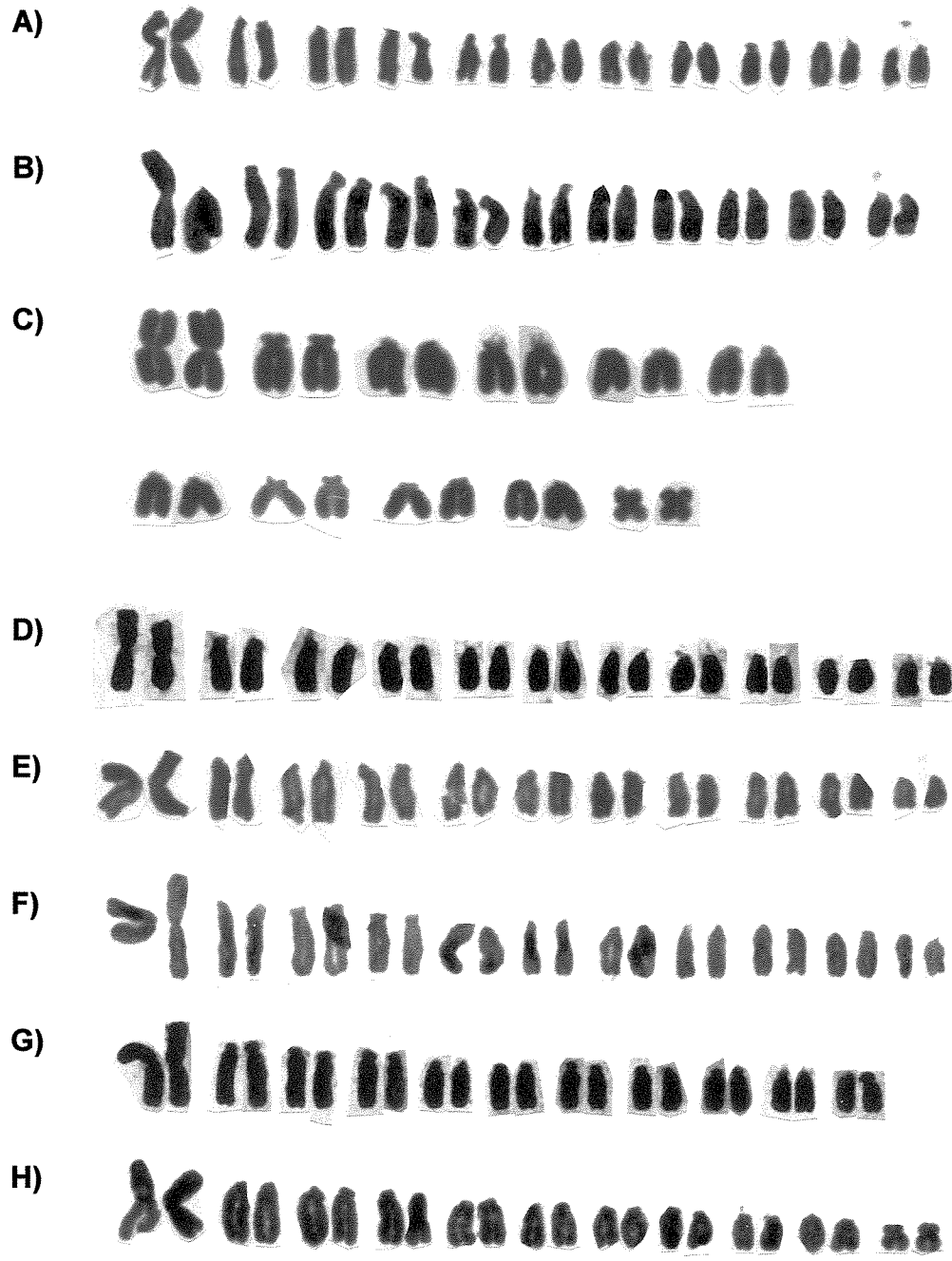


FIGURE 2: Karyotypes of *Echinodorus* and *Sagittaria* species, A) *E. aschersonianus*, B) *E. grandiflorus*, C) *E. longipetalus*, D) *E. macrophyllus*, E) *E. pubescens*, F) *E. tennellus*, G) *S. montevidensis*, H) *S. rhombifolia*.

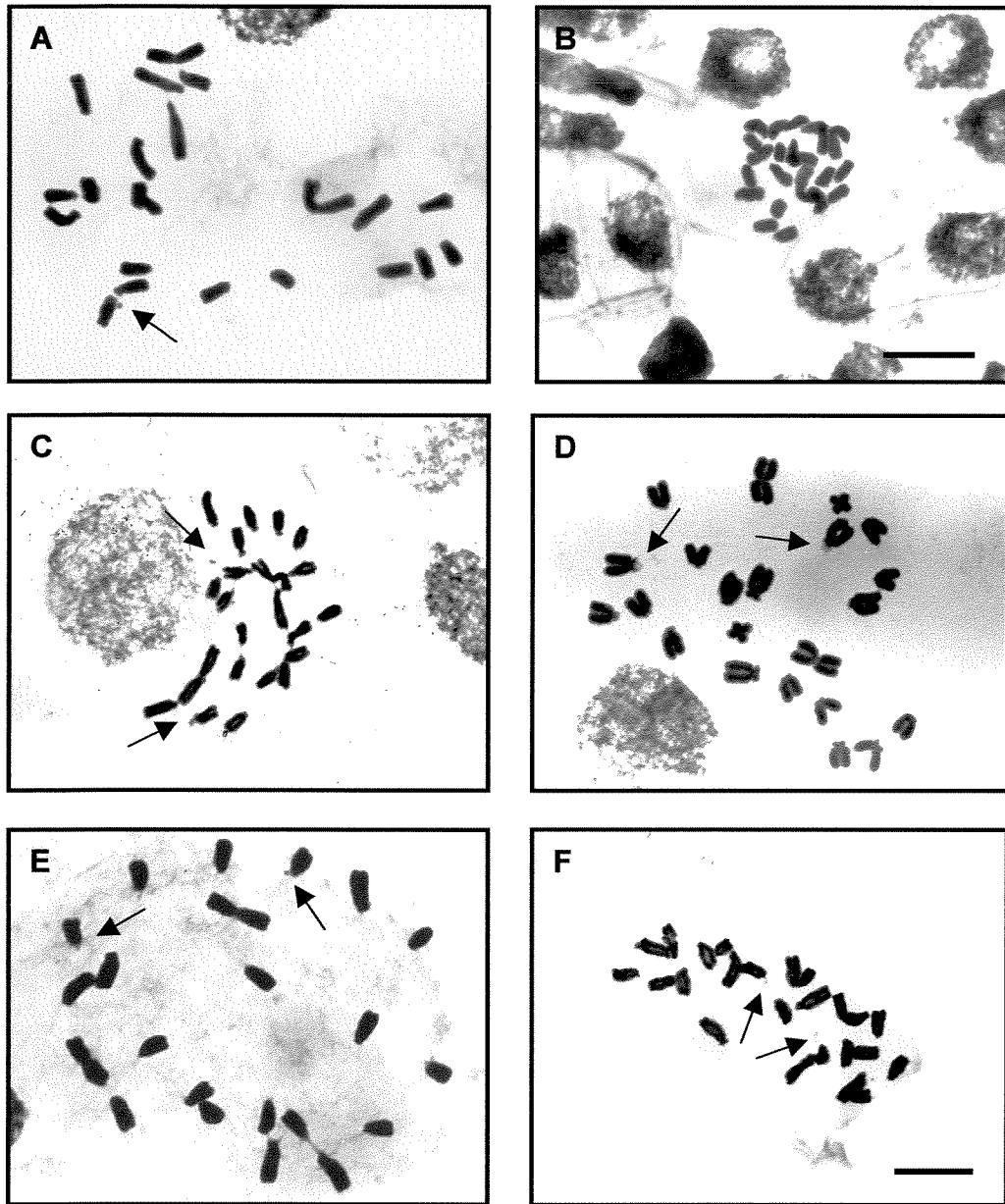


FIGURE 3: Mitotic metaphase with $2n=22$ of *Echinodorus grandiflorus* (A), *E. bolivianus* (B), *E. aschersonianus* (C), *E. longipetalus* (D), *E. macrophyllus* (E) e *E. pubescens* (F). Arrows point to satellite position. Barr represents 10 μm.

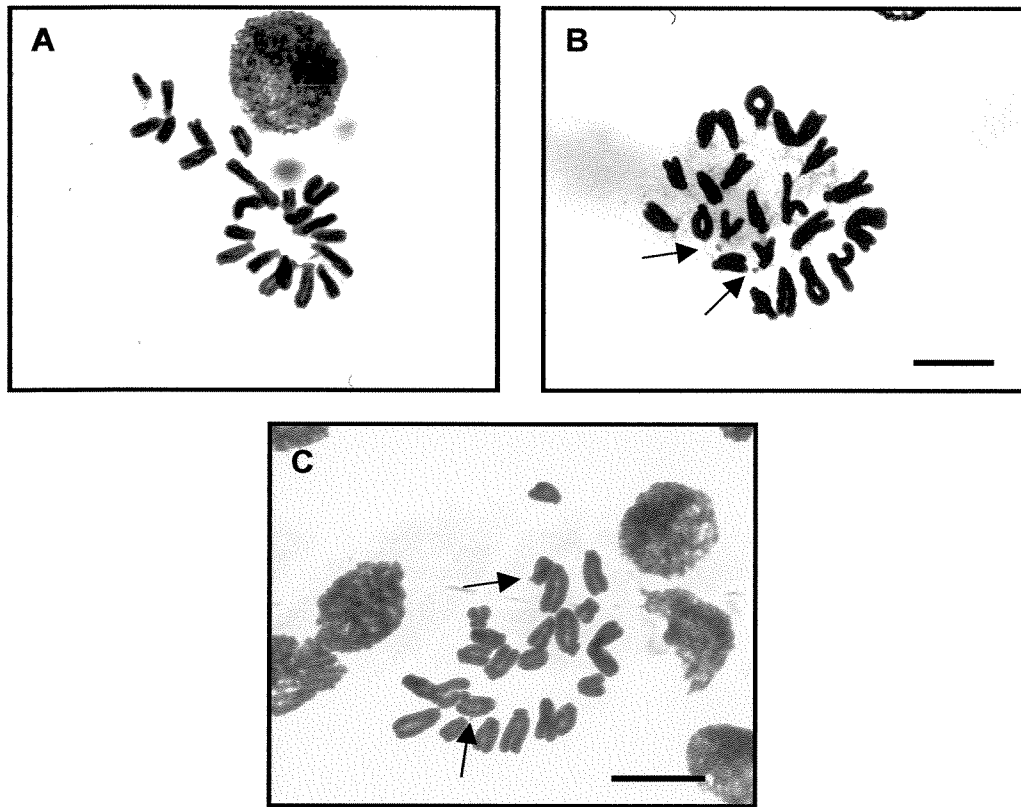


FIGURE 4: Mitotic metaphase with $2n=22$ of *E. tennellus* (A), *Sagittaria montevidensis* (B) e *S. rhombifolia* (C). Arrows point to stellite position. Barr represents $10\mu\text{m}$.

DISCUSSION

With the exception of *Sagittaria montevidensis*, where Taylor (1925) found $2n=20$ chromosomes, our findings confirmed previous investigations (Harada, 1956; Uchiyama 1989; Lepper, 1982) determining $2n=22$ chromosomes in all examined species of both genera, with a basic number of $x=11$. Other diploid numbers found in two species of the family, and that were not available for the present study, were *E. subatalus*, with $n=ca.14$ ($2n=ca.28$) (Coleman and Smith, 1969) and *S. lancifolia*, with $2n=20$ (Beal, 1960). This last species also presented $2n=22$ chromosomes in another investigation (Brown, 1946).

Together with the numeric data, other characteristics were shared between all species. All karyotypes presented gradual variation of chromosome length, low karyotype symmetry - as a consequence of the great amount of acrocentric chromosomes - and large chromosomes. This pattern is also shown by *E. cordifolius*, *S. calycina* and *S. eatoni* (Beal 1960), with only *S. calycina* presenting more than two metacentric/submetacentric pairs.

It is interesting to notice that differences between karyotypes (Fig.1) remain, mainly, on satellite position and morphology of the smallest chromosome pair. Some species presented very similar karyotypes, as observed between *Echinodorus aschersonianus* and *E. pubescens*. They presented same satellite position and differences in chromosome size could represent differential responses to pre-treatment. Similarities were also observed between *E. grandiflorus* and *E. macrophyllus*, that presented different satellite position, but chromosome length and TCL were very similar. These species are separated mainly by leaf morphology, with *E. grandiflorus* presenting pellucid markings, absent in *E. macrophyllus*.

(Haynes and Holm-Nielsen 1994), and are easily confused by collectors (Pansarin ER., pers. comm.).

Only *Echinodorus longipetalus* and *Sagittaria rhombifolia* presented more than one pair of metacentric/submetacentric chromosomes. Karyotypes presenting the smallest chromosome pair metacentric/submetacentric were also found in *S. eatoni* and *S. calycina* by Beal (1960), *S. sagittifolia* and *S. guayanensis* by Mehra and Pandita (1984). The fact that the majority of documented species presenting the smallest chromosome pair metacentric/submetacentric are from *Sagittaria*, could indicate that *Echinodorus longipetalus* should be revised and maybe placed inside *Sagittaria*, but both genera are very well defined morphologically (*Sagittaria* presenting male and female flowers and even male and female plants, *Echinodorus* presenting only hermaphrodite flowers) (Haynes and Holm-Nielsen 1994).

Species from *Alisma* (Alismataceae), not found in the Neotropics, show large chromosomes, varying from 9.1 to 2.9 μm , but chromosome numbers reported were from $2n=14$ to $2n=26$ (Mehra and Pandita, 1984). Contrasting with species of *Echinodorus* and *Sagittaria*, that showed, mostly, just one pair of metacentric chromosomes, *Alisma plantago-aquatica* and *A. gramineum* presented five pairs of metacentric chromosomes and only two telocentric pairs while *A. lanceolatum* ($2n=26$) showed 11 metacentric and 2 telocentric pairs (Mehra and Pandita, 1984). In this work, authors concluded that probably the original basic number of Alismataceae was $x=6$, with only metacentric chromosomes in the ancestor. The number $n=7$ would be originated from fission of one of the metacentric pairs, resulting in two pairs of telocentric chromosomes; $n=11$ (genus *Sagittaria*) would be the result of fission at the centromere region of all chromosomes but one. *Alisma*

lanceolatum could be originated through polyploidy and fission of one pair of metacentrics (Mehra and Pandita, 1984). Though the number of species studied by the author were few, karyotypes found in the present work, for *Echinodorus* and *Sagittaria* species, would fit in this hypothesis, with one pair of metacentric chromosomes and the 10 pairs of acrocentric chromosomes being originated from metacentric chromosomes, through centric fission. The presence of a second metacentric/submetacentric chromosome pair in two species could be explained by later chromosome reparttenings, such as duplication events.

In Limnocharitaceae, a family closely related to Alismataceae according to Cronquist (1988), and included inside Alismataceae by Judd *et al.* (1999), the karyotypes also showed large chromosomes and gradual variation in lenght. *Limnocharis flava* and *L. laforestii* presented $2n=20$ and *Hydrocleys nymphoides* $2n=16$ (Forni-Martins and Calligaris, in press), with two metacentric pairs in both genera, plus a submetacentric pair in *Hydrocleys*. The same pattern of large chromosomes and high asymmetry was found, with sizes varying from 11.0 μm to 2.6 μm and asymmetry index (TF%) from 19.6 to 17.8. Considering *Limnocharis* and *Hydrocleys* as members of the Alismataceae family (Judd *et al.*, 1999) and following the evolutionary trends proposed by Mehra and Pandita (1984), *Limnocharis* and *Hydrocleys* would have originated from the ancestor with $x=6$, through chromosome fission in four pairs, resulting in $n=10$, with two metacentric pairs and eight acrocentric pairs in *Limnocharis*, and through chromosome fission and loss of an acrocentric pair in *Hydrocleys*, resulting in $n=8$.

In Butomaceae, chromosome numbers from $2n=20$ to $2n=42$ are documented, with length varying from 8.3 to 3.7 μm , decreasing less gradually than in Alismataceae (Harada, 1956; Sharma and Chatterjee, 1967; Rao, 1953). Members from the Hydrocharitaceae were

found presenting a great variety of chromosome numbers, $2n=16$ to $2n=72$ (Harada, 1956), also showing large chromosomes ($10.0 - 1.6\mu\text{m}$), with a gradual decreasing in size or with a bimodal distribution (Sharma and Chatterjee, 1967). Thus, Butomaceae and Hydrocharitaceae families show similar karyotypic pattern to Alismataceae, specially regarding the chromosome length, justifying the close relationship between these groups as proposed by Judd *et al.* (1999) for Alismatales and by Les *et al.* (1997) for the Alismatidae group, analysing sequences of the *rbcL* gene. The consensus tree obtained by Les *et al.* (1997) showed two major clades, the first containing a subclade composed by Alismataceae and Limnocharitaceae, and the other subclade containing Butomaceae, Hydrocharitaceae e Najadaceae.

In the second major clade, Les *et al.* (1997) placed 10 families, with chromosomic data available for two of them. In Potamogetonaceae, numbers are documented from $2n=26$ to $2n=\text{ca.}88$ (Hollingsworth *et al.*, 1998), with small chromosomes ($2.3 - 1.0\mu\text{m}$) varying gradually (Sharma and Chatterjee, 1967). The Aponogetonaceae family presented chromosome numbers of $n=12/2n=24$ (Harada, 1956), and $2n=76$, with small chromosomes ($2.3 - 1.0\mu\text{m}$) (Sharma and Chatterjee, 1967). Species belonging to this clade show, thus, smaller chromosomes than individuals from the first clade and a higher ploidy level.

All chromosome data obtained in the present work for the Alismataceae family, allied with data obtained from previous works with the Alismatidae group by different authors, establish a karyotypic pattern for the family, with large chromosomes and low symmetry, and the basic number $x=11$ for both genera *Echinodorus* and *Sagittaria*. Following this pattern, chromosome data also support the incorporation of the Limnocharitaceae family inside Alismataceae (Judd *et al.*, 1999) and other arrangements proposed through molecular

analysis (Les *et al.*, 1997; Judd *et al.*, 1999). Further morphological, anatomical, chemical and ecological studies are necessary for a better understanding of the group, specially for Limnocharitaceae and Alismataceae in order to indicate whether Limnocharitaceae should be included inside Alismataceae or not.

LITERATURE CITED

- Beal EO.** 1960. The Alismataceae of the Carolinas. *Journal of Elishe Mitchell Scientific Society* **76** (1): 68-79.
- Brown WV.** 1946. Cytological studies in the Alismaceae. *Bot. Gaz.* **108** (2): 262-267.
- Coleman JR., Smith LB.** 1969. Chromosome numbers of some Brazilian angiosperms. *Rhodora* **71**: 548-551.
- Cronquist A.** 1988. *The evolution and classification of flowering plants. 2 ed.* The New York Botanical Garden, New York.
- Dahlgren R., Clifford V.** 1981. *The Monocotyledons: a comparative study.* Academic Press, New York.
- Dahlgren RMT., Clifford HT., Yeo PF.** 1985. *The families of the Monocotyledons.* Springer-Verlag, Berlin.
- Forni-Martins ER., Calligaris KP.** Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). *Aquatic Botany*. In press.
- Goldblatt P.** 1984. *Index to plant chromosome numbers 1979-1981. V.8.* Missouri Botanical Garden.
- Goldblatt P.** 1988. *Index to plant chromosome numbers 1984-1985. V.23.* Missouri Botanical Garden.
- Goldblatt P., Johnson DE.** 1990. *Index to plant chromosome numbers 1986-1987. V.30.* Missouri Botanical Garden.

- Goldblatt P., Johnson DE. 1991.** *Index to plant chromosome numbers 1988-1989. V.40.*
Missouri Botanical Garden.
- Goldblatt P., Johnson DE. 1994.** *Index to plant chromosome numbers 1990-1991. V.51.*
Missouri Botanical Garden.
- Guerra MS. 1986.** Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética IX 4:* 741 - 743.
- Harada I. 1956.** Cytological studies in Helobiae-I. Numbers in seven families. *Cytologia 21 (3):* 306-328.
- Haynes RR., Holm-Nielsen LB. 1994.** *The Alismataceae. Flora Neotropica. Monograph 64.* The New York Botanical Garden, New York.
- Hollingsworth PM., Preston CD., Gornall RJ. 1998.** Euploid and aneuploid evolution in *Potamogeton* (Potamogetonaceae): a factual basis for interpretation. *Aquatic Botany 60:* 337-358.
- Huziwara Y. 1962.** Karyotype analysis in some genera of compositae – VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany 49:* 116-119.
- Judd WS., Campbell CS., Kellogg EA., Stevens PF. 1999.** *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach.* Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Lepper L. 1982.** Beitrage zur chromosomen – Dokumentation cubanischer Pflanzensippen 4. *Revista del Jardin Botanico Nacional (Habana) 3:* 71-102.
- Les DH., Haynes RR. 1995.** Systematics of Subclass Alismatidae: A Synthesis of Approaches. In: Rudall, P. J.; Cribb, P. J.; Cutler, D. F.; Humphries, C. J. (Editors). *Monocotyledons: systematics and evolution.* Royal Botanic Gardens, Kew. 353-377.

- Les DH., Cleland MA., Waycott M. 1997.** Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany* **22** (3): 443-463.
- Mehra PN. and Pandita TK. 1984.** Cytological studies of some Helobiales of Kashmir Himalayas I. Family Alismataceae. *Cytologia* **49**: 295-304.
- Rao YS. 1953.** Karyo-systematic studies in Helobiales-I. Butomaceae. *Procedures of National Institute of Science (India)* **19** (4): 503-581.
- Scremin-Dias E. and Barros AL. 2001.** Análise comparativa da folha de duas variedades de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli, em ambientes distintos: Pantanal e Bonito, Mato Grosso do Sul. *Caderno de Resumos do 52º Congresso Nacional de Botânica*. João Pessoa, Pernambuco, p 106.
- Sharma AK. and Chatterjee MT. 1967.** Cytotaxonomy of Helobieae with special reference to the mode of evolution. *Cytologia* **32**: 286-307.
- Taylor WR. 1925.** Chromosome constrictions as distinguishing characteristics in plants. *American Journal of Botany* **12** (4): 238-244.
- Tomlinson PB. 1982.** *Anatomy of monocotyledons*. VII. Helobieae (Alismatidae). Clarendon Press, Oxford.
- Uchiyama H. 1989.** Karyomorphological studies on some taxa of the Helobiae. *Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Division 2 (Botany)* **22**: 271-352.
- Wooten JW. 1986.** Variations in leaf characteristics of six species of *Sagittaria* (Alismataceae) caused by various water levels. *Aquatic Botany* **23**: 321-327.

CAPÍTULO 2

Estudos cariotípicos em citótipos de *Echinododrus tennellus* (Martius) Buchenau (Alismataceae)

JÚLIA Y. COSTA e ELIANA R. FORNI-MARTINS*

**Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas,
CP6109, CEP 13083-970, Campinas – SP, Brasil*

RESUMO: O gênero *Echinodorus* L.C.Richard ex Engelm., possui cerca de 26 espécies de plantas aquáticas ou semi-aquáticas, distribuídas por todo o neotrópico. *Echinodorus tennellus* pode ser encontrada desde o nordeste dos Estados Unidos até a região Sul do Brasil. No presente trabalho é descrita a existência de citótipos na espécie. Através de estudos cromossômicos foram encontradas populações diplóides, $2n=22$, e triplóides, $2n=33$. Estudos meióticos também foram realizados, tendo sido encontradas anormalidades meióticas e alta inviabilidade de pólen no citótipo triplóide. Dados de bandamento C e CMA/DAPI são apresentados, confirmando a existência dos citótipos diplóide e triplóide. A existência de ambos os citótipos é viável devido à alta capacidade de reprodução vegetativa da espécie por estolão.

INTRODUÇÃO

A família Alismataceae - classe Liliopsida, subclasse Alismatidae, ordem Alismatales (CRONQUIST 1988) - é composta por plantas aquáticas ou semi-aquáticas, de folhas eretas ou flutuantes, que crescem em brejos ou solos encharcados. Membros da família podem ser reconhecidos pela presença de látex, placentação basal e frutos, em sua maioria, em forma de aquênios (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994). Dos 11 gêneros que compõem esta família, os dois maiores, *Echinodorus* e *Sagittaria*, estão presentes nos neotrópicos, com representantes no Brasil

e no Estado de São Paulo. Os outros nove gêneros menores (com menos de 10 espécies cada) possuem uma distribuição mais limitada, sem representantes nos neotrópicos (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994).

O gênero *Echinodorus* possui cerca de 26 espécies, com aproximadamente 17 delas presentes no Brasil (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994). De acordo com o levantamento realizado pelo projeto “Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo” (AMARAL, M. C. E.; comunicação pessoal) foram encontradas no Estado seis espécies do gênero *Echinodorus* (*E. tennellus* (Mart.) Buchenau, *E. grandiflorus* (Cham. & Schtdl.) Micheli, *E. longipetalus* Micheli, *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli, *E. aschersonianus* Graebn. e *E. paniculatus* Micheli).

A espécie *Echinodorus tennellus* possui uma ampla distribuição nos neotrópicos, presente desde o nordeste do Estados Unidos até a região sul do Brasil. Além das características citadas anteriormente para o grupo, esta espécie caracteriza-se por ser estolonífera e pequena, podendo atingir apenas 25cm de altura, enquanto outras espécies do gênero podem chegar a 300cm de altura, como é o caso de *E. longipetalus* (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994). Até o momento, dados cromossômicos a respeito da espécie não eram conhecidos.

No intuito de incorporar dados cromossômicos para a espécie e colaborar para o entendimento taxonômico do grupo, no presente trabalho foram investigadas cromossomicamente três populações de *E. tennellus*, presentes no Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas e analisadas três populações (Campinas, Itirapina e Itapetininga) da espécie *Echinodorus tennellus*, presentes no Estado de São Paulo, Brasil. As plantas foram coletadas em locais alagadiços, com solos lodosos, tendo, na maior parte das vezes, as folhas emersas, mas sendo encontrada também com as folhas submersas, em água corrente.

Foram coletados materiais testemunho de todas as populações, que foram herborizadas segundo técnicas usuais; as exsiccatas foram depositadas no Herbário UEC (Departamento de

Botânica/ IB/ UNICAMP). Alguns exemplares foram coletados e cultivados no laboratório de Biossistemática do Departamento de Botânica, UNICAMP, para análise citogenética

As raízes foram coletadas diretamente das plantas no campo ou cultivadas em laboratório e foram pré-tratadas em solução contendo duas partes de solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB) e uma parte de cicloheximida 0,009%, por 5 h em temperatura controlada entre 16-18°C. Depois de pré-tratadas, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (etanol absoluto 3: 1 ácido acético glacial) por 24h, sendo conservadas em álcool 70%, em freezer.

Para a obtenção das preparações citológicas, as raízes pré-tratadas foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 5N por 10 minutos. Após o esmagamento, as lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido para retirada da lamínula, sendo posteriormente imersas em solução de Giemsa 2% e deixadas corando por aproximadamente 10 minutos. Depois de lavadas e secas, as lâminas foram montadas com resina Entellan ou Allkian.

Para as técnicas de bandamento as raízes foram mergulhadas em solução enzimática contendo 2 partes de celulase e 20 partes de pectinase, para digestão da parede celular, esmagadas e armazenadas à temperatura ambiente por pelo menos três dias. As preparações foram hidrolisadas em ácido acético 45% a 60° C, durante 10 minutos, lavadas em água corrente e secas. Em seguida foram mergulhadas em solução saturada de hidróxido de bário à temperatura ambiente, durante 5 minutos, lavadas em solução de ácido acético 45% à temperatura ambiente, e novamente lavadas em água destilada. Depois de secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC a 60° C, durante 80 minutos.

Para bandamento CMA/DAPI (SCHWEIZER 1976), as lâminas foram submetidas à coloração com DAPI por 20 minutos, lavadas, submetidas à coloração com CMA por 90 minutos, novamente lavadas e montadas em sacarose saturada. A mesma lâmina, depois de observada e fotografada, foi lavada em água destilada e coradas normalmente com Giemsa 2%, para evidenciar as bandas C (SCHWARZACHER *et al.* 1980). Após coradas com Giemsa as lâminas foram montadas em resina Entellan ou Allkian.

Para as preparações meióticas, os botões coletados das populações de Campinas e Itirapina foram fixados em Carnoy, por 24h, transferidos para álcool 70% e armazenados em freezer. Para a

obtenção das células meióticas, as anteras dos botões foram separadas e esmagadas em uma gota de Carmim acético 1,2%. A mesma técnica foi utilizada para a análise da normalidade de tétrades de micrósporos e da viabilidade de pólen.

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico Olympus. As fotografias foram tiradas utilizando filme preto e branco Agfa, ISO 25. Para a elaboração dos cariótipos, 3 células da população de Itapetininga e 5 células da população de Itirapina foram digitalizadas, medindo-se, através do programa Image Pro-Plus 4.0, utilizando como padrão a média das medidas de cada par, incluindo tamanho do cromossomo, posição do centrômero e de constrições secundárias. A nomenclatura utilizada para a morfologia cromossômica foi de acordo com GUERRA (1986). Para caracterização do cariótipo foram também utilizadas medidas como o CTC (comprimento total da cromátide), calculado através da soma do tamanho individual de todos os cromossomos, o IC (índice centromérico) para cada par cromossômico, calculado dividindo-se o tamanho do braço curto do cromossomo pelo tamanho individual do cromossomo e multiplicando-se por 100, e o TF% (índice de assimetria), calculado através da soma de todos os índices centroméricos de cada par e dividindo-se pelo número de pares cromossômicos (HUZIWARA 1962).

RESULTADOS

Na população de Itapetininga foi observada a presença de $2n=22$ cromossomos, sendo um par metacêntrico e os demais acrocêntricos, com cromossomos variando entre 8,5 e 2,9 μ m (FIGURAS 1A e 4B). A população apresentou um baixo índice de simetria (TF%=15,2), com comprimento total da cromatina (CTC) de 100,8 μ m. Não foram observadas constrições secundárias.

Nas populações de Itirapina e de Campinas, as células de *Echinodorus tennellus* apresentaram $2n=33$ e $2n=ca.33$ cromossomos na metáfase mitótica, respectivamente, (FIGURAS 1B e C; e 4A). O cariótipo da população de Itirapina apresentou três cromossomos metacêntricos e o restante acrocêntrico, indicando que o conjunto haplóide dos cromossomos se apresenta triplicado, e não em duplicatas como o usual. Os cromossomos na população de Itirapina variaram

gradualmente de 11,2 a 4,0 μ m de comprimento, possuindo um baixo nível de simetria (TF%=16,2) (FIGURA 4A). O comprimento total de cromatina (CTC) foi de 204,6 μ m, alto em comparação com as outras espécies analisadas (COSTA & FORNI-MARTINS, 2002) devido ao número triplicado dos cromossomos ($2n=33$). Ainda não foram encontradas boas células na população de Campinas, porém esta também apresenta $2n=ca.33$ (FIGURA 1C).

Observou-se algumas anomalias no processo meiótico das populações de Campinas e Itirapina. Foram obtidas células com cerca de 11 trivalentes em diacinese (FIGURA 1D) e com pontes de ligação entre cromossomos e atrasos na migração de cromossomos em anáfase I (FIGURA 1E). Algumas tétrades exibiram irregularidades, como formação de tríades (3 células) e pêntades (5 células). Mesmo em caso de tétrades, às vezes o tamanho das células foi também irregular (FIGURA 2A). A análise dos grãos de pólen evidenciou aproximadamente 50% de inviabilidade (FIGURA 2B). Células da população de Itapetininga não puderam ser observadas devido à ausência de botões florais.

A técnica de bandamento CMA/DAPI revelou a presença de pares heteromórficos em ambas as populações de Itapetininga e Itirapina. A população de Itapetininga apresentou apenas uma banda CMA+/DAPI+, nos braços curtos de um dos pares acrocêntricos (FIGURA 2C e D). Já a população de Itirapina apresentou duas bandas CMA+/DAPI+, também nos braços curtos de dois cromossomos de um dos trios acrocêntricos (FIGURA 2E e F). Aparentemente, as bandas CMA+/DAPI+ parecem estar relacionadas à região dos satélites.

Através do bandamento C foram encontradas, similarmente às bandas CMA e DAPI, uma banda de heterocromatina constitutiva na população de Itapetininga, e duas na população de Itirapina (FIGURA 3), indicando heteromorfismo do par (ou trio) cromossômico.

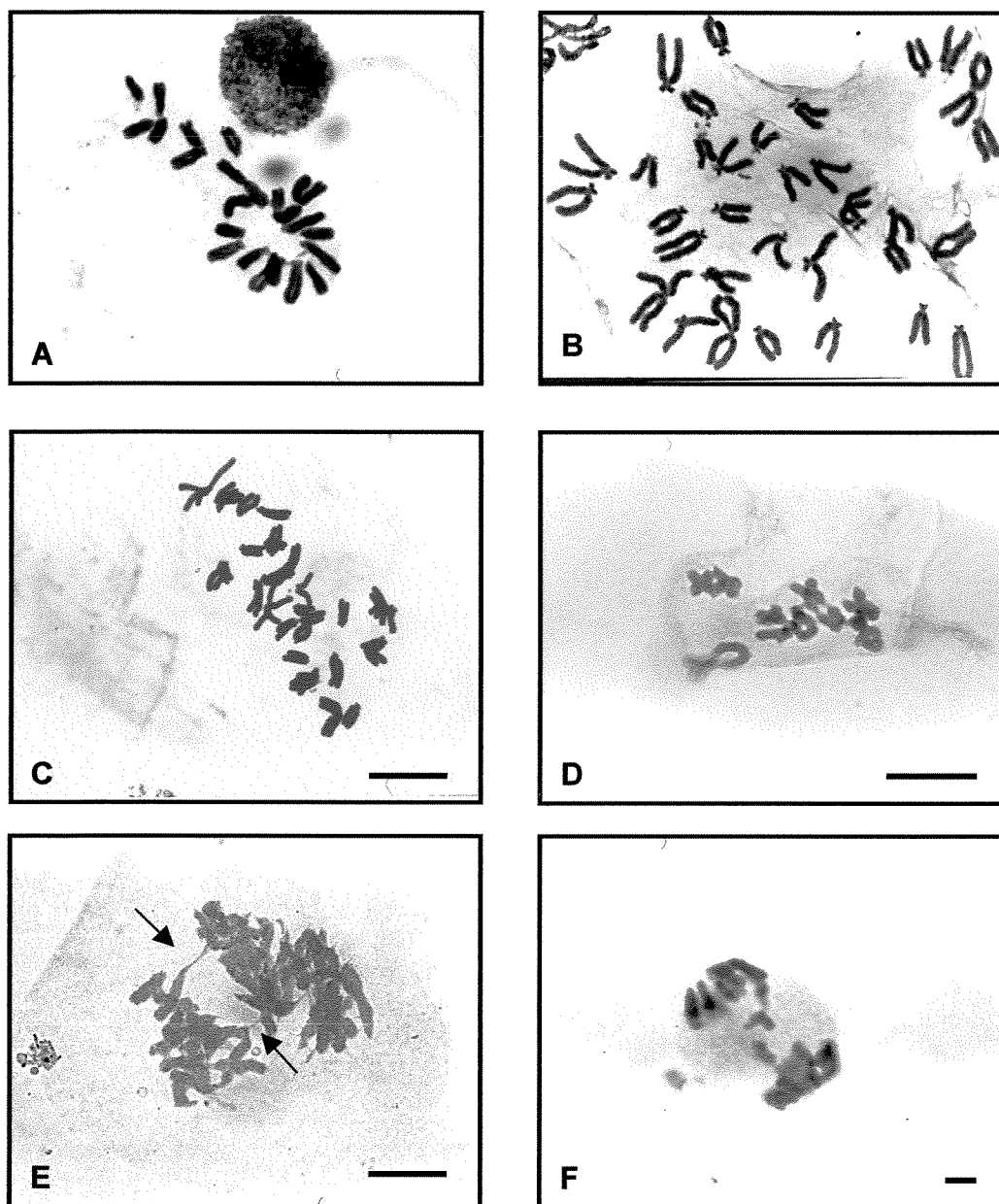


FIGURA 1: A, B e C) Cromossomos em metáfase mitótica de *E. tennellus*, populações de Itapetininga ($2n=22$), Itirapina ($2n=33$) e Campinas ($2n=ca.33$), respectivamente; D) diacinese na população de Campinas, com ca.11 trivalentes; E) meiose na população de Campinas. As setas indicam pontes anafásicas. F) célula mostrando atraso na migração de cromossomos durante meiose na população de Campinas. Barra= $10\mu m$.

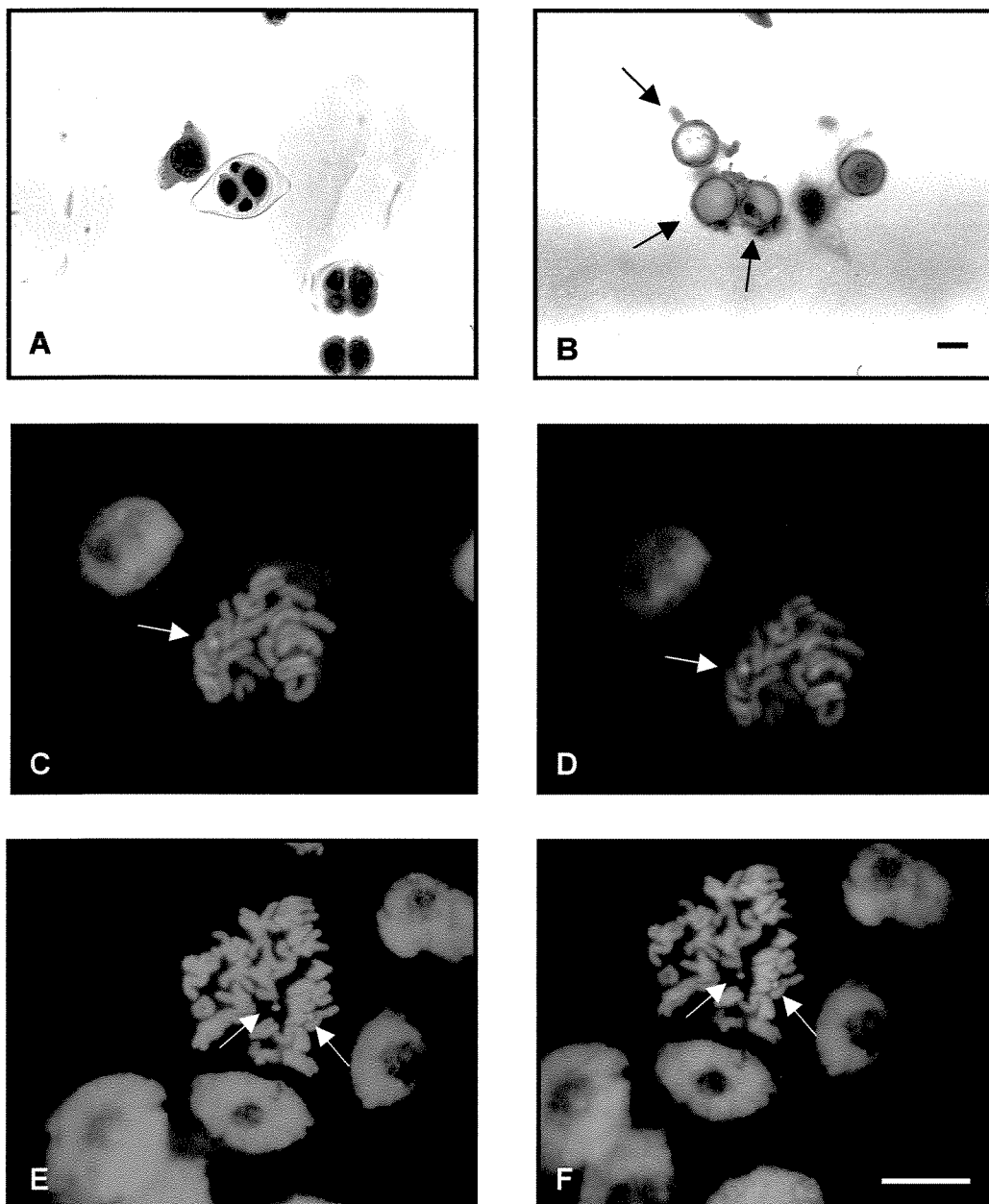


FIGURA 2: *E. tennellus*, A) tétrade anormal, população de Itirapina; B) pólenes inviáveis (setas), população de Campinas; C e D) bandamento CMA e DAPI, respectivamente, população de Itapetininga; E e F) bandamento CMA e DAPI, população de Itirapina; setas indicam bandas positivas. Barra=10 μ m.

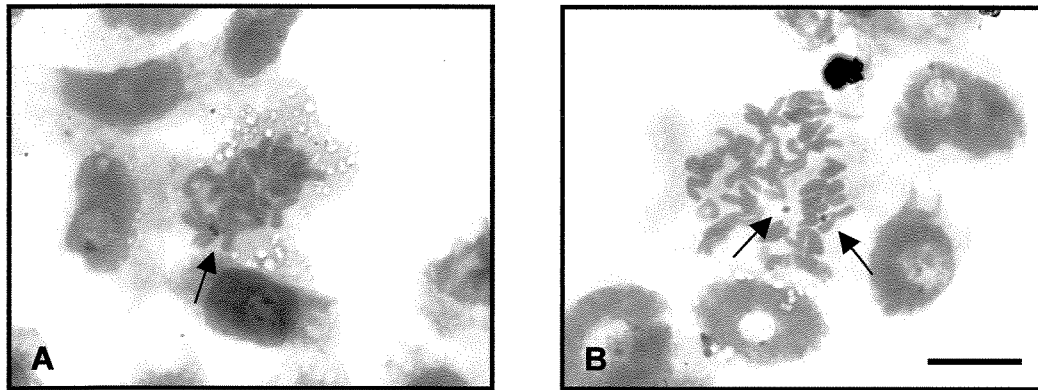


FIGURA 3: *E. tennellus*, bandamento C; A) população de Itapetininga; B) população de Itirapina; setas indicam bandas C. Barra=10 μ m.

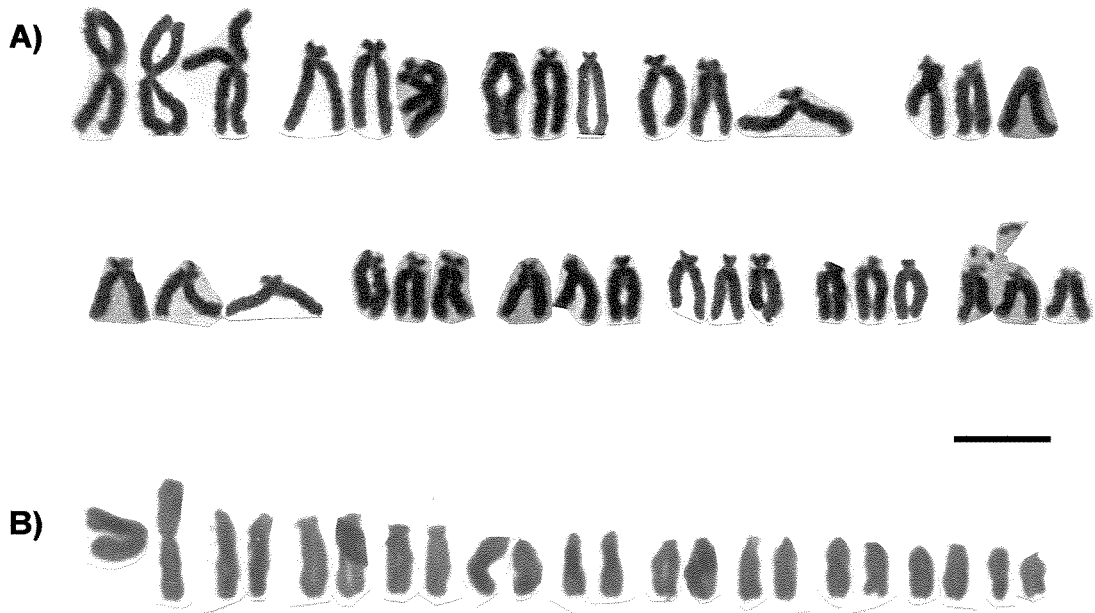


FIGURA 4: Cariótipos de *E. tennellus*, A) população de Itirapina (2n=33) e B) população de Itapetininga (2n=22). Barra=10 μ m.

DISCUSSÃO

O número $2n=33$, encontrado nas populações de Itirapina e de Campinas de *Echinodorus tennellus*, contrastando com o número cromossômico de $2n=22$ na população de Itapetininga, mostra a ocorrência de poliploidia nesta espécie. A existência de autopoliploidia, documentada para *E. tennellus* no presente trabalho, é a primeira relatada para as espécies de Alismataceae neotropicais. HARADA (1956), documentou a existência de citótipos aneuplóides, mas não poliplóides, em espécies do gênero *Alisma* (*A. lanceolata* com $2n=26$ e $2n=28$ e *A. plantago* com $2n=10$, 12 e 14), e em uma espécie de *Echinodorus* - *E. ranunculoides* ($2n=14$, 16 e 18).

Indivíduos da população de Itirapina apresentaram número cromossômico triplicado com três homólogos de cada cromossomo. Esses três homólogos podem parear na prófase da meiose, formando trivalentes. A formação de trivalentes durante o pareamento pode provocar erros no processo de divisão, gerando células com diferentes números cromossômicos, tétrades anormais e inviabilidade do pólen. Foram observadas também em *E. tennellus*, na população de Campinas, pontes de ligação durante a anáfase I e atraso na migração de cromossomos durante a meiose. A anormalidade do processo de reprodução sexuada é esperada em indivíduos com irregularidade meiótica, como seria o caso de poliplóides de nível ímpar (STEBBINS 1950). A existência de duas populações (Itirapina e Campinas) compostas por indivíduos triplóides é viável pelo fato de que a espécie *E. tennellus*, assim como outras espécies da família Alismataceae, possui uma eficiente reprodução vegetativa, por ser estolonífera.

O comprimento total da cromatina (CTC) da população diplóide ($100,8\mu\text{m}$) encontra-se dentro da variação encontrada para outras espécies de *Echinodorus* (COSTA & FORNI-MARTINS 2002). Em *E. tennellus*, cada lote cromossômico haplóide mede cerca de $50,4\mu\text{m}$, valor que indica que as populações triplóides ($\text{CTC}=204,6\mu\text{m}$) provavelmente se originaram por poliploidia (ganho de genoma completo). Caso a origem tivesse ocorrido por quebras cromossômicas, seria esperado que os cromossomos da população triplóide de *E. tennellus* fossem, comparativamente, menores e morfologicamente diferentes das demais espécies, resultando em um CTC semelhante ao de

espécies diplóides. O fato de que o CTC encontrado para as populações triplóides seja um valor tetraplóide (204,6 μ m), e não triplóide, quando comparadas à população diplóide (100,8 μ m), pode representar que amplificações de DNA, não detectadas pelas técnicas utilizadas, também podem ter ocorrido juntamente com a amplificação numérica. Como o número de células medidas para a elaboração de cariótipos foi baixa (3 células da população de Itapetininga e 5 da população de Itirapina), é possível também que estes valores representem diferenças em estágio de condensação dos cromossomos.

Os dados obtidos através das técnicas de bandamento indicam que, provavelmente, as regiões coradas positivamente tanto com CMA como DAPI, constituem também regiões de heterocromatina constitutiva. A existência das bandas CMA+ e DAPI+ na mesma região cromossômica pode ser compreendida como um indicativo de que, na mesma região cromossômica, se alternem regiões repetitivas em bases AT e CG, ou então que as repetições estejam ocorrendo em regiões diferentes, mas muito próximas, do braço curto do cromossomo acrocêntrico e a luminescência do fluorocromo esteja impedindo a localização exata de cada uma das repetições. De qualquer maneira, a diferença numérica de bandas C, CMA e DAPI entre as populações de Itapetininga (1) e Itirapina (2), não só confirma a poliploidia da segunda, como também indica que o conjunto haplóide duplicado seja aquele no qual o cromossomo do par heteromórfico apresenta a região de heterocromatina constitutiva, repetitiva em AT e em CG.

A existência de populações diferenciadas do ponto de vista cromossômico, ou de citótipos ou raças cromossômicas, abre a possibilidade de novos estudos em *E. tennellus*. Aparentemente, a diferenciação cromossômica não foi acompanhada de diferenciação morfológica. Assim, apesar da impossibilidade de fluxo gênico entre os citótipos diplóide e triplóide, não há condições de diferenciá-los taxonomicamente. É nítida a importância de citótipos poliplóides no processo de especiação dos vegetais. A poliploidia não é somente um dos mais conhecidos processos evolutivos, como também é o método mais rápido conhecido para produzir genótipos radicalmente diferentes mas ainda assim vigorosos e bem adaptados (STEBBINS 1950).

Citótipos ou raças cromossômicas diferentes em uma mesma espécie são relatados em diversos vegetais, como *Duguetia furfuracea* (2n=16, 24 e 32), uma anonácea de cerrado

(MORAWETZ 1984), e diversas gramíneas, com citótipos diplóides e tetraplóides freqüentemente associados à reprodução assexuada por agamospermia (BURSON 1975). Dentro das Alismatales, foi documentada a existência de citótipos em *Butomus umbellatus* (Butomaceae), na qual foram encontradas populações diplóides com $2n=26$ e triplóides com $2n=39$ (KRAHULCOVA & JAROLIMOVA 1993).

A ocorrência de citótipos em *E. tennellus* talvez explique a dificuldade de reconhecimento dessa espécie em relação a outra muito próxima, *E. bolivianus* (Rusby) Holm-Nielsen. As espécies *E. tennellus* e *E. bolivianus* são consideradas espécies distintas por HAYNES & HOLM-NIELSEN (1994), porém durante o projeto "Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo" encontrou-se grande dificuldade na identificação e separação dos indivíduos entre estas duas espécies, admitindo-se todos os indivíduos como *E. tennellus* (E. R. PANSARIN, comunicação pessoal). A ocorrência de *E. bolivianus* foi apenas bem documentada para o Estado de Mato Grosso do Sul, por SCREMIN-DIAS *et al.* (1999). De acordo com a Flora Neotropica (HAYNES & HOLM-NILSEN 1994), a principal diferença encontrada entre as duas espécies é a presença de marcas pelúcidas em *E. bolivianus* e ausência em *E. tennellus*, sendo o restante das diferenças citadas em relação a tamanho de estruturas, como lâmina foliar (2 a 18 mm de largura em *E. bolivianus* e 2 a 5 mm em *E. tennellus*), pecíolos (0,4 a 2,85 cm de comprimento em *E. bolivianus* e 1,2 a 9,5 cm em *E. tennellus*) e inflorescência (5 a 15 cm de comprimento em *E. bolivianus* e até 6 cm em *E. tennellus*), dentre outras. Uma resposta diferenciada dos citótipos diplóide e triplóide ao ambiente poderia indicar que a espécie *E. bolivianus* representaria apenas uma variação do citótipo diplóide, e que grande parte das características utilizadas na diferenciação das espécies representem variações morfológicas de algumas das populações poliplóides de *E. tennellus*, como geralmente é observado para indivíduos poliplóides (STEBBINS 1950).

Resultados de bandamento obtidos em *E. bolivianus* por COSTA *et al.* (2002) mostraram as mesmas características obtidas para a população diplóide (Itapetininga) de *E. tennellus*. A espécie apresenta também apenas uma banda C e uma banda CMA+/DAPI+, embora não tenha sido definido em que par cromossômico estas ocorrem tanto em *E. tennellus* como em *E. bolivianus*.

Assim, sugere-se uma análise mais detalhada e combinada, com estudos morfológicos, reprodutivos, ecológicos, anatômicos e moleculares das duas espécies, incluindo diversas populações. Estudando aspectos anatômicos de duas variedades de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli, SCREMIN-DIAS & BARROS (2001) encontraram diferenças significativas do tamanho dos pecíolos e do comprimento do limbo entre as duas variedades da espécie, além de observar que o número de lacunas do aerênquima e presença de fibras nas folhas estavam altamente relacionados à diferenças ambientais. Estudos similares seriam altamente recomendáveis para analisar se a dificuldade de diferenciação entre as espécies *E. bolivianus* e *E. tennellus* poderia ser relacionada à diferenciação de citótipos ou raças cromossômicas, além de poder indicar se haveriam alterações significativas nas populações triplóides de *E. tennellus*..

BIBLIOGRAFIA

- BURSON, B.L. **1975**. Cytology of some apomitic *Paspalum* species. *Crop Science* **15**: 229-232.
- COSTA, J. Y. & FORNI-MARTINS, E. R. **2002**. Karyotypic studies of some brazilian species of Alismataceae Vent. *In: Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 11-29.
- COSTA, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. **2002**. Bandamento cromossômico e hibridação *in situ* em espécies de Alismataceae neotropicais. *In: Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 46-69.
- CRONQUIST, A. **1988**. *The evolution and classification of flowering plants*. 2 ed. The New York Botanical Garden, New York.
- GUERRA, M. S. **1986**. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética IX* **4**: 741 - 743.
- HARADA, I. **1956**. Cytological studies in Helobiae-I. Numbers in seven families. *Cytologia* **21** (3): 306-328.
- HAYNES, R. R. & HOLM-NIELSEN, L. B. **1994**. *The Alismataceae. Flora Neotropica. Monograph* **64**. The New York Botanical Garden, New York.
- HUZIWARA, Y. **1962**. Karyotype analysis in some genera of compositae – VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* **49**: 116-119.
- KRAHULCOVA, A. & JAROLIMOVA, V. **1993**. Ecology of two cytotypes of *Butomus umbellatus*: I. Karyology and breeding behaviour. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **28** (4): 385-411.
- MORAWETZ, W. **1984**. Karyological races and ecology of the brazilian *Duguetia furfuracea* as compared with *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Flora* **175**: 195-209.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. **1980**. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* **134**: 239-297.
- SCHWEIZER, D. **1976**. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.

- SCREMIN-DIAS, E. & BARROS, A. L. **2001**. Análise comparativa da folha de duas variedades de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli, em ambientes distintos: Pantanal e Bonito, Mato Grosso do Sul. *Caderno de Resumos do 52º Congresso Nacional de Botânica*. João Pessoa, Pernambuco, p 106.
- SCREMIN-DIAS, E.; POTT, V. J.; HORA, R. C. da; SOUZA, P. R. de. **1999**. *Nos jardins submersos da Bodoquena*. 1ª ed. Editora UFMS.
- STEBBINS, G. L. JR. **1950**. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York and London.

CAPÍTULO 3

Bandamento cromossômico e hibridação *in situ* em espécies de Alismataceae neotropicais

JÚLIA Y. COSTA, ELIANA R. FORNI-MARTINS* & ANDRÉ L. L. VANZELA

**Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP6109, CEP 13083-970, Campinas – SP, Brasil*

RESUMO: A família Alismataceae Vent. é composta por plantas herbáceas, de hábito aquático ou semi-aquático, possuindo cerca de 11 gêneros. Até o momento, apenas representantes dos dois maiores gêneros, *Echinodorus* e *Sagittaria*, foram encontrados no Brasil. Para uma melhor caracterização cariotípica de algumas espécies de ambos os gêneros (*Echinodorus bolivianus*, *E. grandiflorus*, *E. longipetalus*, *E. macrophyllus*, *E. tennellus*, *Sagittaria montevidensis* e *S. rhombifolia*) e melhorar o entendimento taxonômico da família, foram realizadas técnicas de bandamento C, CMA/DAPI, e de hibridação *in situ* para a sequência 45S DNAr. As espécies apresentaram pouca diferenciação entre si com relação às bandas coradas por CMA, porém várias diferenças com relação às bandas C, DAPI e sítios de hibridação. Apenas uma das espécies apresentou diferença de sítios de hibridação entre diferentes populações. As técnicas foram eficientes na caracterização das espécies, mas não foram encontradas diferenças marcantes entre os gêneros estudados.

INTRODUÇÃO

A família Alismataceae - classe Liliopsida, subclasse Alismatidae, ordem Alismatales (CRONQUIST 1988) - é composta por plantas aquáticas ou semi-aquáticas, de folhas eretas ou

flutuantes, que crescem em brejos ou solos encharcados. Membros da família podem ser reconhecidos pela presença de látex, placentação basal e frutos, em sua maioria, em forma de aquênios (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994). Dos 11 gêneros que compõem esta família, os dois maiores, *Echinodorus* e *Sagittaria*, estão presentes nos neotrópicos, com representantes no Brasil, inclusive no Estado de São Paulo. Os outros nove gêneros menores, com menos de 10 espécies cada, não possuem representantes nos neotrópicos (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994).

O gênero *Echinodorus* possui cerca de 26 espécies, com aproximadamente 17 delas presentes no Brasil; e o gênero *Sagittaria* possui cerca de 25 espécies, com aproximadamente seis presentes no Brasil (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994). De acordo com o levantamento realizado pelo projeto "Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo", foram encontradas no Estado seis espécies do gênero *Echinodorus* (*E. tennellus* (Mart.) Buchenau, *E. grandiflorus* (Cham. & Schltidl.) Micheli, *E. longipetalus* Micheli, *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli, *E. aschersonianus* Graebn. e *E. paniculatus* Micheli) e três espécies do gênero *Sagittaria* (*S. guayanensis* Kunth, *S. montevidensis* Cham. & Schltidl. e *S. rhombifolia* Cham.) (AMARAL M. C. E., comunicação pessoal). Algumas dessas espécies foram estudadas do ponto de vista cariotípico por COSTA & FORNI-MARTINS (2002a), com a determinação de números cromossômicos e elaboração de ideogramas mediante técnicas de coloração convencional, evidenciando grande semelhança na morfologia cromossômica.

Uma proposta de evolução cariotípica foi feita para a família Alismataceae em um estudo realizado por MEHRA & PANDITA (1984). Neste estudo os autores analisaram o cariótipo de três espécies do gênero *Alisma* e duas espécies do gênero *Sagittaria*. De acordo com os cariótipos, os autores propuseram um número básico de $x=6$ para a família, onde todos os cromossomos seriam metacêntricos. A partir desse cariótipo, teria se originado o número $n=7$ (*Alisma plantago-aquatica* e *A. gramineum*) através da fissão de um dos cromossomos metacêntricos na região do centrômero. O mesmo tipo de quebra cromossômica em outros quatro pares de cromossomos metacêntricos teria originado o número $n=11$ obtido para ambas as espécies do gênero *Sagittaria* (*S. sagittifolia* e *S. guayanensis*). A outra espécie de *Alisma*, *A. lanceolatum*, com $n=13$, teria se

originado de uma poliploidia do ancestral com $x=6$ seguida de uma quebra na região centromérica em um dos metacêntricos (MEHRA & PANDITA 1984).

Há casos em que o estudo cariomorfológico convencional não é suficiente para elucidar as relações cromossômicas, como ocorre com o gênero *Drosera* (Droseraceae) e em *Allium* (Alliaceae) (SHEIKH & KONDO 1995; VOSA 1985). A diferenciação linear dos cromossomos, envolvendo principalmente técnicas de bandamento e técnicas moleculares como a hibridação *in situ*, possibilita o uso de caracteres adicionais na análise citotaxonômica, que podem evidenciar as diferenças entre as espécies (PIGNONE *et al.* 1999).

Dentre as técnicas de bandamento, utiliza-se o bandamento-C para identificar a quantidade e localização da heterocromatina constitutiva (SUMMER 1972) e coloração com fluorocromos para determinar a composição de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4'-6 diamidino - 2 fenilindol) evidencia seqüências de DNA repetitivas ricas em adenina e timina (A - T), enquanto o CMA (cromomicina A₃) se liga à regiões ricas em citosina e guanina (C - G). Além destas duas, pode-se utilizar coloração específica com nitrato de prata, ou bandamento NOR (GOODPASTURE & BLOOM 1975), para identificar regiões organizadoras de nucléolo em cromossomos metafásicos e o número de nucléolos ativos.

A hibridação *in situ* é um método preciso para localizar seqüências de ácidos nucléicos (tanto DNA como RNA) no citoplasma, organelas, cromossomos ou núcleo de material biológico (LEITCH *et al.* 1994). Em espécies de *Allium* (Alliaceae), foi feita a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para a detecção de uma seqüência repetitiva de DNA satélite presente em *Allium cepa*. A seqüência satélite foi encontrada em todas as espécies pertencentes à mesma seção de *Allium cepa*, ou seja, sect. *Cepa*. As outras seções e subgêneros não revelaram a presença desta seqüência, com exceção de uma única espécie, *A. roylei*, pertencente à sect. *Oreiprason*, o que sugeriu que esta espécie está proximamente relacionada à sect. *Cepa*. Através deste estudo, os autores concluíram que provavelmente esta seqüência satélite teria evoluído já em formas ancestrais da sect. *Cepa* (PICH *et al.* 1996). Em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizada para localizar as seqüências de DNAr 5S e 18S-28S no tetraplóide *G. hirsutum* e nas espécies diplóides provavelmente ancestrais de *G. hirsutum* (*G.*

herbaceum, *G. arboreum*, *G. raimondii* e *G. thurberi*). A multiplicidade, a variação em tamanho e número de sítios, e a falta de aditividade entre as espécies tetraplóides e seus prováveis ancestrais diplóides indicaram que o comportamento do loci de DNAr em algodão era consideravelmente mais complexo e dinâmico que o imaginado previamente pelos autores (HANSON *et al.* 1996).

Buscando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento taxonômico da família Alismataceae, foram realizadas diferentes técnicas de bandamento cromossômico, incluindo-se bandamento C, CMA e DAPI, e a técnica de hibridação *in situ* para a sequência 45S de DNAr em sete espécies da família Alismataceae.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Espécies coletadas

Foram analisadas sete espécies de Alismataceae, sendo cinco do gênero *Echinodorus* – *E. bolivianus*, *E. grandiflorus*, *E. longipetalus*, *E. macrophyllus* e *E. tennellus* - e duas do gênero *Sagittaria* - *S. montevidensis* e *S. rhombifolia*. De cada uma das espécies foram obtidas uma ou mais populações distribuídas pelos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (TABELA 1).

Foram coletados materiais testemunho de todas as espécies, que foram herborizadas segundo técnicas usuais; as exsicatas foram depositadas no Herbário UEC (Departamento de Botânica/ IB/ UNICAMP).

TABELA 1 –Espécies e populações de *Echinodorus* e *Sagittaria* analisadas, com respectivos números de exsicatas depositadas no Herbário UEC.

ESPÉCIE	POPULAÇÕES	NÚMEROS (UEC)
<i>S. montevidensis</i> Chamisso & Schlectendal	I	
<i>S. rhombifolia</i> Chamisso	II, IV e V	1012, 093 1074 0101
<i>E. bolivianus</i> (Rusby) Holm-Nielsen	VI	1101
<i>E. grandiflorus</i> (Chamisso & Schlectendal) Micheli	II, IV e V	1073 091 0103
<i>E. longipetalus</i> Micheli	II e IV	1071, 1072
<i>E. macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	I	
<i>E. tennellus</i> (Martius) Buchenau	III	1075

POPULAÇÕES:

I) Campinas, SP - S 22°54'20", W 47°03'39";

II) Casa Branca, SP - 21°46'26", 47°05'11";

III) Itapetininga, SP - 23°35'30", 48°03'11";

IV) Itirapina, SP - 22°15'10", 47°49'22";

V) Pereira Barreto, SP - 20°38'18", 51°06'33";

VI) Bonito, MS - 21°20'28", 56°33'34".

2) Preparações mitóticas

2.1) Pré-tratamento

Raízes foram coletadas e submetidas a pré-tratamento em solução contendo duas partes de solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB) e uma parte de cicloheximida 0,009% por 5h em temperatura controlada (16-18°C). Depois de pré-tratadas, as raízes foram fixadas em Carnoy (etanol absoluto 3:1 ácido acético glacial) por 24h, sendo conservadas em álcool 70%, em freezer.

2.2) Bandamento CMA/DAPI

O bandamento CMA/DAPI seguiu o protocolo de SCHWEIZER (1976), com modificações.

As raízes foram digeridas com solução enzimática contendo 2 partes de celulase e 20 partes de pectinase por cerca de duas horas. Em seguida foram lavadas e esmagadas entre lâmina e lamínula, com uma gota de ácido acético 45%. Para descolamento da lamínula as lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido. Após serem armazenadas à temperatura ambiente por pelo menos três dias, as lâminas foram mergulhadas, para hidrólise, em ácido acético 45% a 60° C, durante 10 minutos, lavadas em água corrente e secas. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução saturada de hidróxido de bário à temperatura ambiente, durante 5 minutos. As lâminas foram lavadas em solução de ácido acético 45% e novamente lavadas em água destilada. Depois de secas, as lâminas foram incubadas em 2xSSC a 60° C durante 80 minutos. Depois deste processo elas foram coradas primeiramente com o fluorocromo DAPI 2µg/ml por 20 minutos e depois com o fluorocromo CMA 0,5mg/ml por 1:30h. As lâminas foram montadas com sacarose saturada. Estas lâminas foram mantidas no escuro até serem fotografadas em microscópio de fluorescência. Depois de fotografadas algumas lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com Giemsa para evidenciar as bandas C.

2.3) Bandamento C

O bandamento C foi realizado de acordo com SCHWARZACHER *et al.* (1980), com algumas modificações. A digestão das raízes foi feita em solução enzimática contendo 2 partes de celulase e 20 partes de pectinase por cerca de duas horas. As mesmas foram, então, lavadas e esmagadas entre lâmina e lamínula. Para descolamento da lamínula as lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido. Após serem armazenadas à temperatura ambiente por pelo menos um dia, o

mesmo procedimento de hidrólise utilizado para banda CMA/DAPI foi utilizado antes da coloração com Giemsa. Como no bandamento CMA/DAPI, as lâminas foram passadas por ácido acético, hidróxido de bário e 2xSSC, todos a 60°C. As lâminas foram novamente lavadas, secas e coradas com Giemsa 2%, diluído em tampão fosfato (Sorensen) pH 6,8 e montadas em resina Entellan ou Allkian.

2.4) Hibridação *in situ* (HIS) (LEITCH *et al.* 1994)

A) *Preparação da sonda:*

Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de cerca de 12 kb contendo 28S-5,8S-18S com seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídeo pUC em *E.coli*, resistente a ampicilina. O plasmídeo foi separado pela técnica da miniprep e a concentração medida em um fluorômetro. A marcação foi feita por nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14-dATP.

B) *Tratamento da lâmina e HIS:*

Para a hibridação *in situ*, as lâminas foram preparadas com digestão enzimática, como descrito para as técnicas de bandamento, e armazenadas em freezer. Antes de iniciar a hibridação as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase : 99 2xSSC) pH 7,0, a 37°C por 1h. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 min sob agitação, mergulhadas em paraformaldeído 4%, por mais 10 min., e depois lavadas novamente em 2xSSC. As lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas estarem secas, a preparação foi coberta pela mistura de hibridação. A mistura de hibridação é composta por formamida 100%, dextran sulfato 50%, 20xSSC, sonda (100-200 ng μl^{-1}), DNA de bloqueio, SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridação nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, sendo submetidas a um ciclo de 90°C por 10 min, seguido por 45°C por mais 10 min. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda a noite.

C) *Banhos pós-hibridação:*

Foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/ Tween 20 0,2% a 42°C e outro com 4xSSC/ Tween 20 0,2% à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos sob agitação.

D) Detecção da hibridação:

Para a detecção da hibridação, as lâminas foram tratadas com 100µl de BSA 5% por 5 min. Foram adicionados 50µl da solução de detecção, contendo 1:100 de avidina-FITC, e contracorou-se os cromossomos com iodeto de propídio.

Após nova lavagem com 4xSSC por 20 min as lâminas foram montadas com Vectashield (Antifade).

3) Análise das lâminas e elaboração dos cariótipos

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico Olympus e de fluorescência Leitz. Para análise das lâminas tratadas com CMA utilizou-se o filtro I 2/3 e para análise das lâminas tratadas com DAPI o filtro A2. As fotografias para a coloração da banda C foram tiradas utilizando filme preto e branco, ISO 25. Para a banda CMA/DAPI foi utilizado filme preto e branco ISO 100 ou filme de slide ISO 400. As fotografias da hibridação *in situ* foram feitas com filme colorido ISO 100. Com exceção do procedimento de hibridação *in situ*, do qual foram observadas apenas uma lâmina de cada espécie, foram observadas no mínimo 10 células em cada procedimento e, no caso de elaboração de cariótipos, foi utilizada apenas a melhor célula obtida.

RESULTADOS

Observou-se grande diferença nos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva e quantidade da mesma entre as sete espécies analisadas (*Echinodorus bolivianus*, *E. grandiflorus*, *E. longipetalus*, *E. macrophyllus*, *E. tennellus*, *Sagittaria montevidensis* e *S. rhombifolia*). De uma maneira geral, o bandamento com fluorocromos CMA/DAPI demonstrou uma certa constância no número e localização das bandas CMA+, mas não das bandas DAPI+. Através da hibridação *in situ*, observou-se também diferenças entre as espécies, não só com relação ao número de sítios de DNAr como também com relação ao tamanho. Apenas em *Sagittaria rhombifolia* foram observadas diferenças inter-populacionais com relação ao número de sítios (TABELA 2).

Espécie	2n	Bandas C	CMA/DAPI	FISH
População				
<i>E. bolivianus</i>	22	1	1 CMA+/DAPI+	-
<i>E. grandiflorus</i>	22	2	2 CMA+/DAPI-	2 sítios
<i>E. longipetalus</i>	22	várias	4 CMA+/DAPI neutras várias DAPI+/CMA neutras	-
<i>E. macrophyllus</i>	22	várias	2 CMA+/DAPI- várias DAPI+/CMA neutras	4 sítios
<i>E. tennellus</i>	22	1	1 CMA+/DAPI+	-
<i>S. montevidensis</i>	22	2	Sem bandas	4 sítios
<i>S. rhombifolia</i>				
Casa Branca	22	14	3 CMA+/DAPI neutras	5 sítios
Itirapina	22	14	2 CMA+/DAPI-	9 sítios

TABELA 2: Resumo dos dados cariotípicos de espécies de *Echinodorus* e *Sagittaria*, indicando o número de cromossomos na mitose (2n), quantidade de bandas C, tipo e número de bandas CMA/DAPI, número de sítios observados na hibridação *in situ* (FISH) para DNAr 45S, (-) indicam espécies não analisadas.

Echinodorus bolivianus* (Rusby) Holm-Nielsen**Banda C***

A espécie apresentou apenas um bloco heterocromático no menor braço de um dos cromossomos acrocêntricos (FIGURA 1C).

Banda CMA/DAPI

A espécie apresentou apenas uma banda CMA+/DAPI+, coincidente no menor braço de um dos cromossomos acrocêntricos (FIGURA 1A e B).

Nesta espécie obteve-se bom resultado com a coloração sequencial CMA/DAPI e Giemsa 2%. Pode-se observar que a banda CMA+/DAPI+ foi também corada pelo bandamento C, evidenciando que a região de heterocromatina constitutiva é rica em regiões repetitivas de AT e CG.

Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli**Banda C***

A espécie apresentou um par de bandas C, presentes no menor braço de um dos pares de cromossomos acrocêntricos (FIGURA 2A).

Banda CMA/DAPI

Foram observadas apenas duas bandas CMA+/DAPI neutras (FIGURA 1E e F), localizadas nos braços curtos dos cromossomos de um dos pares acrocêntricos.

Hibridação in situ

Nas células obtidas na hibridação foram visualizados apenas dois sítios de hibridação para a região DNAr 45S (FIGURA 1D).

Echinodorus longipetalus* Micheli**Banda C***

Nesta espécie foram observadas inúmeras bandas de heterocromatina constitutiva, havendo bandas terminais, intercalares e centroméricas. Os pares de cromossomos metacêntricos apresentaram apenas pontuações centroméricas, assim como um dos maiores pares de cromossomos acrocêntricos. Com exceção de dois pares de cromossomos acrocêntricos, um

apresentando apenas pontuações centroméricas, e outro apresentando apenas bandas terminais, todos os outros pares de acrocêntricos apresentaram bandas intercalares. Alguns destes pares apresentaram também bandas centroméricas e terminais (FIGURA 2B).

Banda CMA/DAPI

Foram visualizadas 4 bandas CMA+/DAPI⁰, nos braços menores de alguns cromossomos acrocêntricos, e inúmeras bandas DAPI+/CMA neutras. Todas as bandas DAPI+ visualizadas são intercalares, presentes nos braços longos de cromossomos acrocêntricos, provavelmente coincidindo com algumas bandas C intercalares (FIGURA 2C e D).

***Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli**

Banda C

As células observadas apresentaram muitas bandas, localizadas nas porções teloméricas dos braços maiores dos cromossomos acrocêntricos. Em pelo menos dois pares de cromossomos, também acrocêntricos, foram localizados pontos ("dots") na região mediana dos braços maiores. Em apenas um par de cromossomos acrocêntricos foi visível uma banda na porção terminal dos braços menores do cromossomo (FIGURA 3B).

Banda CMA/DAPI

Esta espécie apresentou células com pelo menos duas bandas CMA+/DAPI⁻ (FIGURA 2E e F) nos braços menores de um par de cromossomos acrocêntricos e várias bandas DAPI+/CMA neutras (FIGURA 2), em sua maioria teloméricas, com alguns pontos nas regiões medianas dos braços longos dos cromossomos acrocêntricos. As bandas DAPI+ provavelmente coincidem com as bandas C.

Hibridação in situ

A hibridação *in situ* evidenciou quatro sítios de DNAr 45S na região telomérica (ou nas pontas) dos braços curtos de dois pares de cromossomos acrocêntricos (FIGURA 3A).

***Echinodorus tennellus* (Martius) Buchenau**

Banda C

A espécie apresentou apenas uma banda C, presente nos braços curtos, em apenas um dos cromossomos de um dos pares acrocêntricos, indicando que o par é heteromórfico (FIGURA 3).

Banda CMA/DAPI

Células desta espécie apresentaram apenas uma banda CMA+/DAPI+, observada também nos braços curtos de um dos cromossomos acrocêntricos (FIGURA 3C e D).

***Sagittaria montevidensis* Chamisso & Schlechtendal**

Banda C

A espécie apresentou apenas um pequeno par de bandas C, nos braços menores de um dos cromossomos acrocêntricos (FIGURA 4).

Banda CMA/DAPI

Não foram evidenciadas bandas CMA+ e DAPI+ nesta espécie (FIGURA 4).

Hibridação in situ

Puderam ser observados quatro sítios de hibridação para o sítio 45S DNAr. Dois sítios se apresentaram amplificados e os outros dois sítios um pouco menores, sendo todos os quatro localizados nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos, provavelmente envolvendo as constrições secundárias (FIGURA 4B).

***Sagittaria rhombifolia* Chamisso**

Bandamento C

As células em metáfase desta espécie apresentaram 14 bandas C, distribuídas em sete pares cromossômicos (1º, 2º, 5º, 6º, 7º, 8º e 9º), sendo quatro destes heteromórficos. Apenas um cromossomo do par metacêntrico (1º) apresentou banda C na região mediana de um dos braços. Outros pares heteromórficos são o 6º, o 8º e o 9º, em ordem decrescente (FIGURAS 5A e 6B). O 6º par apresentou um dos cromossomos com pontos giemsa-positivos na região mediana dos braços longos, além da banda na região telomérica dos braços curtos apresentada por ambos os cromossomos do par. Já o oitavo par cromossômico apresentou heteromorfismo na região

telomérica do braço curto, além de uma banda, não heteromórfica, na região mediana do braço longo. O 9º par apresentou em um dos cromossomos uma banda intensamente corada na região telomérica dos braços curtos, mas apenas uma banda fraca e significativamente menor na mesma região do outro cromossomo do par. A maioria das bandas encontram-se na porção telomérica dos braços curtos. Apenas um par (2º) apresentou pontos na porção proximal ao centrômero, nos braços curtos (FIGURA 5A).

Bandamento CMA/DAPI

Foram observadas cinco bandas CMA+, sendo três CMA+/DAPI neutras e duas CMA+/DAPI-, tanto na população de Casa Branca como na de Itirapina (FIGURA 4E e F, e 5B e C). As bandas CMA+ estão presentes na região telomérica dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos dos pares 4, 6 e 9, sendo o 4º e o 9º pares heteromórficos (FIGURA 6C). O 4º par apresentou banda CMA+/DAPI apenas em um dos cromossomos do par, enquanto o 9º par apresentou banda CMA+/DAPI- amplificada em um dos cromossomos, podendo ser observados dois blocos intensamente corados separados por uma região menos corada, e uma única banda CMA+/DAPI- significativamente menor no outro cromossomo do par (FIGURA 6C).

Hibridação in situ

A hibridação *in situ* nesta espécie evidenciou diferentes números de sítios entre duas populações distintas. Na população de Itirapina, as células apresentaram nove sítios de hibridação para a região 45S do DNAr, sendo 4 sítios de tamanho médio e 5 sítios pequenos, distribuídos nos pares 4, 6, 7, 9 e 10, sendo o 4º par heteromórfico com apenas um dos cromossomos do par apresentando sítio (FIGURAS 5E e 6E). Na população de Casa Branca, as células apresentaram 5 sítios de hibridação, distribuídos nos pares 4, 6 e 9 (FIGURAS 5D e 6D), sendo dois sítios bem amplificados, e dois sítios médios e um sítio pequeno, todos na porção telomérica dos braços curtos dos cromossomos. O par 4 apresentou-se também heteromórfico nesta população, com sítio em apenas um dos cromossomos. Diferente da população de Itirapina, nesta população o 9º e o 6º par apresentaram-se heteromórficos, com um dos cromossomos apresentando sítio amplificado, provavelmente com dois blocos corados fortemente, e o outro cromossomo de cada par apresentando sítio na mesma região, mas bem menor (FIGURA 6D).

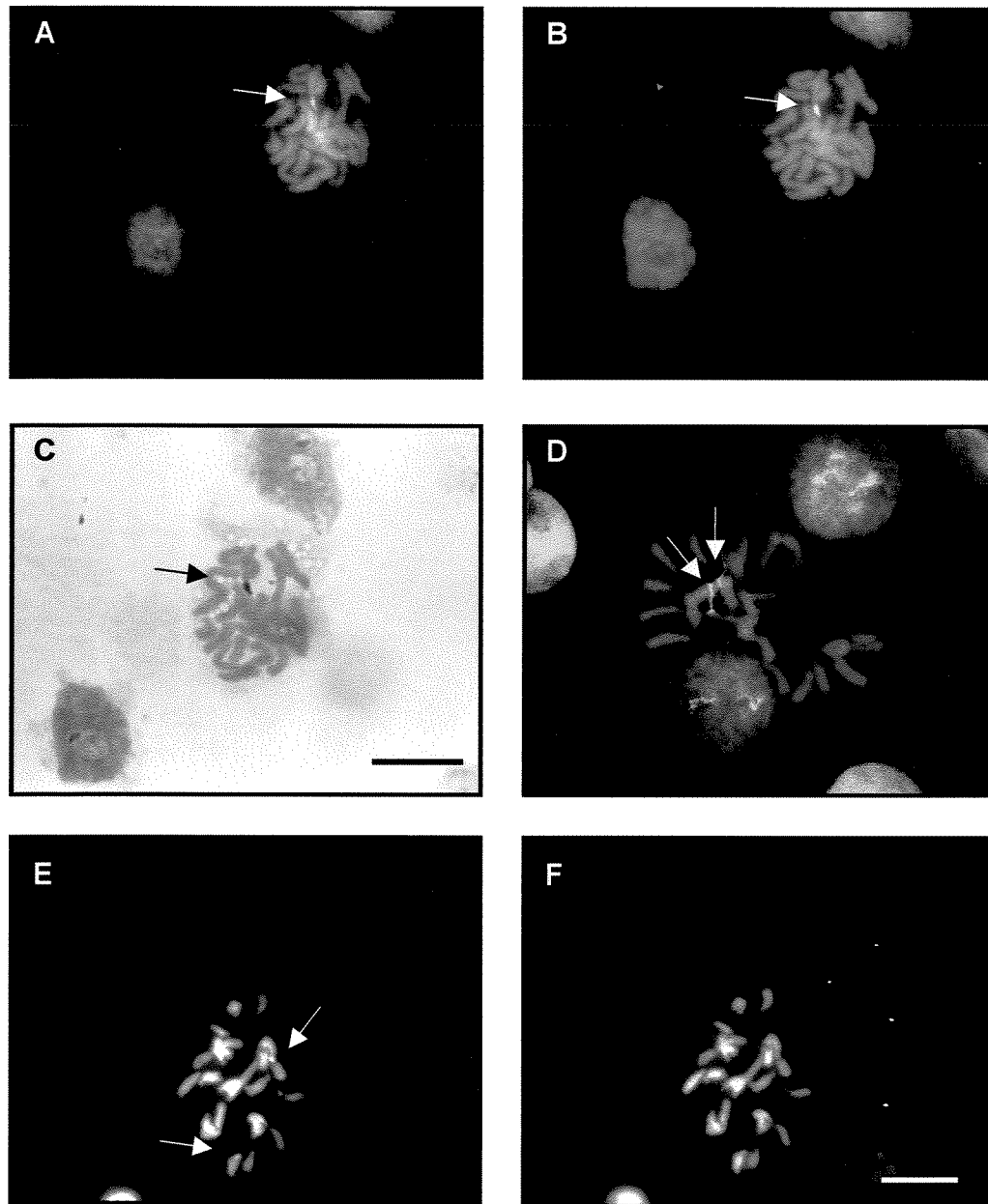


FIGURA 1: A, B e C) *Echinodorus bolivianus*, CMA, DAPI e banda C respectivamente; D, E e F) *E. grandiflorus*, hibridação *in situ*, CMA e DAPI respectivamente. Setas indicam bandas/ sítios de hibridação 45S DNAr. Barra=10 μ m.

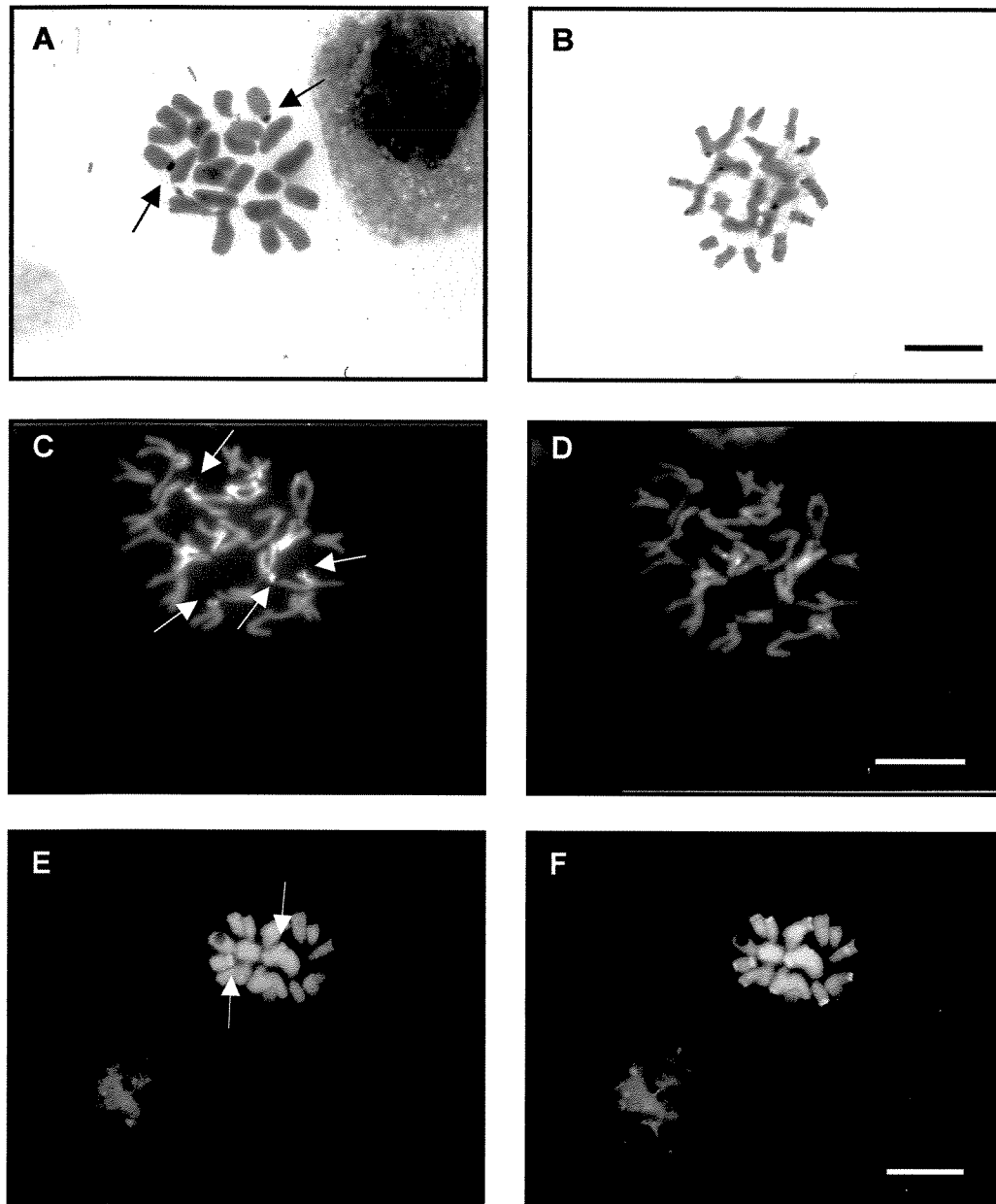


FIGURA 2: A) *Echinodorus grandiflorus*, setas indicam bandas C; B, C e D) *E. longipetalus*, bandamento C, CMA e DAPI, respectivamente; E e F) *E. macrophyllus*, CMA e DAPI, respectivamente. Setas indicam bandas CMA+, pontos mais claros em D e F indicam bandas DAPI+ e pontos mais escuros em B indicam bandas C. Barra=10 μ m.

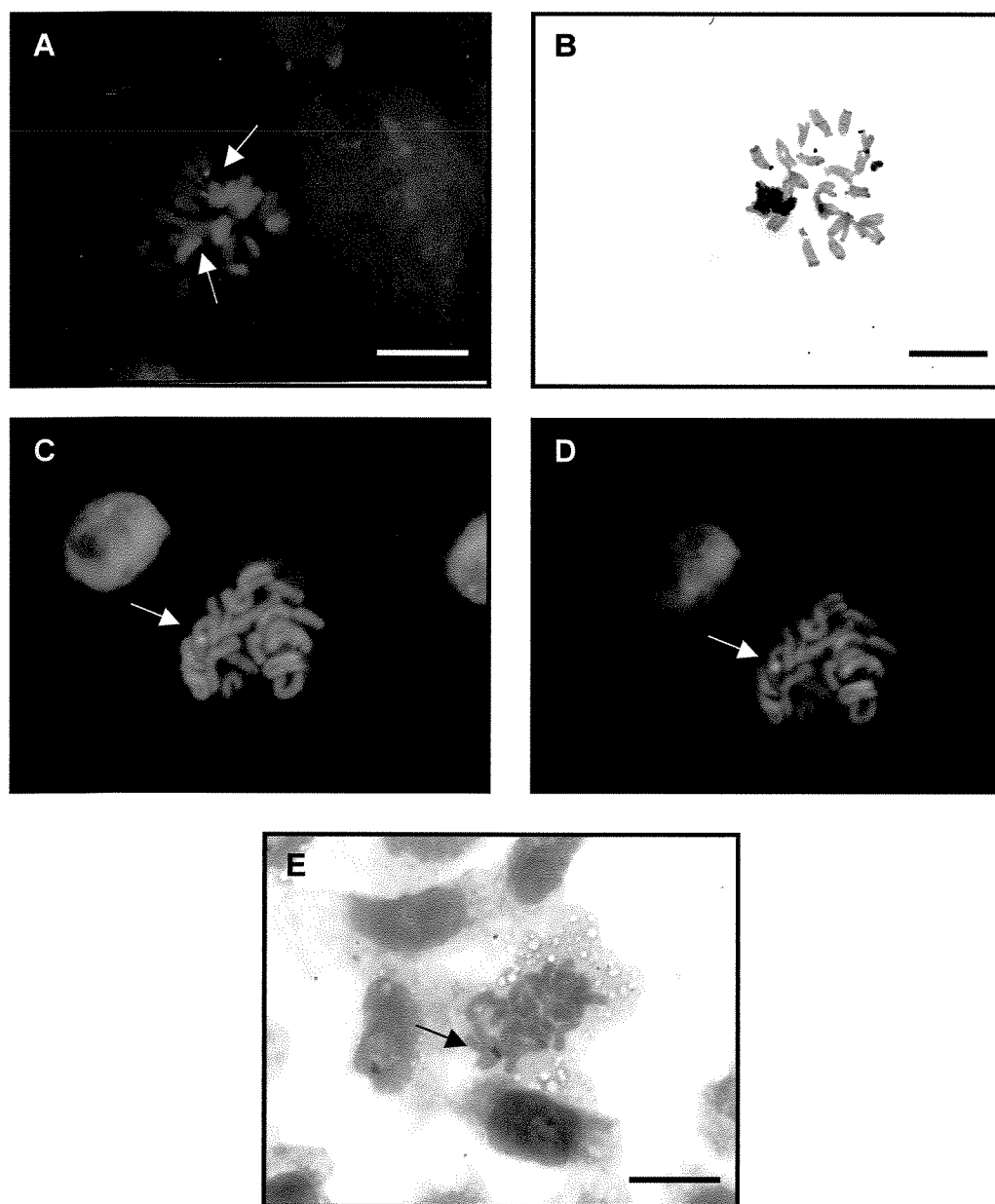


FIGURA 3: A e B) *Echinodorus macrophyllus*, hibridação *in situ* e bandamento C, respectivamente, setas indicam sítios de hibridação 45S DNAr, seta superior aponta três sítios e pontos mais escuros em B representam bandas C; C, D e E) *E. tennellus*, CMA , DAPI e banda C, respectivamente, setas indicam bandas positivas. Barra=10 μ m.

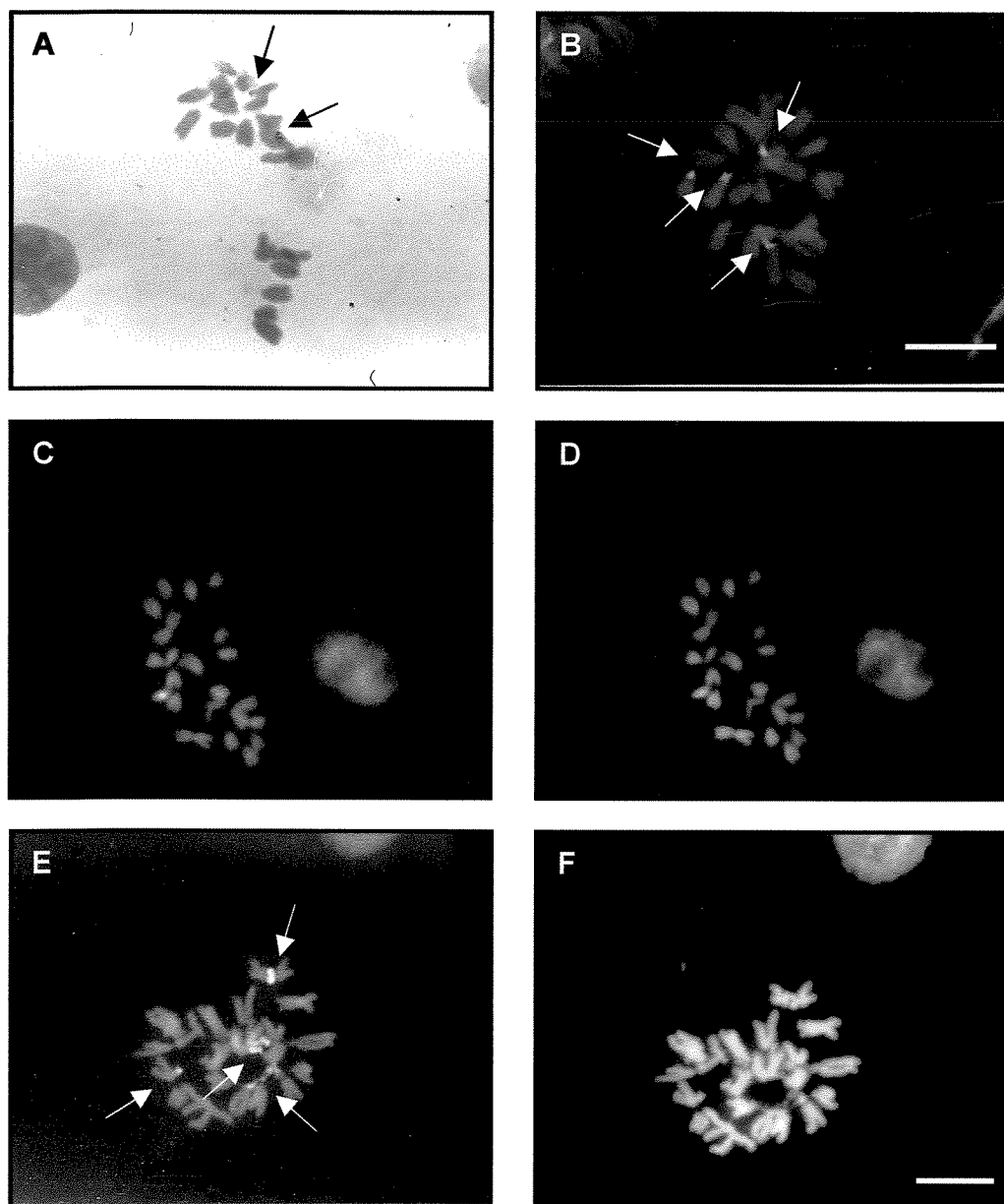


FIGURA 4: A, B, C e D) *Sagittaria montevidensis*, banda C, hibridação *in situ*, CMA e DAPI respectivamente, setas indicam bandas C e sítios de hibridação 45S; E e F) *S. rhombifolia*, CMA e DAPI respectivamente, população de Casa Branca, setas apontam bandas CMA+ . Barra=10μm.

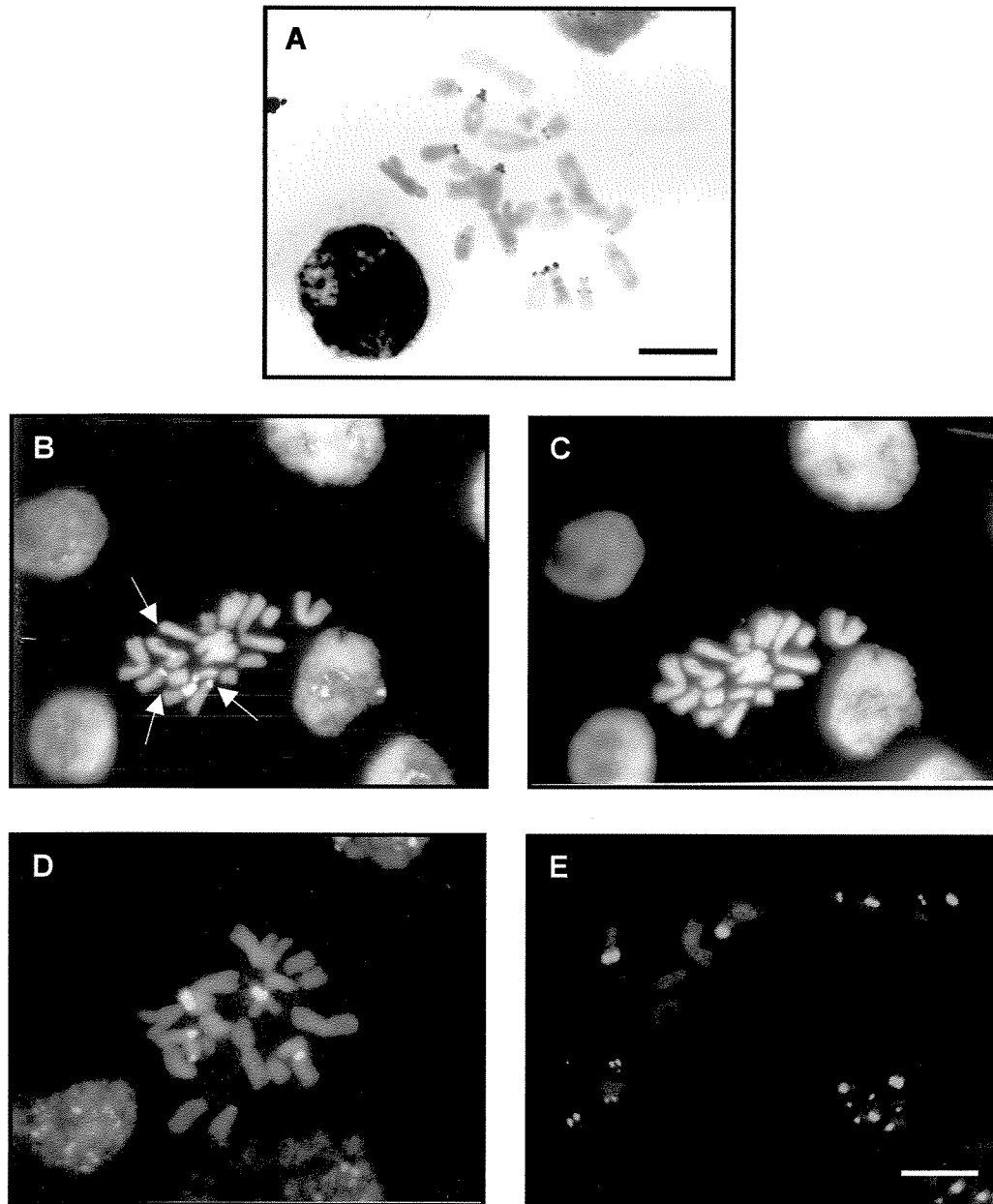


FIGURA 5: *Sagittaria rhombifolia*, A) Bandamento C, regiões mais escuras representam bandas C; B e C) CMA e DAPI respectivamente, população de Itirapina, setas apontam bandas CMA+ (seta à direita em B aponta três bandas) ; D e E) hibridação *in situ*, populações de Casa Branca e Itirapina, respectivamente, sítios 45S DNAr corados em amarelo. Barra=10 μ m.

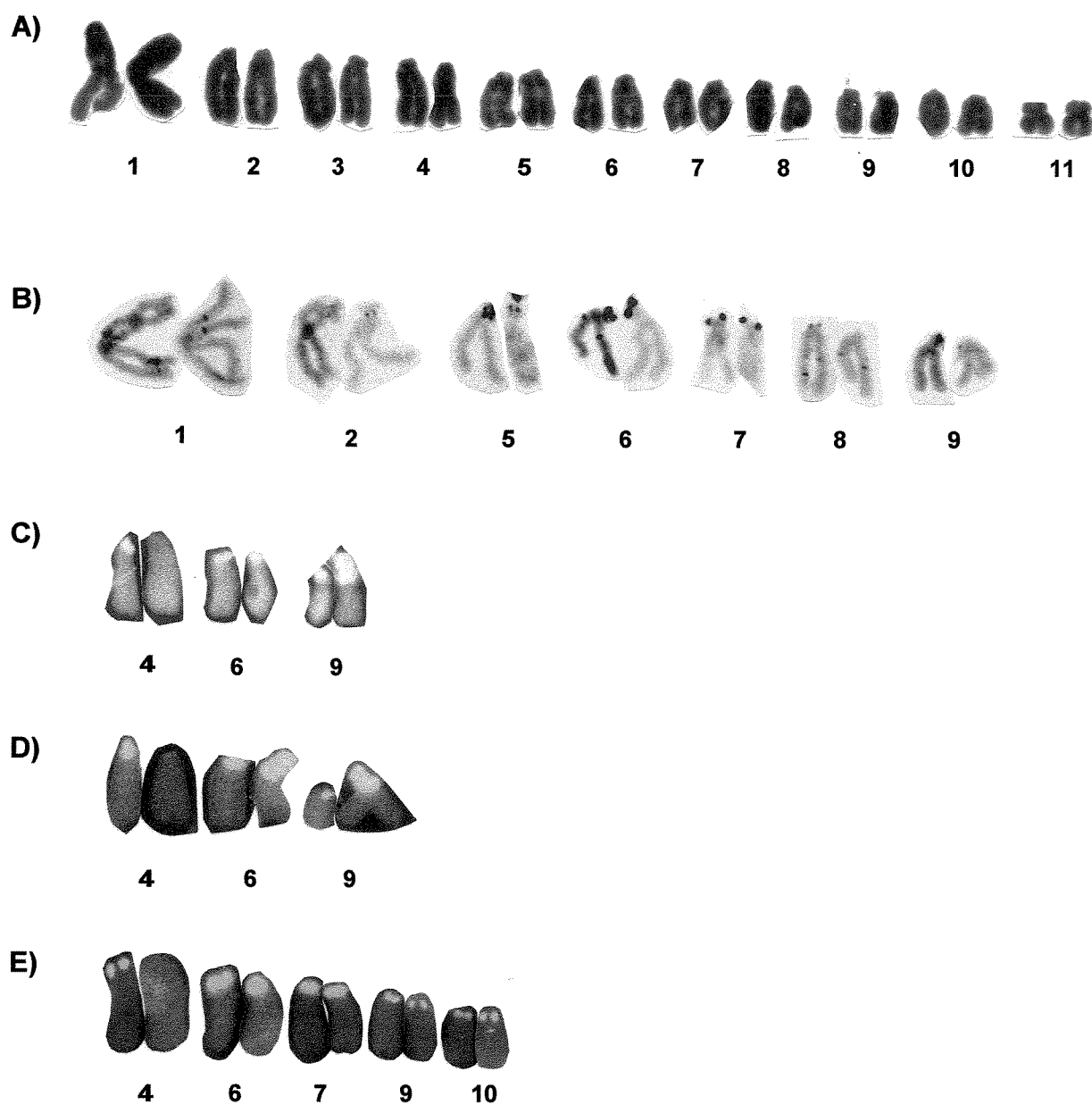


FIGURA 6: Cariótipos de *Sagittaria rhombifolia*, A) Coloração de Giemsa (COSTA, cap1), B) Bandamento C, C) bandamento CMA, D) Hibridação *in situ* (FISH) – população de Casa Branca e E) FISH – população de Itirapina.

DISCUSSÃO

Pode-se considerar que nas espécies da família Alismataceae estudadas, abrangendo os gêneros *Echinodorus* e *Sagittaria* do Brasil, a aplicação das técnicas de bandamento cromossômico (C, CMA e DAPI) e de hibridação *in situ* (45S DNAr) permitiu uma análise comparativa de seus cariótipos. Essas técnicas evidenciaram diferenças entre espécies que possuem cariótipos bastante semelhantes mediante a análise convencional: mesmo número cromossômico ($2n=22$) e padrão morfológico e de tamanho cromossômico (COSTA & FORNI-MARTINS 2002a).

Dentre as espécies estudadas, foram encontradas bandas DAPI+ apenas em *Echinodorus bolivianus*, *E. longipetalus*, *E. macrophyllus* e *E. tennellus*. A coincidência entre algumas bandas e a localização das mesmas nos bandamentos C e DAPI destas espécies sugere que algumas regiões de heterocromatina constitutiva nestas espécies são ricas em pares de bases AT. Esta coincidência entre os bandamentos C e DAPI foi encontrada também em orquídeas (KAO *et al.* 2001). Em uma revisão feita por GUERRA (2000), o autor estabelece que a técnica do bandamento C, associada à coloração com fluorocromos, foi reconhecida como sendo um método confiável para distinguir alguns tipos de heterocromatina em plantas, apesar de algumas regiões de bandas C reagirem de forma neutra com fluorocromos. O autor observou também que a heterocromatina (HC) mais caracteristicamente detectada com fluorocromos foi a NOR-HC, quase sempre CMA+ e DAPI-. Os resultados obtidos em *Sagittaria rhombifolia*, cujo satélite apresentado através da técnica convencional de Giemsa, no nono par cromossômico, foi confirmado como sendo região heterocromática pelo bandamento C e posteriormente corado positivamente para o fluorocromo CMA e negativamente para DAPI condizem com este padrão. Com a utilização da hibridação *in situ* para a região de 45S DNAr, uma técnica bastante confiável para reconhecimento da NOR-HC em plantas (GUERRA 2000), foi identificada novamente a NOR-HC no nono par cromossômico. Apesar de não ter sido visualizada, em forma de satélite, através de técnica convencional (COSTA

& FORNI-MARTINS 2002a), a NOR-HC provavelmente está presente também no sexto par cromossômico desta espécie por ter sido identificada neste par pela hibridação *in situ* (FIGURA 6).

Em *S. rhombifolia*, a grande semelhança entre as regiões coradas positivamente para o CMA e os sítios de DNAr encontrados na população de Casa Branca e Itirapina demonstra que todas as regiões CMA+ são compostas por DNAr, porém nem todos os sítios de DNAr foram corados positivamente para CMA (população de Itirapina). A existência de várias bandas-C em *Sagittaria rhombifolia*, não identificadas através de fluorocromos ou hibridação *in situ*, indica que as regiões de heterocromatina constitutiva nem sempre são compostas por regiões organizadoras do nucléolo ou repetitivas ricas em AT ou CG, o que pôde ser observado também em *Echinodorus longipetalus*.

Nas Alismatales, em geral, são raros os estudos envolvendo a diferenciação linear dos cromossomos, de forma que não há muitos padrões de comparação com os resultados aqui obtidos. Em um desses estudos, KENTON (1981) mostrou que em *Hydrocleys nymphoides* (Limnocharitaceae) as bandas C são encontradas apenas em um par cromossômico, envolvendo a região do satélite. Foi observado também que este par era normalmente heteromórfico, com um dos cromossomos apresentando dois ou três blocos fortemente corados separados por regiões menos densas, e o outro apresentando uma região Giemsa-positiva bem menor, o que foi também observado em *E. bolivianus*, *E. tennellus* e *S. rhombifolia*, no presente trabalho.

De um modo geral, para a família Alismataceae, os sítios de DNAr 45S parecem estar localizados preferencialmente nas regiões teloméricas dos braços curtos dos cromossomos e freqüentemente associados a satélites, sugerindo que estes satélites sejam em parte constituídos por DNAr, conforme observado para *Sagittaria rhombifolia*.

Em um estudo realizado por GUERRA *et al.* (2000), os aspectos de bandas heterocromáticas mostrou-se útil também para identificar padrões evolutivos dentro de alguns grupos. Ao estudar padrão de bandas heterocromáticas em Rutaceae, na subfamília Aurantioideae, os autores observaram que os gêneros mais basais dentro do grupo apresentam menores quantidades de heterocromatina do que os gêneros mais derivados, uma tendência também observada para outros gêneros como *Sesbania* Scop. (FORNI-MARTINS & GUERRA 1999), *Scilla* (GREILHUBER *et al.* 1981) e *Capsicum* (MOSCONE *et al.* 1996).

Não houve grande diferença entre padrões de bandas obtidos para os gêneros *Echinodorus* e *Sagittaria* estudados no presente trabalho. As maiores diferenças observadas ocorreram em nível inter-específico e até mesmo inter-populacional, no caso de *Sagittaria rhombifolia*, mas não inter-genérico; principalmente com relação às bandas C e DAPI. Deve-se ressaltar também a grande semelhança de padrão de bandas C, CMA e DAPI observadas entre as espécies *Echinodorus tennellus* e *E. bolivianus* (COSTA & FORNI-MARTINS 2002b).

Dessa forma, a análise de padrão de bandas C, CMA, DAPI e sítios de hibridação *in situ*, de uma maneira geral, demonstrou-se bastante útil para identificar diferenças, possivelmente diagnósticas, entre espécies; assim como semelhanças que poderiam indicar que estas estejam proximamente relacionadas.

BIBLIOGRAFIA

- COSTA, J. Y. & FORNI-MARTINS, E. R. **2002a**. Karyotypic studies of some brazilian species of *Alismataceae* Vent. In: *Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 11-29.
- COSTA, J. Y. & FORNI-MARTINS, E. R. **2002b**. Estudos cariotípicos em citótipos de *Echinodorus tennellus* (Martius) Buchenau (Alismataceae). In: *Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 31-44.
- CRONQUIST, A. **1988**. *The evolution and classification of flowering plants*. 2 ed. The New York Botanical Garden, New York.
- FORNI-MARTINS, E. R. & GUERRA, M. **1999**. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species (Fabaceae). *Caryologia* **52** (1-2): 97-103.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S. E. **1975**. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**: 37-50.
- GREILHUBER, J.; DEUMLING, B.; SPETA, F. **1981**. Evolutionary aspects of chromosome banding, heterochromatin, satellite DNA, and genome size in *Scilla* (Liliaceae). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **94**: 249-266.
- GUERRA, M. **2000**. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetis and Molecular Biology* **23** (4): 1029-1041.
- GUERRA, M.; SANTOS, K. G. B. dos; SILVA, A. E. B. e; EHRENDORFER, F. **2000**. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioidae – a case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* **87** (5): 735-747.
- HANSON, R. E. *et al.* **1996**. Distrubution of 5S and 18S-26S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* **105**: 55-61.
- HAYNES, R. R. & HOLM-NIELSEN, L. B. **1994**. *The Alismataceae. Flora Neotropica. Monograph* **64**. The New York Botanical Garden, New York.

- KAO, Y.Y.; CHANG S. B.; LIN T. Y.; HSIEH C. H.; CHEN Y. H.; CHEN W. H.; CHEN C. C. **2001**. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Annals of Botany* **87**(3): 387-395.
- KENTON, A. **1981**. A robertsonian relationship in the hromosomes of two species of *Hydrocleys*. *Kew Bulletin* **36**: 487-492.
- LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D. & LEITCH, I. J. **1994**. *In situ hibridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- MEHRA, P. N. & PANDITA, T. K. **1984**. Cytological studies of some Helobiales of Kashmir Himalayas I. Family Alismataceae. *Cytologia* **49**: 295-304.
- MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M.; EHRENDORFER, F. **1996**. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **202**: 37-63.
- PIGNONE, D.; D'EMERICO, S; GRÜNANGER, P & SCRUGLI, A. **1999**. Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe *Limodorinae* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **217**: 147-161.
- PICH, U.; FRITSCH, R. & SCHUBERT, I. **1996**. Closely related *Allium* species (Alliaceae) share a very similar satellite sequence. *Plant Systematics and Evolution* **202**: 255-264.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. **1980**. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* **134**: 239-297.
- SCHWEIZER, D. **1976**. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.
- SHEIKH, S. A. & KONDO, K. **1995**. Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *American Journal of Botany* **82** (10): 1278-1286.
- SUMMER, A. T. **1972**. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.

VOSA, C. G. **1985**. Plant chromosome banding and cytotaxonomy. In: *Tópicos de citogenética e evolução de plantas* (Aguiar-Perecin, M. L. R.; Martins, P. S.; Bandel, G.; eds.). Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.

CONCLUSÃO GERAL

As espécies de *Echinodorus* e de *Sagittaria* estudadas apresentaram número cromossômico constante, de $2n=22$, com cromossomos grandes, variando de 2,3 a $9,1\mu\text{m}$, e altos índices de assimetria (TF% entre 12,9 e 20,5), devido à alta frequência de cromossomos acrocêntricos. Este padrão cariotípico encontrado confirmou a maioria dos dados fornecidos em literatura. A comparação dos dados obtidos, com dados disponíveis para outros gêneros de Alismataceae, confirmou as tendências filogenéticas sugeridas através de análise do gene *rbcL* para o grupo, suportando, do ponto de vista citogenético, a inclusão da família Limnocharitaceae dentro de Alismataceae. Os procedimentos de bandamento e hibridação *in situ* (45S DNAr) realizados se mostraram, de maneira geral, eficientes para caracterização cariotípica das espécies, mas não demonstraram grandes diferenças entre os gêneros. A existência de citótipos poliplóides para a espécie *Echinodorus tennellus* foi pela primeira vez documentada, sendo inédita não só para o gênero, como para toda a família. A existência dos citótipos, assim como os dados obtidos através de bandamentos, mostraram que as espécies *E. tennellus* e *E. bolivianus*, estão proximamente relacionadas, merecendo estudos mais amplos.

BIBLIOGRAFIA GERAL

- BEAL, E. O. **1960**. The Alismataceae of the Carolinas. *Journal of Elishe Mitchell Scientific Society* **76** (1): 68-79.
- BERTÃO, M. R. **1998**. Caracterização citogenética de linhagens de milho (*Zea mays* L.) através de bandamento cromossômico e hibridação molecular "in situ". Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.
- BOLKHOVSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, T.; ZAKARYEVA, O. **1969**. *Chromosome numbers of flowering plants*. Academy of Sciences of the USSR.
- BROWN, W. V. **1946**. Cytological studies in the Alismaceae. *Bot Gaz.*, **108** (2): 262-267.
- BURSON, B.L. **1975**. Cytology of some apomitic *Paspalum* species. *Crop Science* **15**: 229-232.
- CHATIN, G. A. **1856**. Anatomie comparée des végétaux. *Plantes Aquatiques*. Bailliére, Paris.
- COLEMAN, J. R. & SMITH, L. B. **1969**. Chromosome numbers of some Brazilian angiosperms. *Rhodora* **71**: 548-551.
- COSTA, J. Y. & FORNI-MARTINS, E. R. **2002a**. Karyotypic studies of some brazilian species of Alismataceae Vent. In: *Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 11-29.
- COSTA, J. Y. & FORNI-MARTINS, E. R. **2002b**. Estudos cariotípicos em citótipos de *Echinodorus tennellus* (Martius) Buchenau (Alismataceae). In: *Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 31-44.
- COSTA, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. **2002**. Bandamento cromossômico e hibridação *in situ* em espécies de Alismataceae neotropicais. In: *Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo*. Tese de Mestrado. 46-69.
- CRONQUIST, A. **1988**. *The evolution and classification of flowering plants*. 2 ed. The New York Botanical Garden, New York.
- DAHLGREN, R. & CLIFFORD, V. **1981**. *The Monocotyledons: a comparative study*. Academic Press, New York.

- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, D. H. T.; YEO, P. F. **1985**. *The families of the Monocotyledons*. Springer-Verlag, Berlin.
- DARLINGTON, C. P. & WYLIE, A. P. **1945**. *Chromosome atlas of flowering plants*. George Allen & Unwin Ltd.
- FORNI-MARTINS, E. R. & CALLIGARIS, K. P. Chromosomal studies on Limncharitaceae (Alismatales). *Aquatic Botany* no prelo.
- FORNI-MARTINS, E. R. & GUERRA, M. **1999**. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species (Fabaceae). *Caryologia* **52** (1-2): 97-103.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E. **1990**. *Index to plant chromosome numbers 1986-1987*. V.30. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E. **1991**. *Index to plant chromosome numbers 1988-1989*. V.40. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E. **1994**. *Index to plant chromosome numbers 1990-1991*. V.51. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. **1984**. *Index to plant chromosome numbers 1979-1981*. V.8. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. **1988**. *Index to plant chromosome numbers 1984-1985*. V.23. Missouri Botanical Garden.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S. E. **1975**. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**: 37-50.
- GREILHUBER, J.; DEUMLING, B.; SPETA, F. **1981**. Evolutionary aspects of chromosome banding, heterochromatin, satellite DNA, and genome size in *Scilla* (Liliaceae). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **94**: 249-266.
- GREILHUBER, J. **1995**. Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In: RUDALL, P. J.; CRIBB, P. J.; CUTLER, D. F.; HUMPHRIES, C. J. (Editors). *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- GUERRA, M. **1983**. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* **35**: 190-193.

- GUERRA, M. **2000**. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* **23** (4): 1029-1041.
- GUERRA, M.; SANTOS, K. G. B. dos; SILVA, A. E. B. e; EHRENDORFER, F. **2000**. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – a case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* **87** (5): 735-747.
- GUERRA, M. S. **1986**. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética* IX **4**: 741 - 743.
- GUERRA, M. S. **1988**. *Introdução à citogenética geral*. Ed Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A. E.; CORNÉLIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W. S. **1997**. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics* **3** (20): 489-496.
- HANSON, R. E. *et al.* **1996**. Distribution of 5S and 18S-26S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* **105**: 55-61.
- HARADA, I. **1956**. Cytological studies in Helobiae-I. Numbers in seven families. *Cytologia* **21** (3): 306-328.
- HAYNES, R. R. & HOLM-NIELSEN, L. B. **1994**. *The Alismataceae. Flora Neotropica. Monograph* 64. The New York Botanical Garden, New York.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; PRESTON, C. D.; GORNALL, R. J. **1998**. Euploid and aneuploid evolution in *Potamogeton* (Potamogetonaceae): a factual basis for interpretation. *Aquatic Botany* **60**: 337-358.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. **1980**. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**: 1014 - 15.
- HUZIWARA, Y. **1962**. Karyotype analysis in some genera of compositae – VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* **49**: 116-119.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. **1999**. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.

- KAO, Y.Y.; CHANG S. B.; LIN T. Y.; HSIEH C. H.; CHEN Y. H.; CHEN W. H.; CHEN C. C. **2001**. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Annals of Botany* **87**(3): 387-395.
- KENTON, A. **1981**. A robertsonian relationship in the hromosomes of two species of *Hydrocleys*. *Kew Bulletin* **36**: 487-492.
- KRAHULCOVA, A. & JAROLIMOVA, V. **1993**. Ecology of two cytotypes of *Butomus umbellatus*: I. Karyology and breeding behaviour. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **28** (4): 385-411.
- KWEON, M. H.; PARK, M. K.; RA, K. S.; SUNG, H. C.; YANG, H. C. **1996**. Screening of anticoagulant polysaccharides from edible plants. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **39** (2): 159-164.
- LARSEN, K. **1963**. Studies in the flora of Thailand. 14. Cytological studies in vascular plants of Thailand. *Dansk Bot. Ark.*, **20** (3): 211-275.
- LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D. & LEITCH, I. J. **1994**. *In situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- LEPPER, L. **1982**. Beitrage zur chromosomen – Dokumentation cubanischer Pflanzensippen 4. *Revista del Jardin Botánico Nacional (Habana)* **3**: 71-102.
- LES, D. H. & HAYNES, R. R. **1995**. Systematics of Subclass Alismatidae: A Synthesis of Approaches. In: Rudall, P. J.; Cribb, P. J.; Cutler, D. F.; Humphries, C. J. (Editors). *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LES, D. H.; CLELAND, M.A.; WAYCOTT, M. **1997**. Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany* **22** (3): 443-463.
- MAESSEN, M.; ROELOFS, J. G. M.; BELLEMAKERS, M. J. S.; VERHEGGEN, G. M. **1992**. The effects of aluminium, aluminium/calcium ratios and pH on aquatic plants from poorly buffered environments. *Aquatic Botany* **43** (2): 115-127.
- MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; KOBAYASHI, G.; FUJIMURA, H.; KURAHASHI, K.; FUJIWARA, M. **1988**. Effect of alismol on adrenergic mechanism in isolated rabbit ear artery. *Japanese Journal of Pharmacology* **46** (4): 331-336.

- MEHRA, P. N. & PANDITA, T. K. **1979**. In: IOPB chromosome number reports LXIV. *Taxon* **28**: 405.
- MEHRA, P. N. & PANDITA, T. K. **1984**. Cytological studies of some Helobiales of Kashmir Himalayas I. Family Alismataceae. *Cytologia* **49**: 295-304.
- MOORE, R. J. **1973**. *Index to plant chromosome numbers 1967-1971*. International Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature.
- MORAWETZ, W. **1984**. Karyological races and ecology of the brazilian *Duguetia furfuracea* as compared with *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Flora* **175**: 195-209.
- MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M.; EHRENDORFER, F. **1996**. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **202**: 37-63.
- PANDITA, T. K. **1979**. *Cytological investigations of some monocots of Kashmir*. PhD Thesis, Chandigarh.
- PICH, U.; FRITSCH, R. & SCHUBERT, I. **1996**. Closely related *Allium* species (Alliaceae) share a very similar satellite sequence. *Plant Systematics and Evolution* **202**: 255-264.
- PIGNONE, D.; D'EMERICO, S.; GRÜNANGER, P. & SCRUGLI, A. **1999**. Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe *Limodorinae* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **217**: 147-161.
- RAMSON, J. K. & OELKE, E. A. **1988**. Common waterplantain, *Alisma plantago-aquatica*, control in wild rice, *Zizania palustris*, with MCPA and 2,4-D. *Weed Technology* **2** (3): 310-316.
- RAO, Y. S. **1953**. Karyo-systematic studies in Helobiales-I. Butomaceae. *Procedures of National Institute of Science, India* **19** (4): 503-581.
- RIVERA, I. G.; MARTINS, M. T. ; SANCHEZ, P.S.; SATO, M. I. Z.; COELHO, M. C. L.; AKISUE, M.; AKISUE, G. **1994**. Genotoxicity assesment through the Ames test of medicinal plants commonly used in Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality* **9** (2): 87-93.
- SARKAR, A. K. **1985**. Taxonomy of certain members of Helobiae as judged from a cytological standpoint. *Procedures of Indian Scientific Congress Associates* **72** (3-VI): 134-135.

- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. **1980**. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* **134**: 239-297.
- SCHWEIZER, D. **1976**. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.
- SCREMIN-DIAS, E. & BARROS, A. L. **2001**. Análise comparativa da folha de duas variedades de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli, em ambientes distintos: Pantanal e Bonito, Mato Grosso do Sul. *Caderno de Resumos do 52º Congresso Nacional de Botânica*. João Pessoa, Pernambuco, p 106.
- SCREMIN-DIAS, E.; POTT, V. J.; HORA, R. C. da; SOUZA, P. R. de. **1999**. *Nos jardins submersos da Bodoquena*. 1ª ed. Editora UFMS, Campo Grande.
- SHAD, R. A. & KHAN, R. **1988**. Weed-crop competition in transplanted wetland rice. *Pakistan Journal of Agricultural Research* **9** (1): 37-40.
- SHARMA, A. K. & CHATTERJEE, M. T. **1967**. Cytotaxonomy of Helobieae with special reference to the mode of evolution. *Cytologia* **32**: 286-307.
- SHARMA, A. K. & SHARMA, A. **1980**. *Chromosome Techniques: Theory and Practice*. 3ªed. Butterworth & Co (Publishers) Ltd.
- SHEIKH, S. A. & KONDO, K. **1995**. Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *American Journal of Botany* **82** (10): 1278-1286.
- SHIMIZU, N.; OHTSU, S.; TOMODA, M.; GONDA, R.; OHARA, N. **1994**. A glucan with immunological activities from the tuber of *Alisma orientale*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **17** (12): 1666-1668.
- SIDORSKII, A. G.; BARANOV, G. G.; LEPILOV, A. V.; KOPEIN, O. I.; KORNILOV, S. N.; YAKIMOVYU, A. **1991**. Using a bioindicator to evaluate the ecological state of a river for a long time. *Ekologiya (Sverdlovsk)* **0** (4): 15-19.
- SILVAROLLA, M. B. & AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. **1994**. Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. *Revista Brasileira de Genética* **17** (2): 237-242.

- STEBBINS, G. L. JR. **1950**. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York and London.
- SUMMER, A. T. **1972**. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
- TAYLOR, W. R. **1925**. Chromosome constrictions as distinguishing characteristics in plants. *American Journal of Botany* **12** (4): 238-244.
- TOMLINSON, P. B. **1982**. *Anatomy of monocotyledons. VII. Helobiae (Alismatidae)*. Clarendon Press, Oxford.
- UCHIYAMA *et al.* **1989**. Karyomorphological studies on some taxa of the Helobiae. *Journal of Science Hiroshima University, Ser B, Div. 2, Botanic* **22**: 271-352.
- VOSA, C. G. **1985**. Plant chromosome banding and cytotaxonomy. In: *Tópicos de citogenética e evolução de plantas* (Aguiar-Perecin, M. L. R.; Martins, P. S.; Bandel, G.; eds.). Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.
- WOOTEN, J. W. **1986**. Variations in leaf characteristics of six species of *Sagittaria* (Alismataceae) caused by various water levels. *Aquatic Botany* **23**: 321-327.
- ZACHRITZ II, W. H. & FULLER, J. W. **1993**. Performance of an artificial wetlands filter treating facultative lagoon effluent at Carville, Louisiana. *Water Environment Research* **65** (1): 46-52.