

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**OS CROMOSSOMOS HOLOCÊNTRICOS DE *Rhynchospora* Vahl (CYPERACEAE):
EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA E DIVERSIDADE DE SEQUÊNCIAS SATÉLITES**

TIAGO RIBEIRO BARROS DOS SANTOS

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

OS CROMOSSOMOS HOLOCÊNTRICOS DE *Rhynchospora* Vahl (CYPERACEAE):
EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA E DIVERSIDADE DE SEQUÊNCIAS SATÉLITES

Tese apresentada por Tiago Ribeiro Barros dos Santos
ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Pernambuco, como um dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor em
Biologia Vegetal, área de concentração Sistemática e
Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Pedrosa-Harand
(Dept. de Botânica, UFPE)

Co-orientador: Prof. Dr. André L. L. Vanzela (Dept. de
Biologia Geral, UEL)

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Tiago Ribeiro Barros dos
Os cromossomos holocêntricos de *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae): evolução
cariotípica e diversidade de sequências satélites/Tiago Ribeiro Barros dos
Santos. – Recife: O Autor, 2016.
91 f.: il.

Orientadores: Andrea Pedrosa-Harand, André L. L. Vanzela
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Genética vegetal 2. Plantas – Variação 3. Cromossomos vegetais I.
Pedrosa-Harand, Andrea(orient.) II. Vanzela, André L. L. (coorient.)
III. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-140

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

OS CROMOSSOMOS HOLOCÊNTRICOS DE *Rhynchospora* Vahl (CYPERACEAE):
EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA E DIVERSIDADE DE SEQUÊNCIAS SATÉLITES

Aprovado em 04/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrea Pedrosa Harand, Dept. de Botânica, CCB, UFPE

Profa. Dr. Reginaldo de Carvalho, Dept. de Biologia, UFRPE

Profa. Dra. Vilma Loreto, Dept. de Genética, CCB, UFPE

Prof. Dra. Ana Emília Barros e Silva, Departamento de Ciências Biológicas, UFPB

Profa. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, Dept. de Botânica, CCB, UFPE

*“Success is not final, failure is not fatal: it is the
courage to continue that counts.”*

Agradecimentos

Quatro anos se passaram e chego ao fim de mais uma etapa de minha vida acadêmica. Gostaria de expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que estiveram envolvidas direta ou indiretamente na realização do meu doutorado.

Aos meus familiares, em especial ao meus pais Antônio e Fátima, por sempre estarem ao meu lado em todas as minhas decisões e pelo suporte nos mais variados momentos!

À Andrea, pela excepcional orientação e suporte ao longo de todos esses anos. Sou muito grato por todo o auxílio e conselhos durante o IC, mestrado e doutorado. Muito obrigado!

Aos “*pés vermelhos*” pela receptividade durante minhas duas curtas passagens por Londrina. Ao André Vanzela e todos do laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal da UEL (Vanessa, Adriano e Fabíola) e ao Luis Filipe e todo o pessoal do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR. Especial agradecimento vai para Sandra e Lucinéia, por estarem sempre disponíveis durante as incansáveis e sofridas tentativas de construção da biblioteca de BACs.

Ao Andreas Houben e todos do grupo CSF/IPK pela excelente atmosfera de trabalho em terras germânicas. À Oda Weiss, Katrin Kumke e Karla Meier por todo o auxílio técnico e à Lala Aliyeva pelas dicas sobre *single-copy* FISH.

Aos antigos e atuais membros do Laboratório de Citogenética Vegetal pelos momentos compartilhados ao longo desses oito anos. Provavelmente esqueci alguém!

Velha guarda: Lili, Artur, Gabi, Joana, Eliene, Silvokleio, Lidianne, T. Esposito, Magdalena (Magdaaaaaa), Marianita, Lucas, Sandra Mendes, André, Gustavo

Jovem guarda: criatura (Thallitha), Marcus, Dani, Álex, Jéssica, Carol, Mariela, Brena

Agregados: Bruno, Géssica (“barraqueira científica”), Elivânia

Aos funcionários do PPGBV (Adriano, Hildebrando e Soraia) pela ajuda nos momentos burocráticos.

Às fundações de fomento (FACEPE e CAPES) pelo auxílio financeiro durante a realização do projeto.

Muito obrigado!!!

Resumo

Cromossomos holocêntricos apresentam atividade cinetocórica difusa e essa organização favorece, em teoria, rápidas variações cromossômicas numéricas e o acúmulo de DNA satélite (DNAsat) predominantemente nas regiões terminais dos cromossomos. O gênero de plantas *Rhynchospora* (Cyperaceae), um dos diversos grupos com esse tipo cromossômico, apresenta espécies com cariótipos entre $2n = 4$ e $2n = 58$, cuja variação é atribuída à poliploidia e a eventos de quebra/fusão, levando a disploidias. Quanto à distribuição de DNAsat, o único relato até o momento revelou uma baixa proporção dessas sequências, com o único *repeat* identificado (Tyba) associado aos holocentrômeros. Com o intuito de entender como a estrutura centromérica difusa interfere na organização de sequências ao longo do cromossomo e na evolução do cariótipo como um todo, foram realizadas uma análise de reconstrução dos números cromossômicos ancestrais de *Rhynchospora* em um contexto filogenético e a caracterização de DNAsats em três espécies do gênero. O complemento cromossômico $2n = 10$ foi indicado como o mais provável para o ancestral do gênero, tendo sido mantido em diferentes taxa. A maioria dos clados mostrou números estáveis e a homoplasia de cariótipos foi observada em uma frequência relativamente baixa. Os genomas de *R. ciliata*/*R. globosa* e *R. tenuis* apresentaram duas e uma família(s) de DNAsat, respectivamente, com um padrão de condensação típico (blocos condensados em intérfase). Uma localização preferencial nos terminais cromossômicos foi observada apenas para os DNAsat de *R. globosa*. Três tipos de cromatina foram revelados pela distribuição dessas sequências: (1) associadas à heterocromatina e presente na forma de cromocentros em intérfase e blocos nos cromossomos metafásicos (*R. ciliata* e *R. globosa*); (2) compactados em interfase mas parcialmente descondensados em metáfase e não diretamente associados à heterocromatina (*R. ciliata* e *R. tenuis*); ou (3) associados aos holocentrômeros (*R. ciliata* e *R. tenuis*). De forma geral em *Rhynchospora*, os eventos de fusão e fissão parecem atuar localmente no remodelamento dos cariótipos e as sequências satélites não mostram uma tendência única de distribuição. A estrutura centromérica difusa, portanto, não determina em larga escala a dinâmica evolutiva dos cromossomos do gênero.

Palavras-chave: conteúdo de DNA, cromossomos holocêntricos, disploidia, DNA ribossomal, DNA satélite, fissão, fusão, poliploidia, reconstrução de número cromossômico

Abstract

Holocentric chromosomes show diffuse kinetochore activity, what would lead to fast evolution of chromosome numbers and a biased distribution of satellite repeats. The plant genus *Rhynchospora* (Cyperaceae) possesses holocentric chromosomes and shows a large chromosome number variation ($2n = 4$ to $2n = 58$) attributed to polyploidy and frequent fusion/fission events, leading to dysploidy. Regarding satellite repeats (satDNA), the only investigated species showed a low proportion of these sequences, with the single family identified associated to the holocentromeres. In the present work, aiming to better understand how the diffuse centromere organisation could interfere with the distribution of satellite repeats along the chromosomes and with the karyotype evolution as a whole, we combined a reconstruction of *Rhynchospora* chromosome numbers in a phylogenetic framework and the characterisation of satellite repeats in three selected species. The karyotype with $2n = 10$ was suggested as the ancestral state and was maintained in different lineages. Most of the clades showed stable chromosome number and recurrent karyotypes changes (leading to homoplasies) were detected in low frequency. All *Rhynchospora* species analysed (*R. ciliata*, *R. globosa* and *R. tenuis*) showed a higher diversity of satellite repeats than *R. pubera*, with most of the repeats showing a typical condensation profile (clustered in interphase). A preferential terminal location on chromosomes was only observed for *R. globosa* satDNAs. These sequences, however, might represent different chromatin types, organized in distinct ways: (1) associated to the heterochromatin and clustered in interphase and metaphase (identified in *R. ciliata* and *R. globosa* only); (2) clustered in interphase but partially decondensed in metaphase and not associated to heterochromatin domains (*R. ciliata* e *R. tenuis*); (3) associated to the holocentromeres (*R. ciliata* e *R. tenuis*). Taken together, at least for *Rhynchospora*, fusion/fission events may not act in a broader way in the reshuffling of karyotypes and satellite repeats distribution do not appeared to be biased towards the chromosome termini. A non-localized centromere, therefore, must not constrain, in a large scale, the chromosome evolution of the genus.

Keywords: DNA C-value, dysploidy, polyploidy, chromosome number reconstruction, holocentric chromosomes, fusion, fission, ribosomal DNA, satellite DNA

Sumário

Lista de tabelas e figuras.....	9
Apresentação.....	11
Fundamentação teórica.....	14
Referências.....	30
Capítulo 1: Cromossomos holocêntricos estão condenados à mudança? Variação cromossômica limitada no gênero <i>Rhynchospora</i> Vahl (Cyperaceae).....	38
Capítulo 2: Mapeamento citogenético de DNAs satélites revela uma complexa organização da cromatina no gênero holocêntrico <i>Rhynchospora</i> Vahl (Cyperaceae).....	59
Conclusões.....	86
Anexos.....	89

Lista de tabelas e figuras

Capítulo 1

Tabela 1. Caracterização do tamanho do genoma (valor 2C) e/ou distribuição dos sítios de DNA ribossomal (DNAr) em espécies selecionadas de <i>Rhynchospora</i>	48
Figura 1. Reconstrução do número cromossômico ancestral para o gênero <i>Rhynchospora</i> . Números cromossômicos diploides correspondentes aos círculos coloridos são descritos no quadro no canto inferior esquerdo. A localização aproximada dos sítios de DNAr (5S em vermelho e 45S em verde), assim como tamanho de genoma, são apresentados para espécies selecionadas. Relações filogenéticas foram baseadas em Buddenhagen et al. (in press), Thomas <i>et al.</i> , (2009) e Buddenhagen et al., (dados não publicados). Asteriscos denotam informações sobre o DNAr retiradas de dados publicados (ver Tabela suplementar 1 para maiores detalhes).....	49
Figura 2. Distribuição dos sítios de DNAr em cromossomos metafásicos de espécies de <i>Rhynchospora</i> . Cabeças-de-seta apontam os sítios de DNAr 45S (verde), enquanto as setas indicam os cromossomos com DNAr 5S (vermelho) em casos específicos. Os números cromossômicos, bem como a posição dos sítios (t = terminal, i = intersticial), também são indicados. Barra em f = 5 µm.....	50
Tabela suplementar 1. Sumário dos números cromossômicos e distribuição dos sítios de DNA ribossomal (DNAr) publicados para <i>Rhynchospora</i>	55
Figura suplementar 1. Metáfases de <i>R. globosa</i> (2n = 50), <i>R. elatior</i> (2n = 12) e <i>R. radicans</i> (2n = 10) coradas com DAPI. Barra = 5 µm.....	58

Capítulo 2

Tabela 1. Proporções genômicas de SatDNAs em espécies de <i>Rhynchospora</i>	72
Figura 1. Distribuição do DNA satélite centromérico Tyba em diferentes estágios celulares de <i>R. ciliata</i> e <i>R. tenuis</i> . (a, d) núcleos interfásicos mostrando marcação dispersa; (b, e) prometáfase com cromátides replicadas e (c, f) metáfase mostrando Tyba com uma distribuição linear. Barra em f = 5 µm. Insertos em c e f mostram um cromossomo selecionado em maior aumento.....	73
Figura 2. Localização comparativa de repeats não centroméricos em <i>R. ciliata</i> . RcSAT2 (vermelho) e RcSAT20 (verde) apresentam distribuição em blocos no núcleo interfásico (b e c) e metáfase (e e f), mas ocupam distintos domínios (a e d). Adicionalmente, RcSAT20 se	

apresenta parcialmente descondensado em metáfase. Área destacada em **d** é mostrada em maior aumento (**g, h e i**).....74

Figura 3. Distribuição cromossômica dos repeats mais abundantes de *R. globosa* em microscopia de alta resolução. *RgSAT1* (**b, e**) e *RgSAT2* (**c, f**) sobreposto ao DAPI (azul) em cromossomos interfásico (**a-c**) e metafásicos (**d-f**), mostrando a localização preferencial nos cromocentros (**a-c**) e nos terminais cromossômicos (**d-f**). Barra em **f** = 5 µm. Caixas (**a-c**) destacam alguns cromocentros onde os sinais de ambas as sequências mostram padrão complementar de marcação.....75

Figura 4. Cromossomos interfásicos (**a**) e metafásicos (**b**) de *R. tenuis* mostrando a distribuição do *RtSAT239*. Barra em **b** = 5 µm.....76

Figura 5. Dinâmica de DNAs satélites durante a condensação cromossômica em espécies de *Rhynchospora*. As sequências foram hibridizadas nos cromossomos de *R. ciliata*, *R. globosa* ou *R. tenuis* e mostraram diferentes padrões de condensação como visualizado para Tyba (vermelho), *RcSAT2* (azul), *RgSAT1/2* (verde) e *RcSAT20/RtSAT239* (laranja).....77

Tabela suplementar 1. Lista de primers usados para amplificar os diferentes DNAs satélites de *R. ciliata* e *R. tenuis*.....82

Figura suplementar 1. Análise por *Dot plot* mostrando a organização dos DNAs satélites identificados nas espécies de *Rhynchospora*. A unidade de repetição é indicada como uma barra nos casos em que foi possível determiná-la.....83

Figura suplementar 2. Cariograma de quatro metáfases selecionadas de *R. tenuis* ($2n = 4x = 8$) mostrando o padrão de marcação contrastante do *RtSAT239* entre cromossomos homólogos. Barra = 5 µm.....84

Figura suplementar 3. Padrão de distribuição comparativo para *RcSAT2* (**a, d**), *RcSAT20* (**b**) e DNAr 45S (**d**) em *R. ciliata*. Em **c**, os cromossomos foram organizados em dois grupos baseado no número de sinais de *RcSAT2*: esquerda (até 4 blocos maiores) e direita (mais que 4 blocos). Em **e**, os quatro cromossomos com sítios de DNAr 45S foram separados para permitir uma melhor comparação do padrão de marcação do *RcSAT2*. Barra = 5 µm.....85

1. Apresentação

Cromossomos holocêntricos são encontrados em diversos grupos de plantas e animais, tendo surgido independentemente várias vezes ao longo da evolução. Eles diferem estruturalmente dos monocêntricos por não apresentarem um centrômero localizado. A atividade cinetocórica está distribuída ao longo de quase todo o seu comprimento, fazendo com que os microtúbulos se associem de forma difusa em toda a extensão cromossômica e as cromátides migrem de forma paralela em anáfase (Melters et al., 2012).

A organização centromérica diferenciada encontrada nos holocêntricos permite que fragmentos cromossômicos gerados de quebras ou de fusões mantenham sua viabilidade e gerem variações cromossômicas numéricas estáveis numa escala de tempo rápida. Estes mecanismos, denominados agmatoploidia (fissão) e simploidia (fusão), têm sido sugeridos como mediadores da evolução cariotípica nesses grupos e sua alta dinamicidade poderia levar à ocorrência de números cromossômicos similares em grupos de espécies não relacionadas (Luceño et al., 1996).

O gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae) possui uma distribuição neotropical e é composto por mais de 200 espécies (Judd et al., 2009). Diversas análises citotaxonômicas foram realizadas com representantes brasileiros e, por isso, registros cromossômicos numéricos estão disponíveis para uma parte deles. A variação observada vai desde $2n = 4$ (*R. tenuis*) a $2n = 58$ (*R. globosa*), com diferentes espécies apresentando o mesmo número ou diferindo por poucos cromossomos (ver, por exemplo, Vanzela et al., 2000). Considerando a organização do cromossomo holocêntrico e sua evolução por meio de eventos de fusão e fissão, possivelmente recorrentes, uma grande variação nos números cromossômicos seria esperada e espécies não relacionadas poderiam convergir em número cromossômico. Portanto, seria esperada uma grande fração de cariótipos homoplásicos. A análise desses dados em um contexto filogenético, que poderia confirmar essa suposição, entretanto, não foi realizada até o momento em *Rhynchospora*. O que tem limitado o entendimento do papel da fusão/fissão na evolução cariotípica do grupo.

Além de influenciar os mecanismos evolutivos, a holocentricidade interfere na estrutura e organização cromossômica. Por exemplo, foi proposto que holocêntricos não teriam sequências centroméricas, e que as RONS e os DNA satélites seriam preferencialmente terminais (ver, por exemplo, Heckmann et al., 2011; 2013). Por outro lado, em um estudo genômico realizado recentemente em *Rhynchospora pubera* foi confirmada a presença de um centrômero difuso, e também a existência de um DNA satélite associado a essa região. O *repeat*, denominado Tyba, foi o único DNA satélite presente no genoma desta espécie, tendo

sido identificado por FISH também em *R. ciliata* e *R. tenuis*. Tyba mostrou uma dinâmica de condensação atípica em relação a outros DNAs satélites, com sinais dispersos no núcleo interfásico. Ao longo do progresso de condensação cromossômica esses sítios se associam até formar uma estrutura em forma de linha longitudinal, associada ao sulco centromérico em metáfase (Marques et al., 2015). A identificação de Tyba como único satélite no genoma de *R. pubera*, bem como sua presença em outras espécies de *Rhynchospora* levanta os seguintes questionamentos: (1) se outros *repeats* podem estar presentes nos genomas de outras espécies de *Rhynchospora* (2) se os mesmos também estariam associados aos holocentrômeros e (3) qual seria a dinâmica de condensação dos mesmos ao longo do ciclo celular em mitose.

No presente trabalho, a evolução cariotípica em espécies com cromossomos holocinéticos foi melhor investigada utilizando como modelo o gênero de plantas *Rhynchospora* (Cyperaceae). As espécies foram avaliadas em dois diferentes aspectos: i) números cromossômicos em um contexto filogenético e ii) caracterização de sequências satélites, visando entender como a presença de uma estrutura centromérica difusa interfere na forma de organização de *repeats* satélites e nos eventos de variação cromossômica numérica.

2. Fundamentação teórica

2.1. Cromossomos monocêntricos, holocêntricos e (meta)policêntricos: conceito e distribuição

A cromatina nuclear consiste na associação de moléculas lineares de DNA e proteínas, em estruturas altamente condensadas denominada cromossomos. De forma geral, os cromossomos são caracterizados pela presença de uma região menos condensada, a constrição primária ou centrômero, sendo denominados monocêntricos, cromossomos com unidade centromérica simples. Esta estrutura serve como local de associação dos microtúbulos durante as divisões celulares e sua posição ao longo do cromossomo permite categorizá-los em metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e telocêntricos (Bickmore, 2001; Alberts et al. 2002; Sumner, 2002).

A presença de uma estrutura centromérica alternativa, entretanto, parece ter surgido diversas vezes ao longo da evolução. Espécies com centrômero difuso (holocêntricos ou holocinéticos), com cromossomos em forma de bastão e exibindo atividade centromérica ao longo de quase toda a superfície lateral dos mesmos, têm sido descritas em invertebrados (ex. *Ceanorhabditis elegans*), insetos (ex. borboletas), aracnídeos e diversos grupos de plantas (ex. Cyperaceae e Juncaceae) (revisado por Melters et al. 2012). Mais recentemente, contrações primárias mais alongadas e formadas por distintos domínios centroméricos foram identificadas em cromossomos de algumas espécies de leguminosas (*Pisum* e *Lathyrus*). Os chamados cromossomos (meta)policêntricos foram sugeridos, então, como um estado intermediário entre as duas organizações de centrômero (monocêntricos e holocêntricos) largamente conhecidas em plantas e vem sendo estudados em maiores detalhes (Neumann et al. 2012; Neumann et al. 2015).

Em geral, a cromatina centromérica apresenta uma composição diversa quando comparado diferentes organismos. Do ponto de vista protéico, esta cromatina mostra-se bastante conservada e distinta da heterocromatina pericentromérica pela presença de uma variante da histona H3, denominada CENH3 (CENP-A em mamíferos e Cid em *Drosophila*). Esta histona substitui a forma canônica da H3, formando um tipo especializado de nucleossomo essencial para a montagem da estrutura do cinetócoro. Quanto às sequências de DNA, entretanto, os centrômeros se mostram bastante variáveis em complexidade e organização. Enquanto em organismos mais simples essa região é formada por sequências únicas ou em baixo número de cópias, nos eucariotos superiores os centrômeros tendem a ser ricos em elementos repetitivos, principalmente retrotransposons centroméricos (*Centromeric*

Retrotransposons - CR) e DNAs satélites (Sumner, 2002; Kamakaka e Biggins, 2005; Ma et al., 2007).

2.2. Sequências satélites: conceito, organização e distribuição

Tais sequências foram inicialmente identificadas como uma fração redundante do genoma que formava uma banda satélite, quando o DNA genômico total era separado por centrifugação em um gradiente de Cloreto de Césio (CsCl) (Cooney e Matthews, 1984). As sequências de DNA satélites (satDNA ou *repeats*) têm sido cada vez mais descritas como um importante componente dos genomas eucarióticos. As mesmas são caracterizadas pela presença de uma unidade de repetição básica (monômero), repetida diversas vezes uma adjacente a outra, numa organização denominada *head-to-tail*, ou seja, orientadas na mesma direção. De tamanhos variáveis, elas podem ser encontradas em diferentes regiões cromossômicas, e exercem papéis importantes na estrutura do centrômero (Ma et al., 2007), além de representar a forma de organização dos genes codificantes para RNA ribossomal 5S e 45S (ver Sharma e Raina, 2005).

DNAs satélites são tipicamente heterocromáticos, de replicação tardia e localizados em associação com os cromocentros nos núcleos interfásicos. Com a progressão do ciclo celular, o padrão de condensação em blocos é mantido e, em espécies com cromossomos monocêntricos, essas sequências têm sido identificadas nos pericentrômeros, subtelômeros e também ao longo dos braços cromossômicos, com diferentes famílias coabitando os mesmos domínios (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998). Em *Silene latifolia*, por exemplo, quatro diferentes *repeats* são os principais componentes dos subtelômeros (Kazama et al. 2006); enquanto uma mesma família está presente nas regiões pericentroméricas e subteloméricas em *Phaseolus microcarpus* (Ribeiro T, 2012).

Para organismos com cromossomos holocêntricos, os estudos têm revelado um padrão de condensação similar ao encontrado em monocêntricos. No gênero *Luzula* (Juncaceae) diferentes *repeats* foram identificados e caracterizados em *L. nivea* (Haizel et al. 2005) e *L. elegans* (Heckmann et al. 2013). Embora divergentes quanto à composição e número de cópias, todas as sequências foram mapeadas como blocos em núcleos interfásicos e ao longo dos cromossomos metafásicos. Em *L. elegans* algumas delas foram inclusive úteis como marcadores específicos para os três pares cromossômicos dessa espécie (Heckmann et al. 2013). Utilizando-se de uma abordagem de identificação distinta, Bardella e colaboradores

(2014) mapearam diferentes *repeats* como *clusters* subterminais nos cromossomos de *Triatoma infestans* (Heteroptera), colocalizados com a heterocromatina. Da mesma forma, no afídeo da batata (*Myzus persicae*; Hemiptera), bandas heretocromáticas intercalares presentes ao longo do cromossomo X correspondem a um DNA satélite de 160 pb (Mandrioli et al. 1999).

Análises recentes realizadas em uma espécie do gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae) (Marques et al., 2015), entretanto, sugerem que a distribuição de DNAs satélites parece não apresentar um padrão único entre espécies com holocêntricos. *Rhynchospora pubera* apresentou um genoma pobre em DNAs satélites, com apenas uma sequência identificada (4% do genoma). O *repeat* denominado Tyba, ocorre na forma de duas subfamílias bastante conservadas (78% de similaridade) e mostra uma organização cromossômica bastante distinta daquelas famílias já identificadas em espécies com monocêntricos e holocêntricos. Os sinais de hibridização aparecem de forma dispersa no núcleo interfásico e se condensam de forma progressiva até se agruparem como uma linha longitudinal ao longo dos holocentrômeros em cromossomos metafásicos. Análises mais detalhadas demonstraram a interação dessa sequência com a proteína centromérica (CENH3), confirmando se tratar de um DNA satélite centromérico (Marques et al., 2015).

2.3. Evolução de DNAs satélites

Conhecidos como elementos de rápida evolução no genoma, os DNAs satélites mostram uma ampla variação quanto à sua organização e distribuição, mesmo entre grupos intimamente relacionados. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a evolução dessas sequências em eucariotas, assumindo que a unidade de repetição básica (monômero) está continuamente sob modificação. Os arranjos podem variar bastante em tamanho, em decorrência de fenômenos de amplificação/contração (desamplificação) por meio de eventos como *crossing-over* desigual, replicação *slippage* e replicação saltatória ou em círculo rolante (Brutlag, 1980; Charlesworth, 1994; Plohl et al., 2012)

O modelo do *crossing-over* desigual prevê a troca de segmentos dos arranjos de *repeats* entre cromossomos homólogos ou entre cromátides irmãs (*sister chromatid exchange*) de forma desequilibrada após pareamento errôneo. O resultado é a rápida mudança quantitativa na sequência, com a formação de recombinantes com o arranjo mais curto ou mais longo em comparação com o parental (Charlesworth, 1994). O escorregamento da polimerase III durante a replicação do DNA, conhecido como replicação *slippage*, é um

fenômeno semelhante de variação quantitativa. Nesse caso, a enzima, juntamente com a fita de DNA nascente, se desassocia da fita molde, devido à interação com proteínas específicas. A retomada da replicação ocorre posteriormente em uma unidade de repetição a montante e a fita gerada ao fim do processo tende a apresentar uma quantidade maior de *repeats* do que a fita molde, em resposta ao deslizamento ocorrido durante o processo (Viguera *et al.*, 2001).

DNAs satélites podem ser amplificados e se movimentar no genoma por meio de moléculas circulares extracromossômicas (eccDNA, *extrachromosomal circular DNA*). Em um fenômeno denominado replicação saltatória ou replicação em círculo rolante (RCR, *rolling circle replication*), parte das unidades de um arranjo podem recombinar intracromossomicamente na forma de um *loop* e gerar uma molécula circular (eccDNA) com autonomia para replicação extracromossômica. A reintegração no genoma por meio de recombinação homóloga com o loco original levaria à expansão de *repeats* daquela região; ao passo que a recombinação ectópica proporcionaria o surgimento de um novo loco da sequência (Cohen e Segal, 2009). Embora não comprovado de forma experimental, o envolvimento da replicação saltatória na amplificação de sequências satélites ganhou suporte a partir da identificação de diferentes classes de elementos repetitivos na forma de moléculas circulares extracromossômicas em plantas e animais (revisado por Cohen e Segal, 2009; Cohen *et al.* 2010). No besouro *Tribolium castaneum*, por exemplo, a presença de unidades de repetição individualizadas dos repeats TCAST2 e TCAT ao longo de regiões eucromáticas foi atribuída ao processo de formação de eccDNA (Brajković *et al.* 2012; Feliciello *et al.* 2014).

Apesar da ampla variação quantitativa, o alto grau de homogeneidade encontrado entre os monômeros de uma mesma família de DNA satélite sugere a presença de um mecanismo de evolução dependente para as unidades de repetição. Ou seja, as mutações não são acumuladas localmente. Ao contrário, elas são transmitidas entre as diferentes unidades ao longo dos arranjos (homogeneização) por meio de recorrentes eventos de recombinação desigual e conversão gênica, num processo chamado evolução em concerto, sendo posteriormente fixadas na população. Como resultado, as sequências satélites tendem a divergir entre grupos de organismos reprodutivamente isolados (Nei e Rooney, 2005; revisado em Plohl *et al.* 2012).

Além do alto potencial de variação nas sequências, perfis de DNAs satélites espécie-específicos podem surgir por meio da amplificação/contração independente e diferencial de um determinado *repeat* dentro de um conjunto de sequências compartilhadas por um grupo de espécies. Esta hipótese, denominada de biblioteca de DNAs satélites (*Satellite DNA library*),

foi inicialmente proposta por Fry e Salser (1977) para explicar a variação encontrada no rato canguru (*Dipodomys ordii*) e têm sido descrita como o modelo mais comum de evolução de DNAs satélites em plantas e animais. No gênero *Palorus* (Coleoptera), por exemplo, quatro famílias não relacionadas de DNA satélite foram encontradas diferentemente amplificadas em *P. ficicola*, *P. genalis*, *P. ratzenburgii* e *P. subdepressus* (Meštróvic *et al.*, 1998). Da mesma forma, diferenças quantitativas para os *repeats* *hipu* e *jumper* em espécies de *Phaseolus* (Fabaceae) foram atribuídas à existência de uma biblioteca de satélites (Ribeiro T, 2012). Neste caso, uma das espécies mostrou alta abundância de ambos os *repeats* no genoma, sugerindo a ocorrência de uma amplificação simultânea ou manutenção da sequência mais abundante, quando da amplificação de uma nova família. Análises mais recentes em espécies de *Solanum*, entretanto, sugerem que *repeats* satélites também podem surgir *de novo* por meio de mecanismos ainda desconhecidos. Utilizando uma abordagem comparativa de fina escala em sequências genômicas de *S. tuberosum* e *S. verrucosum*, Zhang e colaboradores (2014) identificaram distintos *repeats* como componentes dos centrômeros em cada uma das espécies.

2.4. Estratégias para identificação e caracterização de DNAs satélites

Durante muito tempo, a caracterização de DNAs satélites e outros elementos repetitivos foi uma atividade laboriosa e demorada. Explorada por meio de diferentes técnicas, entre elas a partir do princípio da cinética de renaturação do DNA (análise de *Cot*), esses elementos eram isolados da fração de DNA genômico total desnaturado, com base no número de vezes em que estava presente no genoma (Peterson *et al.* 2002), e utilizados na caracterização do mesmo por meio de diferentes técnicas, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A presença de diferentes elementos (em tandem e dispersos) com a mesma cinética numa mesma fração *Cot*, entretanto, fazia com que as marcações fossem observadas ao longo de todo o genoma, como o observado nas análises citológicas de *Cot*-1, *Cot*-10 e *Cot*-100 em tomate (Chang *et al.* 2008). A clonagem posterior da fração *Cot* isolada, seguida por análise de similaridade da sequência por BLAST e mapeamento por FISH, levou à identificação mais específica de novos *repeats* como em amendoim (Zhang *et al.* 2012).

O uso de fragmentos genômicos maiores clonados em diferentes vetores (BACs, fosmídeos, fagos, etc.), constituindo as chamadas bibliotecas genômicas, tem sido outra estratégia na caracterização de *repeats* satélites. Embora aplicados majoritariamente no

estabelecimento de marcadores cópia-única e estudos de evolução cariotípica (ver, por exemplo, os casos de *Solanum* e *Brachypodium*; Szinay et al. 2012; Idziak et al. 2014), a distribuição cromossômica encontrada para muito desses clones têm servido com um passo inicial na identificação de *repeats* satélites em diferentes espécies. Ao mapear *clusters* de genes de resistência nos cromossomos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), por exemplo, Geffroy e colaboradores (2009) identificaram um clone que produziu sinais de hibridização nos terminais de diversos cromossomos, padrão indicativo da presença de uma ou mais sequências repetitivas em seu inserto. A análise posterior envolvendo o sequenciamento e anotação de diferentes clones BAC confirmou a existência de um DNA satélite subterminal no grupo. O *repeat* denominado *kipu* estava presente na forma de 92 cópias bem conservadas nas sequências analisadas (David et al. 2009). Na maioria das vezes, as investigações que envolviam a análise dos *repeats* presentes em clones de bibliotecas genômicas necessitavam da subclonagem do fragmento em partes menores para o sequenciamento (*shotgun sequencing*) e a montagem *a posteriori* dos dados em regiões maiores (*contigs*), dificultada pela própria natureza repetitiva das sequências em análise.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento (*Next Generation Sequencing*, NGS) e metodologias para caracterização de sequências repetitivas (elementos transponíveis e DNAs satélites) as abordagens têm sido redirecionadas. Genomas inteiros têm sido sequenciados em baixas coberturas, mas suficientes para que as famílias de elementos repetitivos mais abundantes estejam representadas nos dados gerados. Paralelamente, foram desenvolvidas ferramentas capazes de usar os dados de NGS como arquivos de entrada e realizar uma caracterização global em um determinado genoma. O Repeat Explorer (<http://www.repeatexplorer.org/>), plataforma online de livre acesso, utiliza um princípio de “clusterização” para caracterização de sequências repetitivas. Por meio de uma comparação par-a-par de todos os *reads* gerados no sequenciamento (*all-to-all pairwise*) os grupos de sequências mais similares entre si vão sendo agrupados em *clusters*. Estes representariam diferentes famílias de elementos repetitivos e podem ser detalhadamente analisados quanto à abundância e composição de sequência no genoma (Novák et al. 2010; Novák et al. 2013).

Utilizando esta abordagem, Steflova e colaboradores (2013) caracterizaram os *repeats* presentes no genoma de *Rumex acetosa* como exclusivos dos cromossomos sexuais (XY₁Y₂). Das seis famílias identificadas, três foram específicas dos cromossomos Y1 e Y2 (RAYSII, RAYSIII e RAE730), enquanto as outras estavam presentes nos três cromossomos sexuais (RA160, RA180 e RA690). A abundância dos *repeats* também pode ser avaliada de um ponto

de vista evolutivo, por meio da comparação mais abrangente do genoma entre duas ou mais espécies. No gênero *Silene*, *S. latifolia* e *S. vulgaris* compartilham os mesmos DNAs satélites: STAR-C (pericentromérico) e TR1 e X.43.1 (subteloméricos). Apesar disso, as análises demonstraram que STAR-C aparece bem mais abundante em *S. vulgaris* (~ 5x mais em comparação com *S. latifolia*), sugerindo que uma amplificação da sequência ocorreu neste táxon após a separação das duas espécies (Cegan et al., 2012).

2.5. Evolução cariotípica: cromossomos monocêntricos x holocêntricos

O cariótipo, representado pelo conjunto de cromossomos de um organismo, é extremamente dinâmico, diferindo mesmo entre espécies relacionadas, devido a rearranjos inter- e intracromossômicos (Sumner, 2002). Os mecanismos envolvidos nessas modificações são inserções, deleções, duplicações, inversões e translocações (Lysak e Schubert, 2013) e parecem atuar de forma diferente na evolução de cariótipos com cromossomos monocêntricos. Nestes casos, para serem estáveis, as variações numéricas devem por obrigação gerar produtos que possuam apenas um centrômero, característica crucial para a manutenção do cromossomo ao longo do ciclo celular.

As disploidias descendentes e ascendentes são uma das principais alterações cariotípicas que levam à variação no número cromossômico, sendo mediadas por diferentes tipos de rearranjos (Lysak e Schubert, 2013; Lysak, 2014). As translocações robertsonianas, também chamadas de fusões cêntricas, são caracterizadas pela troca de braços inteiros entre cromossomos telo- ou acrocêntricos com a formação de um cromossomo (sub)metacêntrico “fusionado” e exercem um papel de destaque nas variações numéricas em diversos grupos (ver Guerra, 2008). *Gibasis schiedeana* (Commelinaceae), por exemplo, apresenta citótipos diploides com 10 cromossomos metacêntricos (M) e acrocêntricos (A) ($4M + 6A$) e tetraploides com número reduzido, 16 cromossomos ($12M + 4A$), cuja variação é atribuída à ocorrência de translocação robertsoniana envolvendo dois pares cromossômicos (Jones, 1974). Similarmente, os citótipos tetraploides encontrados em espécies de *Nothoscordum* (*N. nudicaule* e *N. macrostemon*, $2n = 19$) diferem do esperado ($2n = 20$) por um rearranjo entre acrocêntricos (Souza et al., 2012).

Fusões em tandem também têm sido sugeridas na evolução cariotípica de alguns grupos. Nos veados asiáticos (gênero *Muntiacus*) a extrema variação numérica observada entre a espécie chinesa (*M. reevesi*; $2n = 46$) e espécie indiana (*M. muntjak vaginalis*; $2n = 6$)

ou $2n = 7$) resultou da ocorrência de sucessivas fusões entre os cromossomos, evidenciada pela presença de diversos sítios teloméricos (TTAGGG) intersticiais nos grandes cromossomos de *M. muntjak vaginalis* (Lee et al. 1993). Mais recentemente, um fenômeno de inserção (*nested chromosome insertion*, NCI), que envolve a adição de um cromossomo entre os braços cromossômicos de outro (receptor) (revisado por Lysak, 2014), tem sido relatado como o principal mecanismo que, de forma independente, atuou na evolução cariotípica em diferentes grupos de gramíneas (Murat et al., 2010). Eventos de NCI contribuíram para a redução do número cromossômico ancestral de $n = 12$ para $n = 5$ em *Brachypodium distachyon*, por exemplo (The International *Brachypodium* Initiative, 2010). Quando comparado ao arranjo encontrado em arroz (*Oryza sativa*), apenas o cromossomo 5 de *B. distachyon* não esteve envolvido nos eventos de redução numérica.

Diferentes técnicas de análises genômicas e citológicas têm permitido a inferência de rearranjos intra- e intercromossômicos numa espécie e entre grupos relacionados. A utilização de cromossomos inteiros ou de dezenas de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) na forma de coquetel de sondas em FISH (hibridização *in situ* fluorescente), a denominada pintura cromossômica, têm se mostrado uma excelente ferramenta de análise em diversos grupos. Em plantas, a pintura com BACs vêm sendo usada extensivamente na elucidação da evolução cariotípica de *Arabidopsis* e diversas espécies relacionadas de Brassicaceae (ver, por exemplo, Lysak et al., 2006; Mandáková et al., 2014) e mais recentemente em *Brachypodium* (Betekhtin et al., 2014). Adicionalmente, os BACs podem ser utilizados de forma individual no mapeamento físico (BAC-FISH), o que permite a visualização direta dos rearranjos envolvidos na diferenciação cariotípica. Em alguns casos, como do gênero *Solanum*, inversões paracêntricas foram descritas como principal mecanismo de diferenciação entre as espécies (Szinay et al., 2012). Enquanto que no gênero *Phaseolus*, as espécies mostram uma grande estabilidade cariotípica e diferem estruturalmente pela ocorrência de poucas inversões pericêntricas ou paracêntricas (Bonifácio et al., 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Em cromossomos holocêntricos as variações estruturais e numéricas aparentam estar intimamente relacionadas entre si e associadas à presença de uma estrutura centromérica difusa. A evolução dos cariótipos é baseada principalmente em eventos de fissão, fusão e poliploidia e vem sendo analisada em detalhes em um pequeno espectro de organismos. Em borboletas (Lepidoptera), o mapeamento de genes do cromossomo 15 de *Bombyx mori* em *Manduca sexta* por BAC-FISH revelou a conservação estrutural para esse cromossomo em ambas as espécies (Sahara et al., 2007). Quando a comparação foi realizada com uma espécie

de menor número cromossômico (*Samia cynthia*, $2n = 25-28$) e com um número extensivo de marcas, diversos eventos de fusão e fissão, suficientes para explicar a redução de $n = 28$ para $n = 14$, foram encontrados. Os cromossomos de *S. cynthia* são compostos na sua maioria por dois homeólogos de *B. mori*. As exceções são o cromossomo sexual, completamente conservado, e o cromossomo 1, que é formado pela fusão de 4 cromossomos de *B. mori* (Yoshido et al., 2011). No gênero *Eleocharis* (Cyperaceae) quatro números cromossômicos foram identificados para *E. maculosa* ($2n = 10, 8, 7$ e 6) e a distribuição diferencial identificada para DNA ribossomal 5S, com localização terminal no citótipo com 10 cromossomos e intersticial nos demais, indicou a ocorrência de diferentes eventos de simplodia para a origem destes diferentes citótipos (Da Silva et al., 2008).

2.6. Evolução cariotípica: um enfoque filogenético

As informações sobre a evolução dos cariótipos obtidas de dados citológicos e genômicos também podem ser interpretadas em um contexto filogenético. Nos últimos anos, o rápido desenvolvimento de métodos comparativos filogenéticos (*Phylogenetic Comparative Method*, PMC) e a crescente geração de filogenias moleculares têm permitido a inferência da história, bem como dos processos de mudança, de um determinado caráter (por exemplo, morfológico, anatômico ou mesmo citológico) em uma perspectiva filogenética (revisado por Garamszegi e Gonzalez-Voyer, 2014; Paradis, 2014).

Do ponto de vista citológico, as informações de número cromossômico, distribuição de sítios de DNA ribossomal, conteúdo de DNA, bem como rearranjos, podem ser utilizadas como arquivos de entrada em diferentes softwares, como o Mesquite (Maddison e Maddison, 2015) e o ChromEvol (Glick e Mayrose, 2014). Essas ferramentas facilitam a avaliação do padrão de mudança de número cromossômico, a estimativa do número cromossômico ancestral, bem como da frequência de poliploidia e de rearranjos estruturais em um determinado grupo de interesse (Glick e Mayrose, 2014). Utilizando ambas as abordagens, de Oliveira et al., (2015) analisaram a evolução cariotípica em um grupo de orquídeas (Pleurothallidinae) e encontraram que disploidias ascendente e descendente são os principais mecanismos de evolução cariotípica no grupo. Em *Oxalis* (Oxalidaceae), os dados citológicos sobrepostos à filogenia revelaram um número cromossômico básico de $x = 6$ e duas tendências de evolução cromossômica no gênero: (1) uma linhagem formada por espécies com $x = 5$, resultante de disploidia descendente e aumento no tamanho do genoma por meio

da amplificação de elementos transponíveis e (2) espécies que mantiveram o número básico $x = 6$ e cuja evolução se deu primariamente por poliploidia (Vaio *et al.*, 2013).

Para holocêntricos, análises associando as relações filogenéticas com os números cromossômicos já foram realizadas em grupos de plantas (*Luzula*, Juncaceae e *Carex*, Cyperaceae) e animais, como em borboletas. No caso de *Luzula*, os dados foram analisados por meio de uma plotagem manual dos registros cromossômicos. No geral, nenhuma tendência nas mudanças de número foi observada. Ao contrário, diversos mecanismos de evolução cariotípica parecem atuar nos diferentes clados, tais como fissão, fusão, poliploidia e amplificação/eliminação de DNA repetitivo (Bozek *et al.*, 2012). Em *Carex*, os modelos de variam drasticamente a depender do grupo analisado. Hipp (2009), por exemplo, demonstrou que na seção *Ovalis* a origem das espécies do leste da América do Norte foi acompanhada de uma alta diversificação cariotípica e divergência cromossômica numérica para diferentes clados, refletidas na ausência de sinal filogenético (Hipp, 2009). Já na seção *Spirostachyae*, embora não haja nenhuma evidência de tendência clado-específica, as variações de número cromossômico demonstraram significativo sinal filogenético (Escudero *et al.*, 2010). A situação encontrada em borboletas se assemelha à presente em *Carex*. Enquanto alguns grupos mostraram uma alta estabilidade cariotípica, como Nymphalinae, onde a maioria dos gêneros apresentou número haploide $n = 31$, outros apresentaram uma grande variação cromossômica, como Biblidinae (Ahola *et al.*, 2014).

2.7. As famílias Cyperaceae e Juncaceae

2.7.1. Análises citológicas

Algumas características citológicas são compartilhadas por Cyperaceae e Juncaceae. As espécies desses grupos são caracterizadas por apresentar: (1) ocorrência de cromossomos holocêntricos e (2) meiose pós-reducional ou invertida, onde a primeira divisão é equacional (separação das cromátides-irmãs) e a segunda reducional (separação dos homólogos). Adicionalmente, uma característica peculiar é observada ao fim da meiose de Cyperaceae, onde a degeneração de parte dos produtos que compõem a tétrade é observada ao fim do processo, com a formação de apenas um grão de pólen funcional (pseudomônade) (revisado por Melters *et al.*, 2012).

As observações iniciais da migração paralela dos cromossomos em anáfase mitótica e a organização dos bivalentes na forma de caixa em metáfase I na meiose foram utilizadas para

dar suporte à presença de cromossomos holocêntricos em diversos gêneros. Posteriormente, experimentos de quebras cromossômicas induzidas por radiação confirmaram a organização centromérica difusa. Os fragmentos gerados permaneceram viáveis durante os ciclos celulares subsequentes, devido à manutenção da atividade centromérica nos fragmentos, fazendo com que novas combinações numéricas surgissem (ver, por exemplo, Nordenskiöld, 1963 ou Jankowska et al., 2015). Extrapolando para populações naturais, as variações numéricas foram observadas em diferentes gêneros (ver detalhes adiante e Tabela 1) e os fenômenos de fragmentação e fusão são sugeridos como mecanismos importantes de evolução cromossômica (Luceño e Guerra, 1996).

2.7.1.1 Análises citológicas: *Luzula* (Juncaceae)

Em Juncaceae, a quase totalidade dos estudos citológicos foi focada em um dos gêneros mais representativos da família, *Luzula*. a maioria das espécies de *Luzula* apresenta contagem cromossômica. O número mais comum é o diploide $2n = 12$, seguido por $2n = 24$ (tetraploide) e $2n = 36$ (hexaploide); com variação indo desde $2n = 6$ (*L. elegans*) a $2n = 66$ em *L. pilosa* (Tabela 1). Nessas espécies, os cromossomos são categorizados em classes AL (cromossomos maiores), BL ($\frac{1}{2}$ do tamanho do AL) e CL ($\frac{1}{4}$ do tamanho do AL) com base no tamanho, e essa classificação é usada na descrição do cariótipo (revisado por Drábková, 2013). Combinados com análises filogenéticas, esses dados podem auxiliar na interpretação da origem e evolução cromossômica, como demonstrado por Bozek e colaboradores (2012). Usando dados de tamanho e número cromossômico associado à medições de tamanho do genoma, esses autores sugeriram que em *Luzula* a diversidade cariotípica é dinamicamente mediada por processos de fusão, fissão e poliploidia, acompanhado em alguns casos por amplificação/contração do genoma.

Luzula elegans, por exemplo, apresenta o menor número e os maiores cromossomos registrados na família ($2n = 6AL$) e vem sendo utilizada como modelo para os estudos de estrutura e comportamento de cromossomos holocêntricos (e.x. Nagaki et al., 2005; Heckmann et al., 2014). A presença de um centrômero difuso foi confirmada nessa espécie pela localização da proteína centromérica CENH3 e observação de um sulco centromérico (*centromeric groove*) nos cromossomos. Os sinais de CENH3 foram identificados ao longo das cromátides na forma de uma linha longitudinal em posição correspondente ao sulco (Heckmann et al., 2011). Adicionalmente, os cromossomos foram caracterizados quanto à distribuição de *repeats* satélites (Heckmann et al., 2013) e estas marcas foram posteriormente

usadas na elucidação do evento de meiose invertida (Heckmann et al., 2014). Alguns poucos trabalhos realizados em *L. nivea* ($2n = 12AL$) também demonstraram a presença de um centrômero difuso (Nagaki et al., 2005) e a distribuição de DNAs satélites formando blocos nos cromossomos interfásicos e metafásicos (Haizel et al., 2005).

Tabela 1. Variação no número cromossômico diploide em gêneros selecionados de Cyperaceae e Juncaceae

Gêneros	Número diploide ($2n$)	$2n$ mais frequentes (nº espécies)
<i>Carex</i> ¹	Extremamente variável (entre 10 e 168)	56 (57), 60 (56), 70 (52), 74 (42)
<i>Eleocharis</i> ¹	Extremamente variável (entre 6 e 216)	10 (12), 20 (18), 40 (10)
<i>Rhynchospora</i> ^{1,3}	4, 8, 10, 12, 18, 20, 24, 26, 30, 36, 37, 45, 48, 50, 58	10 (20), 18 (11), 20 (11)
<i>Luzula</i> ²	6, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32, 35, 36, 42, 44, 46, 48, 56, 66	12 (60), 16 (12), 24 (31), 36 (11)

Dados retirados de ¹Roalson (2012); ²Drábková (2013); ³Arguelho et al., (2012).

2.7.1.2 Análises citológicas: *Carex* (Cyperaceae)

Carex é um dos maiores gêneros de angiospermas em termos de espécies e o grupo com maior número de contagens cromossômicas em Cyperaceae. O gênero exibe variação ($2n = 12$ a $2n = 168$) baseada em mudanças por fissão/fusão. A poliploidia aparece como um agente secundário de diversificação, uma vez que poucas espécies foram identificadas, e as variações numéricas parecem ocorrer na direção da formação de cariótipos com maior número de cromossomos, inclusive no nível intraespecífico (Roalson et al., 2008; Hipp et al., 2009). A estreita relação entre diversificação das espécies, variações cromossômicas numéricas e tamanho dos genomas têm sido o principal foco dos estudos em *Carex*. Em *C. laevigata*, por exemplo, uma correlação entre latitude e número cromossômico foi observada para populações da península ibérica. Um gradiente de aumento no número cromossômico variando de $2n = 69$ a $2n = 80$ foi encontrado na direção norte-sul (Luceño e Castroviejo, 1991). De modo geral, os trabalhos têm sugerido o valor adaptativo do cromossomo

holocêntrico e seu papel na promoção de diferenciação e eventual especiação no gênero (ver, por exemplo, Escudero et al., 2013).

2.7.2.3 Análises citológicas: *Eleocharis* (Cyperaceae)

Similar ao encontrado em *Carex*, a amplitude de variação cromossômica em *Eleocharis* é bastante significativa, indo de $2n = 6$ (*E. subarticulata*) a $2n = 216$ (*E. dulcis*). A maioria das espécies, entretanto, apresenta números cromossômicos baixos, sendo $2n = 20$ o mais frequente (Roalson, 2008). Estudos citológicos mais detalhados têm sido realizados basicamente em representantes brasileiros e têm ajudado a decifrar os mecanismos responsáveis pela formação de cariótipos com números cromossômicos reduzidos. Em *Eleocharis subarticulata* ($2n = 6$) a ocorrência de meiose irregular, com a formação de um multivalente em anel em metáfase I envolvendo todos os cromossomos, e a presença de sítios teloméricos intersticiais em um par cromossômico grande, dá suporte à ocorrência de múltiplos rearranjos, inclusive fusões telômero-telômero, na formação do complemento cromossômico mais reduzido do gênero (Da Silva et al., 2005).

Os mesmos autores relataram a presença de vários citótipos ($2n = 10, 8, 7$ e 6) em *E. maculosa* e o mapeamento dos genes ribossomais 5S e 45S (DNAr), em combinação com análises meióticas, permitiu traçar a origem dos diferentes números cromossômicos. O complemento $2n = 10$ apresentou quatro sítios de 45S e dois de 5S, todos terminais e em cromossomos distintos, mostrando meiose regular com formação de cinco bivalentes. A análise dos outros citótipos mostrou a presença da mesma quantidade de loci de DNAr, mas com posição intersticial para o 5S e em cromossomos morfologicamente maiores para o 45S. Em alguns casos, ambos os clusters foram localizados no mesmo cromossomo (45S terminal e 5S intersticial). Para meiose, diversas conformações incluindo bivalentes e trivalentes ($2n = 8$), tetravalente e trivalente ($2n = 7$) e hexavalente ($2n = 6$) foram observadas. Os diferentes citótipos parecem ter surgido em eventos independentes de rearranjos (translocações ou simplíoidias) a partir do cariótipo com 10 cromossomos (Da Silva et al., 2008).

A distribuição dos DNAs ribossomais 5S e 45S foi posteriormente analisada de forma mais ampla em 23 espécies e revelou a predominância de sítios terminais (100% dos casos para 45S e 74% para 5S) para ambos os loci. O DNAr 45S se mostrou mais variável, sendo localizado em dois, quatro, seis, oito ou 10 terminais cromossômicos. Apesar disso, nenhuma relação direta com o número cromossômico foi observada. Espécies possuindo 10 (*E. flavencens*), 50 (*E. liesneri*), 54 (*E. plicarhachis*) ou 60 cromossomos (*E. laeviglumis*)

apresentaram a mesma quantidade de sítios (10 loci). Ao contrário, o DNAr 5S mostrou uma maior estabilidade numérica, com dois ou quatro sítios identificados. Interessantemente, loci intersticiais como em *E. maculosa* (Da Silva et al., 2008), foram observados apenas em *E. sellowiana* e *E. geniculata* e ambas as espécies apresentam apenas citótipos com 10 e 20 cromossomos. A presença de um número cromossômico estável, múltiplo do número básico, e o comportamento normal em meiose sugerem que nesses casos os sítios intersticiais não tenham surgido por meio de rearranjos complexos, mas possivelmente por um evento de inversão simples (Da Silva et al., 2010).

2.7.3. O gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae): sistemática e análises citológicas

Rhynchospora Vahl. tem centro de diversidade na região das Américas, primariamente nas zonas temperada (sudoeste dos Estados Unidos) e neotropical. No Brasil, mais de 150 espécies já foram descritas (Alves et al., 2009) e o grupo tem sido alvo de diversos estudos biosistemáticos e citológicos. Assim como para a família, diversas propostas taxonômicas têm sido feitas para a tribo que engloba *Rhynchospora* (tribo Rhynchosporeae). A revisão mais recente e aceita reconhece a mesma como sendo formada por dois gêneros (*Rhynchospora* e *Pleurostachys*) e subdivide *Rhynchospora* em dois subgêneros (Haplostylae e *Rhynchospora*) e 29 seções (Kükenthal, 1949 *apud* Thomas et al., 2009).

Do ponto de vista filogenético, os dados recentes mostram *Rhynchospora* como um grupo não monofilético, se consideradas as circunscrições taxonômicas clássicas. As relações entre 41 espécies do gênero e outros grupos de Cyperaceae (*Pleurostachys*, *Hypolytrum*, *Scleria*, *Machaerina* e *Carex*) foram avaliadas com marcador plastidial (*trnL-F*) e o gênero *Pleurostachys* foi encontrado inserido entre as espécies de *Rhynchospora*. Adicionalmente, os subgêneros propostos por Kükenthal parecem não mostrar total correspondência com as relações encontradas (Thomas et al., 2009). Um número maior de espécies foi adicionado a esta matriz de dados e as relações entre as espécies foram discutidas de um ponto de vista mais amplo e biogeográfico (Buddenhagen et al., aceito).

Os estudos cromossômicos em *Rhynchospora* foram inicialmente realizados como uma ferramenta auxiliar na taxonomia (ver, por exemplo, Vanzela et al., 2000). Em consequência, diversas descrições numéricas estão disponíveis para o gênero, principalmente em representantes brasileiros (Tabela 1). Assim como em *Eleocharis*, o grupo apresenta espécie com número cromossômico bastante reduzido, com $2n = 4$ para *Rhynchospora tenuis*. A variação geral vai desde este número a $2n = 58$, sendo $2n = 10$ o cariótipo mais frequente.

A poliploidia é relatada para várias espécies, inclusive ao nível intraespecífico (Tabela 1; dados compilados em Roalson, 2008).

A caracterização adicional dos cariótipos tem sido feita pela análise da distribuição de heterocromatina e sítios de DNAr. Bandas heterocromáticas estão presentes ao longo dos cromossomos de algumas espécies como revelado por bandeamento C em *R. ciliata* (Vanzela et al., 2000). Entretanto, a sua composição parece variar bastante, com blocos mostrando maior proporção de bases AT e outros de CG (terminais e provavelmente correspondentes ao DNAr 45S) em dupla coloração com CMA/DAPI (Vanzela et al., 2000). Os sítios de DNAr 45S foram analisados até então em 12 espécies, e assim como em *Eleocharis*, uma distribuição terminal foi observada (2, 4, 6 ou 8 loci). Para o DNAr 5S, os sítios se mostraram preferencialmente intersticiais. Apenas em um dos quatro pares portadores de DNAr 5S de *R. pubera*, os sítios foram localizados em ambos os terminais cromossômicos (Vanzela et al., 1998; Sousa et al., 2011).

Recentemente, análises mais detalhadas utilizando abordagens combinadas de bioinformática e técnicas citomoleculares têm permitido uma melhor caracterização da estrutura do centrômero e organização do genoma em *Rhynchospora*, transformando o gênero num modelo para estudos de cromossomos holocêntricos em plantas, juntamente com *Luzula*. *Rhynchospora pubera* teve seu genoma parcialmente caracterizado em termos de sequências repetitivas e mostrou possuir apenas uma única família de DNA satélite em sua fração repetitiva. Essa sequência, denominada Tyba, compreende cerca de 4% do genoma da espécie e as análises citológicas revelaram a presença de sinais em forma de linhas longitudinais ao longo dos cromossomos, colocalizados com os sítios de deposição da proteína centromérica CENH3 (Marques et al., 2015). Considerada a primeira sequência satélite centromérica identificada em espécies com cromossomos holocêntricos, Tyba se destaca também por apresentar um padrão de condensação atípico em relação às outras sequências satélites. Os sinais presentes em intérfase aparecem na forma de pequenos pontos dispersos ao longo de toda a superfície do núcleo; e vão se associando com o progresso do ciclo celular até chegar à estrutura linear visualizada em metáfase (Marques et al., 2015).

3. Referências

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science.
- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L et al. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. Nat Commun 5: 4737.
- Arguelho EG, Michelan VS, Nogueira FM, Da Silva CRM, Rodriguez C, Trevisan R, Vanzela ALL (2012) New chromosome counts in Brazilian species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). Caryologia 65: 140-146
- Bardella VB, da Rosa JA, Vanzela ALL (2014) Origin and distribution of AT-rich repetitive DNA families in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Infect Genet Evol 23: 106-114.
- Betekhtin A, Jenkins G, Hasterok R (2014) Reconstructing the evolution of *Brachypodium* genomes using comparative chromosome painting. PLOS one 9: e115108.
- Bickmore WA (2001) Eukaryotic Chromosomes. eLS. p.1-7.
- Bonifácio EM, Fonsêca A, Almeida C, do Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2012) Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). Theor Appl Genet 124: 1513-1520.
- Božek M, Leitch AR, Leitch IJ, Drábková LZ, Kuta E (2012) Chromosome and genome size variation in *Luzula* (Juncaceae), a genus with holocentric chromosomes. Bot J Linn Soc 170: 529–541.
- Brajković J, Feliciello I, Bruvo-Mađarić B, Ugarković Đ (2012) Satellite DNA-like elements associated with genes within euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. G3 2: 931-941.
- Bruhl JJ (1995) Sedge genera of the world: relationships and a new classification of the Cyperaceae. Aust Syst Bot 8: 125-305.
- Brutlag DL (1980) Molecular arrangement and evolution of heterochromatin DNA. Ann Rev Genet 14: 121-144.
- Cegan R, Vyskot B, Kejnovsky E, Kubat Z, Blavet H, Safar J, Dolezel J, Blavet N, Robza R (2012) Genomic diversity in two related plant species with and without sex chromosomes - *Silene latifolia* and *S. vulgaris* PLOS one 7: e31898.

- Chang SB, Yang TJ, Datema E, van Vugt J, Vosman B, Kuipers A, Meznikova M, Szinay D, Lankhorst RK, Jacobsen E, de Jong H (2008) FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. *Chromosome Res* 16: 919-933.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Cohen S, Segal D (2009). Extrachromosomal circular DNA in eukaryotes: possible involvement in the plasticity of tandem repeats. *Cytogenet Genome Res* 124: 327-338.
- Cohen S, Agmon N, Sobol O, Segal D (2010) Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. *Mobile DNA* 1: 11.
- Cooney CA, Matthews HR (1984) The isolation of DNA by density gradient centrifugation. In Walker, John M (ed.). *Nucleic Acids*. Springer, 1984.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2005) Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Bot J Linn Soc* 149: 457-464.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2008) Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenet Genome Res* 122:175–180.
- Da Silva CRM, Quintas CC, Vanzela ALL (2010) Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). *Genetica* 138: 951-957.
- David P, Chen NWG, Pedrosa-Harand A, Thareau V, Sévignav M, Cannon SB, Debouck D, Langin T, Geffroy V (2009). A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant Physiol* 151: 1048-1065.
- De Oliveira IG, Moraes AP, De Almeida EM, De Assis FLM, Cabral JS, De Barros F, Félix LP (2015) Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. *Bot J Linn Soc* 178: 102-120.
- Drábková LZ (2010) Phylogenetic relationships within Juncaceae: evidence from five regions of plastid, mitochondrial and nuclear ribosomal DNA, with notes on morphology. In Seberg, Petersen, Barfod & Davis (eds.). *Diversity, phylogeny and evolution in the monocotyledons*. Aarhus University Press, Denmark, 2010.
- Drábková LZ (2013) A survey of karyological phenomena in the Juncaceae with emphasis on chromosome number variation and evolution. *Bot Rev* 79: 401-446.

- Escudero M, Hipp AL, Luceño M (2010) Karyotype stability and predictors of chromosome number variation in sedges: A study in *Carex* section *Spirostachyae* (Cyperaceae). *Mol Phylogenet Evol* 57: 353-363.
- Escudero M, Weber JA, Hipp AL (2013) Species coherence in the face of karyotype diversification in holocentric organisms: the case of a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia*, Cyperaceae). *Ann Bot* 112: 515-526.
- Feliciello I, Akrap I, Brajković J, Zlatar I, Ugarković Đ (2014) Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Biol Evol* 7: 228–239.
- Fry K, Salser W (1977) Nucleotide sequence of HS-a satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* 12: 1069–1084.
- Fonsêca A, Pedrosa-Harand A (2013) Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome* 56: 335-343.
- Garamszegi RZ, Gonzalez-Voyer A (2014) Working with the tree of life in comparative studies: how to build and tailor phylogenies to interspecific datasets. Edited by L. Zsolt Garamszegi. Springer.
- Geffroy V, Macadré C, David P, Pedrosa-Harand A, Sévignac M, Dauga C, Langin T (2009) Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site– leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181: 405–419.
- Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120: 339-350.
- Glick L, Mayrose I (2014) ChromEvol: assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. *Mol Biol Evol* 31: 1914-1922.
- Haizel T, Lim YK, Leitch AR, Moore G (2005) Molecular analysis of holocentric centromeres of *Luzula* species. *Cytogenet Genome Res* 109: 134-143.
- Heckmann S, Schroeder-Reiter E, Kumke K, Ma L, Nagaki K, Murata M, Wanner G, Houben A (2011) Holocentric chromosomes of *Luzula elegans* are characterized by a longitudinal centromere groove, chromosome bending, and a terminal nucleolus organizer region. *Cytogenet Genome Res* 134: 220–228.

- Heckmann S, Macas J, Kumke K, Fuchs J, Schubert V, Ma L, Novak P, Neumann P, Taudien S, Platzer M, Houben A (2013) The holocentric species *Luzula elegans* shows an interplay between centromere and large-scale genome organization. *Plant J* 73: 555-565.
- Heckmann S, Jankowska M, Schubert V, Katrin K, Ma W, Houben A (2014) Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nat commun* 5: 4979.
- Hipp AL (2009) Non-uniform processo of chromosome evolution in sedges (*Carex*: Cyperaceae). *Evolution* 61: 2175-2194.
- Idziak D, Hazuka I, Poliwczak B, Wiszynska A, Wolny E, Hasterok R (2014) Insight into the karyotype evolution of *Brachypodium* species using comparative chromosome barcoding. *PLOS One* 9: e93503.
- Jones E, Simpson DA, Hodkinson TR, Chase MW, Parnell JAN (2007) The Juncaceae-Cyperaceae interface: a combined plastid sequence analysis. *Aliso* 23:55-61.
- Jones K (1974) Chromosome evolution by Robertsonian translocation in *Gibasis* (Commelinaceae). *Chromosoma* 45: 353-368.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2009) Sistemática vegetal um enfoque filogenético. Artmed.
- Kamakaka RT, Biggins S (2005) Histone variants: deviants?. *Genes Dev* 19: 295-310.
- Kazama Y, Sugiyama R, Suto Y, Uchida W, Kawano S (2006) The clustering of four subfamilies of satellite DNA at individual chromosome ends in *Silene latifolia*. *Genome* 49: 520-530.
- Jankowska M, Füchs J, Klocke E, Fojtová M, Polanská P, Fajkus J, Schubert V, Houben A (2015) Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. *Chromosoma* 124: 519-528.
- Lee C, Sasi R, Lin CC (1993) Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of Asian Muntjacs. *Cytogenet Cell Genet* 63: 156-159.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *PNAS* 103: 5224-5229.
- Lysak MA, Schubert I (2013) Mechanisms of chromosome rearrangements. In I.J. Leitch et al. (eds.), *Plant Genome Diversity*, Volume 2, Springer-Verlag Wien 2013.

- Lysak MA (2014) Live and let die: centromere loss during evolution of plant chromosomes. *New Phytol* 203: 1082-1089.
- Luceño M, Castroviejo S (1991) Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Plant Syst Evol* 177: 149-159.
- Luceño M, Guerra M (1996) Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 49: 301-309.
- Ma J, Wing RA, Bennetzen JL, Jackson SA (2007) Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. *Trends Genet* 23: 134-139.
- Maddison W, Maddison DR (2015) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04 <http://mesquiteproject.org>
- Marques A, Ribeiro T, Neumann P, Macas J, Novak P, Schubert V, Pellino M, Fuchs, Ma W, Kuhlmann M, Brandt R, Vanzela ALL, Besada T, Simkova H, Pedrosa-Harand A, Houben A (2015) Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed amongst euchromatin. *PNAS* 112: 13633.
- Mandáková T, Schranz ME, Sharbel TF, de Jong H, Lysak MA (2015) Karyotype evolution in apomictic *Boechera* and the origin of the aberrant chromosomes. *Plant J* 82: 785-793.
- Mandrioli M, Bizarro D, Manicardi GC, Gionghi D, Bassoli L, Bianchi U (1999) Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Chromosoma* 108: 436-442.
- Melters DP, Paliulis LV, Korf IF, Chan SWL (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Res* 20: 579-593.
- Meštrović N, Plohl M, Mravinac B, Ugarković D (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* – experimental evidence for the “Library” Hypothesis”. *Mol Biol Evol* 15: 1062-1068.
- Muasya AM, Simpson DA, Verboom GA, Goetghebeur P, Naczi RFC, Chase MW *et al.* (2009) Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data: current progress and future prospects. *Bot Rev* 75: 2-21.
- Murat F, Xu J-H, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Res* 20: 1545-1557.

- Nagaki M, Kashihara K, Murata M (2005) Visualization of Diffuse Centromeres with Centromere-Specific Histone H3 in the Holocentric Plant *Luzula nivea*. *Plant Cell* 17: 1886-1893.
- Nei M, Rooney AP (2005). Concerted and Birth-and-Death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39: 121-152.
- Neumann P, Navrátilová A, Schroeder-Reiter E, Koblížková A, Steinbauerová V, Chocholová E, Novák P, Wanner G, Macas J (2012) Stretching the rules: monocentric chromosomes with multiple centromere domains. *PLOS Genetics* 8: e1002777.
- Neumann P, Pavlíková Z, Koblížková A, Fuková I, Jedličková V, Novak P, Macas J (2015) Centromeres off the hook: massive changes in centromere size and structure following duplication of cenH3 gene in Fabaceae species. *Mol Biol Evol* 32: 1862–1879.
- Nordenskiöld H (1963) A study of meiosis in the progeny of X-irradiated *Luzula purpurea*. *Hereditas* 49: 33-47.
- Novak P, Neumann P, Macas J (2010) Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC bioinformatics* 11: 378.
- Novak P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013) RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29: 792-793
- Paradis E (2014) An introduction to the phylogenetic comparative method. Edited by L. Zsolt Garamszegi. Springer.
- Peterson AH, Schulze SR, Sciara EB, Lee SA, Bowers JE, Nagel A, Jiang N, Tibbitts DC, Wessler SR, Paterson AH (2002) Integration of Cot Analysis, DNA Cloning, and High-Throughput Sequencing Facilitates Genome Characterization and Gene Discovery.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B (2012) Satellite DNA Evolution. In Garrido- Ramos MA (ed). Repetitive DNA. *Genome Dyn.* Basel, Karger, 2012, vol 7, pp 126–152
- Ribeiro T (2012) Evolução do DNA satélite subtelomérico *hipu* no gênero *Phaseolus* L. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFPE, pp. 120.
- Roalson EH, McCubbin AG, Whitkus R (2007) Chromosome Evolution in Cyperales. *Aliso* 23: 62-71.
- Sahara K, Yoshida A, Marec F, Fuková I, Zhang H-B, Wu C-C, Goldsmith MR, Yasukochi Y (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a

- chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* 50:1061-1065.
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998) Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci* 3: 195-199.
- Sharma S, Raina SN (2005). Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 109: 15-26.
- Simpson DA, Muasya AM, Alves MV, Bruhl JJ, Dhooge S, Chase MW *et al.* (2007) Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data – a new *rbcL* analysis. *Aliso* 23: 72-83.
- Sousa A, Barros e Silva AE, Cuadrado A, Loarce Y, Alves MV, Guerra M (2011) Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the “chromosome field” hypothesis. *Micron* 42: 625-631.
- Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M (2012) Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Ann Bot* 109: 987-999.
- Sumner AT (2002). *Chromosomes organization and function* 1a ed. Berlim: Blackwell Publising, pp 294.
- Steflova P, Tokan V, Vogel I, Lexa M, Macas J, Novak P, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2013) Contrasting patterns of transposable element and satellite distribution on sex chromosomes (XY1Y2) in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Genome Biology and Evolution* 5: 769–782.
- Szinay D, Wijnke E, van den Berg R, Visser RGF, de Jong H, Bai Y (2012) Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH. *New Phytol* 195: 688–698.
- Yoshido A, Yasukochi Y, Sahara K (2011) *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochem Molec Biol* 41: 370e377.
- The International Brachypodium Initiative. 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763–768.
- Vaio M, Gardner A, Emshwiller E, Guerra M (2013) Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections *Corniculatae* and *Ripariae* (Oxalidaceae). *Mol Phylogenet Evol* 68: 199-211.

- Vanzela ALL, Cuadrado Angeles, Jouve N, Luceño M, Guerra M (1998) Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chrom Res* 6: 345-349.
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M (2000) Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Bot J Linn Soc* 134: 557-566.
- Vanzela ALL, Guerra M (2000) Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* 23: 453-456.
- Viguera E, Canceill, D, Ehrlich SD (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20: 2587-2595.
- Zhang H, Koblizková A, Wang K, Gong Z, Oliveira L, Torres GA, Wu Y, Zhang W, Novák P, Buell CR, Macas J, Jiang J (2014) Boom-Bust turnovers of megabase-sized centromeric DNA in *Solanum* species: rapid evolution of DNA sequences associated with centromeres. *Plant Cell* 26: 1436-1447.
- Zhang L, Xu C, Yu W (2012) Cloning and characterization of chromosomal markers from a Cot-1 library of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Cytogenet Genome Res* 137: 31–41.

4. Capítulo 1: Artigo a ser submetido ao periódico

Botanical Journal of the Linnean Society

Cromossomos holocêntricos estão condenados à mudança? Variação cromossômica numérica limitada no gênero *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae)

Tiago Ribeiro¹, Christopher Buddenhagen², Wayt Thomas³, Gustavo Souza¹ and Andrea Pedrosa-Harand^{1,*}

¹Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

²Department of Biology, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA

³Institute of Systematic Botany, New York Botanical Garden, Bronx, New York, USA.

*Para correspondência: andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br

RESUMO

A evolução cariotípica em espécies com centrômeros não localizados (cromossomos holocêntricos) mostra-se altamente dinâmica e associada a eventos recorrentes de fusão e fissão. Em *Rhynchospora* (Cyperaceae), todas as espécies analisadas apresentam cromossomos holocêntricos e variação indo entre $2n = 4$ (*R. tenuis*) e $2n = 58$ (*R. globosa*). Em conjunto com a poliploidia, eventos de disploidia (fusão/fissão) têm sido sugeridos com uma força motriz no remodelamento dos cariótipos. Entretanto, a evolução do número cromossômico em um contexto filogenético não foi estudada até então. Registros numéricos para 30 espécies, incluindo duas novas contagens, foram utilizados para a reconstrução de número cromossômico ancestral em *Rhynchospora*. Adicionalmente, o conteúdo de DNA foi estimado para seis espécies, bem como o número e posição de sítios de DNA ribossomal, para testar uma origem por poliploidia versus disploidia ascendente em alguns taxa. De forma geral, a maioria das linhagens manteve um cariótipo de $2n = 10$ (~ 45% das espécies), o candidato mais provável para número ancestral do gênero. Espécies com números cromossômicos altos ($2n = 26$ e $2n = 36$) ficaram restritas a um clado, o qual pode ter se originado por uma combinação de poliploidia e disploidia. Adicionalmente, um complexo evento de disploidia descendente levou ao cariótipo extremamente reduzido de *R. tenuis* ($2n = 4$), enquanto um simples evento de fissão originou o cariótipo $2n = 12$. Embora diferentes mecanismos de evolução cariotípica atuem em diferentes linhagens, o grau de variação cromossômica encontrado é comparável a grupos de espécies com cromossomos monocêntricos. A poliploidia parece ocorrer em mais de uma linhagem e fusão/fissão, resultando em disploidias, atuam localmente na modificação dos cariótipos.

Palavras-chave: reconstrução de número cromossômico; filogenia molecular; evolução cariotípica; poliploidia; disploidia; conteúdo de DNA; DNA ribossomal.

INTRODUÇÃO

O cariótipo é representando pelo conjunto total de cromossomos de um organismo e pode variar significativamente em tamanho, formato e composição entre diferentes grupos, mesmo naqueles intimamente relacionados (Schubert, 2007). Na grande maioria das espécies, o cariótipo é composto de cromossomos que possuem uma única e bem definida constrição primária que serve de local para montagem do cinetócoro e associação dos microtúbulos, o centrômero. Essa região, no chamado cromossomo monocêntrico, é importante na segregação e evolução do cariótipo (Verdaasdonk e Bloom, 2011).

Diferentes mecanismos estão envolvidos nas mudanças cariotípicas e podem levar a perdas e ganhos de DNA, bem como a rearranjos cromossômicos. Neste último caso, as mudanças estruturais podem estar atreladas à mudanças numéricas (disploidias), levando a eliminação de DNA por meio da formação de fragmentos instáveis após translocações assimétricas (reviewed por Schubert and Lysak, 2011). Em espécies com monocêntricos, portanto, a evolução cromossômica é fortemente influenciada pela presença de uma unidade centromérica simples.

Diversos organismos, incluindo as famílias de plantas Cyperaceae e Juncaceae, apresentam cromossomos sem centrômeros localizados. Os chamados cromossomos holocinéticos ou holocêntricos não apresentam uma constrição primária e a atividade cinetocórica está presente ao longo de quase toda a superfície lateral da cromátide. Essa organização estrutural peculiar permite que fragmentos originados de cromossomos holocêntricos permaneçam viáveis e sejam herdados durante a divisão celular, em uma frequência maior comparada a monocêntricos (Melters et al. 2012; Heckmann e Houben, 2013), como observado, por exemplo, em plantas irradiadas de *Luzula elegans* (Jankowska et al. 2015). Similarmente, eventos de fusão em holocêntricos não acarretariam na formação de cromossomos instáveis (ver, por exemplo, Yoshido et al., 2011). Como consequência, diversos estudos têm sugerido que eventos de fusão/fissão sejam os principais mecanismos de evolução cariotípica em espécies com holocêntricos (Luceño et al. 1996; Roalson et al. 2007), estando associados também às rápidas taxas de mudanças no número cromossomo observadas em alguns grupos com *Carex* (Cyperaceae; Roalson et al. 2008; Hipp et al. 2009).

Rhynchospora apresenta cerca de 380 espécies descritas e foi objeto de diversos estudos citogenéticos nos últimos 20 anos. As contagens cromossômicas variam de $2n = 4$ em *R. tenuis* (Vanzela et al. 1996) a $2n = 58$ em *R. globosa* (Arguelho et al. 2012) com $2n = 10$

sendo o cariótipo mais frequente entre diversos outros ($2n= 8, 12, 18, 20, 24, 26, 30, 36, 37, 45, 48, 50$; ver Luceño et al. 1998; Vanzela et al. 2000; Arguelho et al. 2012 para mais informações).

Devido à alta dinamicidade dos cariótipos com cromossomos holocêntricos, um mesmo número cromossômico pode surgir como produto de convergência. Ao mesmo tempo, cariótipos distintos podem estar presentes em espécies relacionadas, resultando na perda do sinal filogenético para número cromossômico em um grupo com holocêntricos. Visando testar esta suposição e discutir o papel da disploidia (fusão/fissão) e poliploidia na evolução cariotípica de *Rhynchospora*, o presente estudo combinou a reavaliação de contagens cromossômicas prévias e distribuição de sítios de DNA ribossomal, em conjunto com a estimativa do tamanho do genoma em espécies selecionadas. Estas informações foram usadas para avaliar o sinal filogenético do número cromossômico na diversificação do gênero (Buddenhagen et al., in press) .

MATERIAL E MÉTODOS

Contagens cromossômicas

Botões florais de *R. elatior* e *R. radicans* e raízes de *R. globosa* foram coletados de plantas sob cultivos. O material foi fixado em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 2 h a temperatura ambiente e estocado à -20°C até o uso. As preparações cromossômicas seguiram o protocolo descrito em Ruban et al. (2014), para botões florais, ou em Carvalho e Saraiva (1993), para raízes, com pequenas modificações. As melhores células foram coradas com $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Sigma), sendo as imagens capturadas em um microscópio Leica DM5500B equipado com uma câmera CCD (Leica DFC345 FX).

Hibridização in situ fluorescente (FISH)

As lâminas foram preparadas a partir de raízes de espécies selecionadas (Tabela 1) e pré-tratadas com 2 mM 8-hidroxiquinoleína à 10°C por 20 horas, fixadas em metanol/ácido acético 3:1 (v/v) e estocadas à -20°C , seguindo uma modificação do protocolo descrito em Carvalho e Saraiva (1993). Os meristemas foram tratados com uma mistura enzimática contendo $1,4\%$ celulase R10 (Duchefa), $1,4\%$ celulose (Calbiochem), $2,0\%$ pectoliase (Sigma), e $2,0\%$ citohelicase (Sigma) em $1\times$ tampão citrato por 1h – 1h 30 min à 37°C e lavadas em $1\times$ tampão citrato. As raízes foram então colocadas em uma lâmina inclinada,

lavadas com fixador gelado (metanol/ácido acético 3:1) e maceradas em pequenos pedaços com o auxílio de agulhas. O macerado foi novamente gotejado com fixador gelado e a lâmina deixada secar ao ar. Posteriormente, as mesmas foram imersas em ácido acético 45% por 5 min e incubadas à 37° C até completa secagem.

As sonda para DNA ribossomal (DNAr) 5S (plasmídeo Rhyn2; Sousa et al., 2011) e 45S (plasmídeo pTa71; Gerlach e Bedbrook, 1979) foram obtidas por minipreparação seguindo recomendações do kit Qiagen Mini prep. O Pré-tratamento das lâminas, o mix de hibridização e a desnaturação das lâminas foram realizados segundo Fonsêca et al. (2010).

Estimativa do tamanho do genoma

Medições do conteúdo de DNA nuclear foram realizadas para *R. cephalotes*, *R. ciliata*, *R. holoschoenoides*, *R. radicans*, *R. ridleyi* e *R. tenerrima* (Tabela 1) usando o tampão WPB de acordo com Loureiro et al. (2007). As análises foram realizadas em um citômetro Partec CyFlow SL equipado com o software Flomax (Partec). Três estimativas independentes usando um (*R. cephalotes*, *R. holoschoenoides*, *R. radicans* e *R. tenerrima*) ou três (*R. ciliata* e *R. ridleyi*) indivíduos foram realizadas em dias diferentes. *Glycine max* (L.) Merr. “Polanka” (2C = 2.55 pg) foi usada como controle interno (Doležel et al., 2007) e o valor 2C foi calculado como: média do pico da amostra/ média pico do controle × valor 2C do controle (pg).

Reconstrução do número cromossômico ancestral

Dados cromossômicos de *R. elatior* e *R. radicans* foram combinados com contagens prévias para 28 espécies de *Rhynchospora* publicadas na literatura (Tabela 1; Luceño et al. 1998; Vanzela et al. 2000; Vanzela et al. 1996 e Arguelho et al. 2012). Uma filogenia do gênero baseada no marcador plastidial *trnL-F* e em genes nucleares (Thomas et al., 2009; Buddenhagen et al., in press; Buddenhagen et al., dados não publicados) foi usada para inferir o número cromossômico ancestral diploide (2n) usando máxima verossimilhança no software Mesquite v.2.75 (Maddison and Maddison, 2011), na qual todas as mudanças apresentam igual probabilidade de ocorrer.

RESULTADOS

Os números cromossômicos previamente descritos para *Rhynchospora* foram sumarizados na Tabela 1 e Tabela Suplementar 1, em conjunto com as novas contagens realizadas para *R. elatior* ($2n = 12$) e *R. radicans* ($2n = 10$) e para um novo citótipo de *R. globosa* ($2n = 50$) (Figura suplementar 1). A variação observada foi de $2n = 4$ em *R. tenuis* a $2n = 58$ em *R. globosa*, com $2n = 10$ sendo o número mais frequente (~45 %). Dois níveis de ploidia foram encontrados em *R. setigera*, *R. confinis*, *R. holoschoenoides* ($2n = 10$ e 20) e *R. tenuis* ($2n = 4$ e 8), enquanto três foram descritos em *R. nervosa* ($2n = 10$, 20 e 30) e quatro em *R. globosa* ($2n = 24$, 36 , 37 , 45 , 48 e 58). Neste último caso, $2n = 24$ possivelmente representa um citótipo tetraploide, $2n = 36$ um hexaploide, $2n = 48$ um octaploide e $2n = 37$, 45 e 58 , citótipos disploides. Apenas o número cromossômico mais baixo presente em cada espécie foi usado na reconstrução do número cromossômico ancestral.

Quando plotados na filogenia de *Rhynchospora*, um cariótipo composto de 10 cromossomos ($2n = 10$) foi sugerido como o ancestral mais provável para o grupo ($p \cong 0.7$; Fig. 1). Este mesmo estado de caráter também mostrou alta probabilidade para os nós dos clados I ($p \cong 0.73$) e clados II/III ($p \cong 0.8$). A maioria das espécies dos dois primeiros clados manteve este número ancestral, com mudanças ocorrendo apenas em poucas linhagens. O cariótipo $2n = 12$ foi encontrado em táxons não relacionadas dos clados I (*R. elatior*) e clado III (*R. ridieliana* e *R. ridleyi*) (Fig. 1). Similarmente, $2n = 18$ foi detectado em *R. scutellata*/*R. comrymbosa*/*R. gigantea* (clado I), bem como em *R. cephalotes* (clado III). No clado II, em conjunto com espécies com $2n = 10$, *R. tenuis* mostrou uma drástica redução para $2n = 4$, com descrição de indivíduos poliploides ($2n = 8$). Em contraste, o clado III mostrou uma grande diversidade, englobando todas as espécies com números cromossômicos mais altos ($2n = 26$ e 36), juntamente com outros cariótipos ($2n = 10$, 12 , 18 e 20).

Seis espécies com cariótipos divergentes ($2n = 10$, 12 , 18 e 20) e posicionadas em diferentes pontos da filogenia foram analisadas quanto ao tamanho do genoma (Tabela 1). *Rhynchospora ciliata* ($2C = 1.12$ pg) e *R. radicans* ($2C = 0.87$ pg), ambas com 10 cromossomos e pertencentes ao clado II, mostraram uma diferença de cerca de 30% no conteúdo de DNA. *Rhynchospora tenerrima* ($2n = 20$, clado II) e *R. holoschoenoides* ($2n = 20$, clado I) apresentaram um genoma similar, $2C = 1.25$ pg. A única espécie com $2n = 18$ analisada (*R. cephalotes*) mostrou $2C = 0.76$ pg, enquanto *R. ridleyi* ($2n = 12$) apresentou um genoma de 1.02 pg (Tabela 1).

A distribuição dos sítios de DNAr foi obtida de dados publicados (para oito espécies) e combinada com os novos resultados do presente trabalho (seis espécies; Fig. 2). No geral, o número de sítios de DNAr 45S foi extremamente variável, com dois, quatro, seis, oito, 12, 14, 16 e 18 sítios por genoma, sempre em posição terminal (t) e sem relação com o número cromossômico ou nível de ploidia (Tabela 1 e Tabela Sup. 1). Para o DNAr 5S, ao contrário, apenas dois, três ou quatro sítios foram observados, mais frequentemente em posição intersticial (i), mas também nos terminais cromossômicos em duas espécies. *Rhynchospora tenuis* (citótipo tetraploide, $2n = 4x = 8$) apresentou congruência com um registro prévio para o DNAr 45S, com quatro sítios terminais identificados (Fig. 2a). Este mesmo número foi descrito para *R. radicans* ($2n = 2x = 10$; Fig. 2b) e *R. tenerrima* ($2n = 4x = 20$, Fig. 2c'), enquanto as outras espécies apresentaram um número mais elevado de loci: 16 em *R. gigantea* ($2n = 4x = 18$; Fig. 2d), 14 em *R. albiceps* ($2n = 4x = 20$; Fig. 2e) e 12 em *R. ridleyi* ($2n = 2x = 12$; Fig. 2f). O DNAr 5S foi mapeado em número de 2 (Fig. 2), exceto para o padrão heterozigoto observado no potencial citotipo autotetraploide de *R. tenuis* (Fig. 2a).

DISCUSSÃO

Por meio da combinação de dados da literatura e do presente trabalho, contagens cromossômicas para 30 espécies de *Rhynchospora* foram usadas para elucidar a evolução cariotípica no gênero em um contexto filogenético. Em geral, espécies com cromossomos holocêntricos apresentam um alto potencial para variação numérica e novas combinações cromossômicas originadas de fusão/fissão (disploidia), bem como por poliploidia, podem ser herdadas de um ancestral ou surgir *de novo* (Bozek et al., 2012; Melters et al., 2012). Nossa análise, entretanto, demonstrou que o cariótipo diploide com 10 cromossomos não é apenas o mais frequente (13 de 30 taxa, ~ 45%), como está aparentemente conservado em espécies de todos os clados, confirmando o número básico de $x = 5$ para o gênero, como previamente sugerido por Luceño et al. (1998).

Alguns grupos de espécies, como partes dos clados II e III, demonstraram números cromossomos distintos. No clado III, o conjunto composto por *R. brownii* e *R. brasiliensis* ($2n = 36$) pode ter surgido de um número básico secundário ($x = 6$) por meio de poliploidia ou por uma combinação de poliploidia ($x = 5$) seguida de disploidia descendente ($2n = 10 \rightarrow$ poliploidização $\rightarrow 2n = 8x = 40 \rightarrow$ fusão $\rightarrow 2n = 36$). Similarmente, uma combinação de poliploidia e fusão pode ter sido responsável pelo surgimento do cariótipo encontrado em *R.*

scutellata, *R. comrymbosa* e *R. gigantea* (clado I). Este mesmo número ($2n = 18$) também está presente em *R. cephalotes*, espécie não relacionada, e uma origem similar ($2n = 10 \rightarrow$ poliploidização $\rightarrow 2n = 4x = 20 \rightarrow$ fusão $\rightarrow 2n = 18$) pode ser reiterada pela presença de um citótipo disploide ($2n = 19$; Luceño et al., 1998b). Adicionalmente, um evento único de disploidia ascendente ($2n = 10 \rightarrow$ fissão $\rightarrow 2n = 12$) pode estar envolvido na formação do cariótipo com 12 cromossomos. Entretanto, origens divergentes para $2n = 12$ e $2n = 18$ não podem ser descartadas, uma vez que ambos os cariótipos aparecem como homoplásicos na filogenia (ver Fig. 1).

Uma variação similar foi observada para o gênero *Luzula* (Juncaceae), quando os números cromossômicos foram discutidos em um contexto filogenético. As espécies apresentaram um número cromossômico mais frequente ($2n = 2x = 12$), conservado em algumas linhagens, como disploidias ascendentes e descendentes identificadas ao longo da árvore (Božek et al. 2012; Drábková, 2013). Dois casos de redução drástica no número, *L. elegans* e *L. purpureo-splendes* ($2n = 2x = 6$), sugerem que eventos mais complexos (envolvendo diversos rearranjos) tenham originado estes dois cariótipos. No caso de *Rhynchospora*, o menor número cromossômico (*R. tenuis*, $2n = 2x = 4$ e $4x = 8$; Vanzela et al. 1996), mostrou-se relacionado a espécies com $2n = 10$ (presente trabalho, Buddenhagen et al., in press), sugerindo que o mesmo seja um estado derivado originado por meio de disploidia descendente a partir de $2n = 10$. Entretanto, evidências de fusões (i.e. sítios teloméricos intersticiais) não foram detectadas em *R. tenuis* (Vanzela et al. 2003) e *L. elegans* (Heckmann et al. 2011).

Para cromossomos holocêntricos, as variações numéricas seriam esperadas em uma frequência muito maior do que a observada em *Rhynchospora*, com suporte adicional vindo de experimentos de radiação induzida e análises meióticas. Fragmentos cromossômicos gerados em *L. elegans* (Jankowska et al., 2015) e *R. pubera* (Vanzela et al., 2001) foram transmitidos regularmente para a prole. Da mesma forma, a presença de grãos de pólen com diferentes números cromossômicos em uma planta disploide de *R. pubera* ($2n = 11$; Cabral et al., 2014) sugere um grande potencial para variações numéricas nessas espécies.

O tamanho do genoma foi analisado para diferentes espécies ao longo da filogenia e apresetado aqui pela primeira vez. Nessa pequena amostra (representando 3,5% do gênero), os genomas variaram de 0,76 pg em *R. cephalotes* com $2n = 18$ a 1.25 pg em *R. holoschoenoides* com $2n = 20$. Espécies com 10 cromossomos quase não diferiram uma da outra (*R. ciliata* e *R. radicans*) e nem daquelas com pequena (*R. ridleyi*; $2n = 12$) ou grande variação numérica (*R.*

cephalotes; $2n = 18$). Comparado com *R. pubera* ($2n = 10$ e $2C = 3.3$ pg, Marques et al., 2015), entretanto, uma variação significativa para o tamanho do genoma e dos cromossomos foi detectada, sugerindo que outros processos, como amplificação de elementos repetitivos (Chénaïs et al. 2012; Michael, 2014), também são responsáveis pelas variações no tamanho dos genomas. Interessantemente, duas espécies tetraploides analisadas (*R. holoschoenoides* e *R. tenerrima*, $2n = 20$) exibiram genomas de tamanhos pequenos, próximo a média geral. Esta diminuição no tamanho do genoma, em detrimento ao evento de poliploidia, tem sido descrita para diversas espécies, especialmente aloploidias. Devido a um processo de diploidização, o genoma passa a se comportar funcionalmente como diploide (reviewed por Bennett and Leitch, 2005). Em *R. holoschoenoides*, a presença de um citotipo diploide ($2n = 10$) corrobora a origem do $2n = 20$ por duplicação total do genoma. Para *R. tenerrima*, entretanto, a hipótese envolvendo um ou vários eventos dispoloides ($2n = 10 \rightarrow$ fissão $\rightarrow 2n = 20$; Luceño e Guerra, 1998) não pode ser desconsiderada.

A distribuição dos sítios de DNAr revelou uma alta variabilidade em *Rhynchospora* e não pode ser usada como indício para uma origem poliploide. Diferentes espécies com aparentemente o mesmo nível de ploidia mostraram quantidade de sítios de DNAr 45S completamente distinta (e. g. *R. albiceps* e *R. holoschoenoides*), ambas com $2n = 4x = 20$, e 14 e 6 loci, respectivamente (Sousa et al., 2011). Mesmo nos casos onde mais de um citotipo foi identificado para uma mesma espécie, a duplicação no número de sítios entre os níveis $2x$ e $4x$ não foi observada, como para o DNAr 5S em *R. tenuis*.

A correlação entre tamanho do genoma e número cromossômico na evolução cariotípica têm sido investigada em outros grupos com cromossomos holocêntricos (Bureš et al. 2013), como *Carex* (Lipnerová et al. 2012). Uma correlação negativa mostrando um aumento no número de cromossomos associado à diminuição no tamanho do genoma, ou o processo contrário, tem sido sugerido como mecanismo de evolução caritípica (Bureš e Zedek, 2014). Em *Luzula*, o cariótipo de *L. sudetica* sugere uma origem por um complexo evento de dispoloidia ascendente. Numerosos e pequenos cromossomos ($2n = 48$) compõem um genoma extremamente compacto ($2C = 0.80$ pg), com tamanho próximo ao encontrado em espécies com $2n = 12$ do mesmo clado (*L. campestris*; $2C = 0.82$ ou *L. pallescens*; $2C = 0.87$; Bozek et al., 2012). Em *Rhynchospora*, entretanto, devido à escassez de dados referentes a conteúdo de DNA, não foi possível associar o tamanho do genoma e número cromossômico em fina escala. Contudo, em *R. tenuis* (o menor complemento cromossômico no gênero) a redução extrema no número de cromossomos parece não estar associada a diferenças drásticas

no conteúdo de DNA [$2n = 4$ e 0.78 pg (2C; Feitoza L, dados não publicados)], o qual se assemelha ao encontrado em espécies relacionadas com 10 cromossomos. Ao contrário, na Juncaceae *L. elegans*, o evento de redução para $2n = 6$ foi associado com aumento no tamanho do genoma (8.55 pg; Bozek et al. 2012), provavelmente devido à amplificação de elementos repetitivos (61% do genoma) (Heckmann et al. 2012).

Os padrões de evolução cariotípica diferem entre as ciperáceas estudadas até então (e.g. *Carex*, *Eleocharis*), onde a combinação de eventos de fusão/fissão cromossômicas, poliploidia e mudanças no tamanho do genoma por meio da proliferação de elementos transponíveis estão envolvidos nas variações genômicas (e.g. Zedek et al. 2010; Lipnerová et al. 2012). Para *Rhynchospora*, embora novas contagens cromossômicas pudessem ser úteis no estabelecimento dos padrões de evolução cariotípica de uma forma mais abrangente, os mesmos processos parecem estar atuando em uma escala mais limitada. As mudanças no tamanho do genoma e número cromossômico foram detectadas em linhagens específicas numa escala parecida com a observada em espécies com monocêntricos, como nos gêneros de plantas *Oxalis* (Vaio et al., 2014) e *Typhonium* (Sousa et al., 2014) ou em lagartos do gênero *Anolis* (Castiglia et al., 2013). O cariótipo $2n = 10$, confirmado como o estado ancestral, se modificou em todo um clado e independentemente em algumas espécies por meio de poliploidia. Os eventos de disploidia (fusões/fissões) parecem atuar localmente na modificação dos cariótipos, principalmente em casos específicos (i.e. *R. tenuis*). A presença de cromossomos holocêntricos, portanto, parece não promover uma grande flexibilidade ao genoma das espécies de *Rhynchospora*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco; APQ-2008-2.02/12) pelo suporte financeiro.

Tabela 1. Caracterização do tamanho do genoma (valor 2C) e/ou distribuição dos sítios de DNA ribossomal (DNAr) em espécies selecionadas de *Rhynchospora*.

Espécie	Número cromossômico (2n)	Valor 2C ± SD (pg)	DNAr (número diploide)		Número de voucher
			5S	45S	
<i>R. albiceps</i> Kunth	2n = 20	-	2i ^a	14t	-
<i>R. cephalotes</i> (L.) Vahl	2n = 18	0.76±0.01	2i	2t ^b	-
<i>R. ciliata</i> (Vahl) Kükenth	2n = 10	1.12±0.02	2i	4t ^b	UFP 81019
<i>R. elatior</i> Kunth	2n = 12	-			UFP 81015
<i>R. gigantea</i> Link	2n = 18	-	2t	16t	UFP 81018
<i>R. globosa</i> (Kunth) Roem. & Schult.	2n = 50	-	-	-	UFP 81021
<i>R. holoschoenoides</i> (Rich.) Herter	2n = 20	1.25±0.03	4i	6t ^b	-
<i>R. radicans</i> (Schltdl. & Cham.) H. Pfeiff.	2n = 10	0.87±0.01	2i	4t	UFP 81016
<i>R. ridleyi</i> C.B.Clarke	2n = 12	1.02±0.01	2t	12t	UFP 81020
<i>R. tenuis</i> Link (diploid)	2n = 4	-	2i	2t ^b	UFP 81022
<i>R. tenuis</i> Link (tetraploid)	2n = 8	-	3i	4t	-
<i>R. tenerrima</i> Nees ex Spreng.	2n = 20	1.25±0.01	2i	4t	UFP 81017

^a i: intersticial; t: terminal. ^b ver Tabela Suplementar 1 para referências.

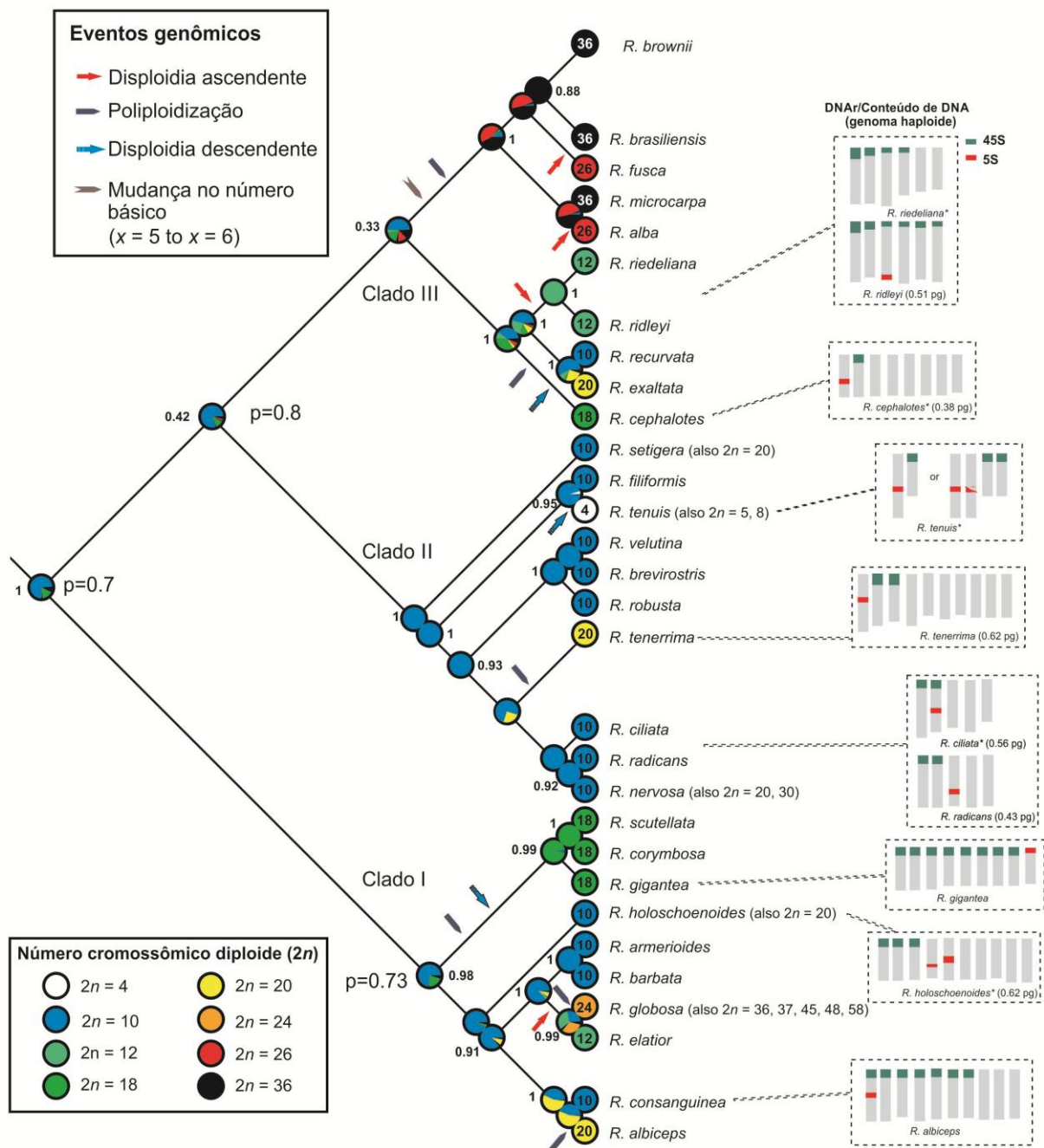


Figura 1. Reconstrução do número cromossômico ancestral para o gênero *Rhynchospora*. Números cromossômicos diploides correspondentes aos círculos coloridos são descritos no quadro no canto inferior esquerdo. A localização aproximada dos sítios de DNAr (5S em vermelho e 45S em verde), assim como tamanho de genoma, são apresentados para espécies selecionadas. Relações filogenéticas foram baseadas em Buddenhagen et al. (in press), Thomas *et al.*, (2009) e Buddenhagen et al., (dados não publicados). Asteriscos denotam informações sobre o DNAr retiradas de dados publicados (ver Tabela suplementar 1 para maiores detalhes).

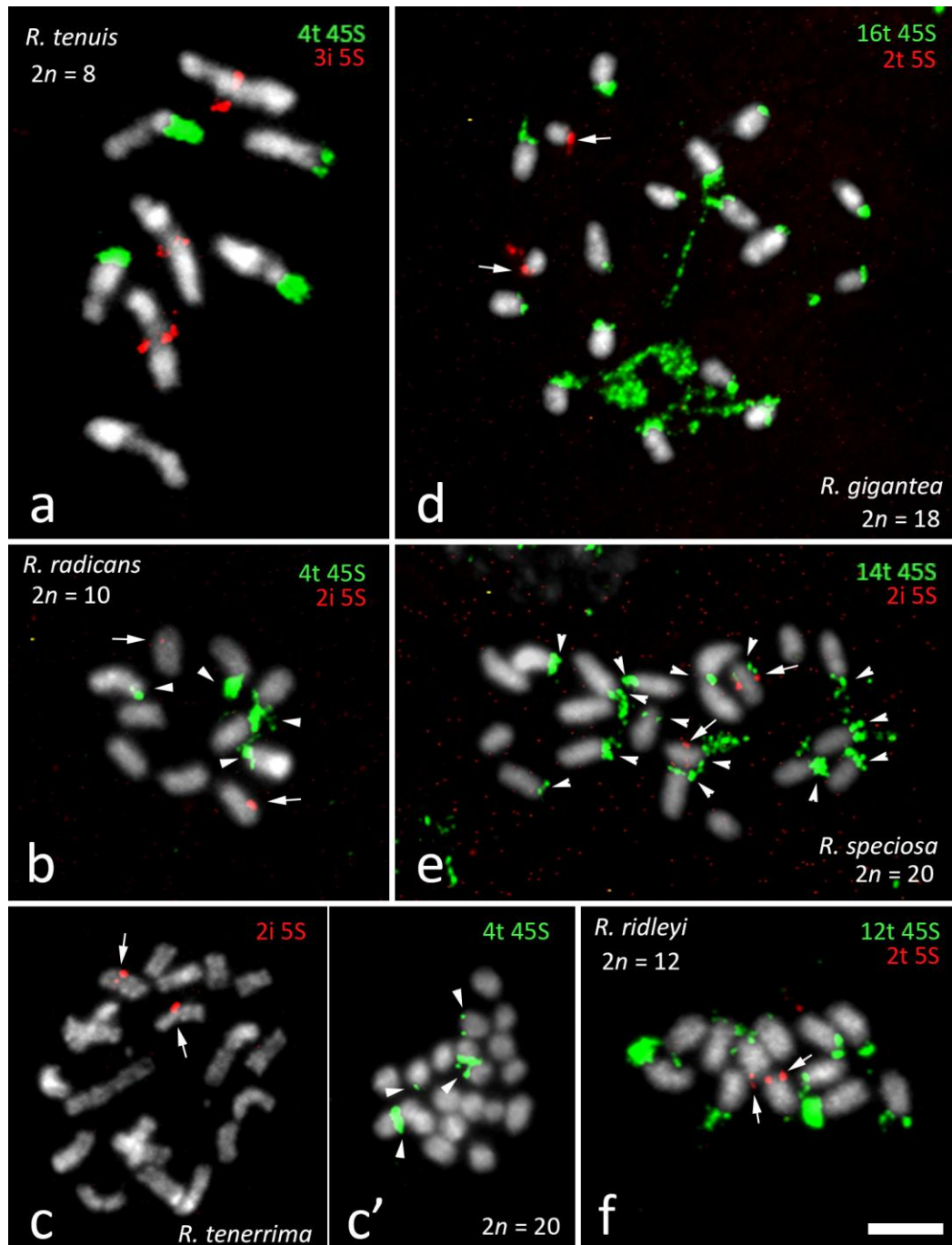


Figura 2. Distribuição dos sítios de DNAr em cromossomos metafásicos de espécies de *Rhynchospora*. Cabeças-de-seta apontam os sítios de DNAr 45S (verde), enquanto as setas indicam os cromossomos com DNAr 5S (vermelho) em casos específicos. Os números cromossômicos, bem como a posição dos sítios (t = terminal, i = intersticial), também são indicados. Barra em f = 5 μ m.

REFERÊNCIAS

- Arguelho EG, Michelan VS, Nogueira FM, Da Silva CRM, Rodriguez C, Trevisan R, Vanzela ALL (2012) New chromosome counts in Brazilian species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Caryologia* 65: 140-146
- Alves M, Araújo AC, Prata AP, Vitta F, Hefler S, Trevisan R, Gil ASB, Martins S, Thomas W (2009) Diversity of Cyperaceae in Brazil. *Rodriguésia* 60: 771-782.
- Bennett MD, Leitch IJ (2005) Genome size evolution in plants. The evolution of the genome. Edited By T. Ryan Gregory. Elsevier Academic Press.
- Božek M, Leitch AR, Leitch IJ, Drábková LZ, Kuta E (2012) Chromosome and genome size variation in *Luzula* (Juncaceae), a genus with holocentric chromosomes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 529–541.
- Bureš P, Zedek F (2014) Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromere. *Evolution* 68: 2412–2420.
- Cabral G, Marques A, Schubert V, Pedrosa-Harand A, Schlögelhofer P (2014) Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. *Nature Communications* 5: 5070.
- Carvalho CR, Saraiva LS (1993) An air dry technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic and Histochemistry* 68: 142-145.
- Castiglia R, Flores-Villela O, Bezerra AMR, Munoz A, Gornund E (2013) Pattern of chromosomal changes in 'beta' *Anolis* (Norops group (Squamata: Polychrotidae) depicted by and ancestral state analysis. *Zoological studies* 52: 60.
- Chénais B, Caruso A, Hiard S, Casse N (2012) The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene* 509: 7-15.
- Drábková LZ (2013) A survey of karyological phenomena in the Juncaceae with emphasis on chromosome number variation and evolution. *Bot Rev* 79: 401-446.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2: 2233–2244.
- Fonsêca A, Ferreira J, Santos TRB, Mosiolek M, Belluci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research* 18: 487-502.
- Heckmann S, Schroeder-Reiter E, Kumke K, Ma L, Nagaki K, Murata M, Wanner G, Houben A (2011) Holocentric chromosomes of *Luzula elegans* are characterized by a

- longitudinal centromere groove, chromosome bending, and a terminal nucleolus organizer region. *Cytogenet Genome Res* 134: 220–228.
- Heckmann S, Macas J, Kumke K, Fuchs J, Schubert V, Ma L, Novák P, Neumann P, Taudien S, Platzer M, Houben A (2012) The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *The Plant Journal* 73: 555-565.
- Heckmann S, Houben A (2013) Holokinetic centromeres. *Plant centromere Biology*, First Edition. Edited by Jiming Jiang and James A. Bichler. 2013. John Willey & Sons, INC.
- Hipp AL, Rothrock PE, Roalson EH (2009) The evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *Bot Rev* 75: 96-109.
- Jakowska M, Fuchs J, Klocke E, Fojtová M, Polanská P, Fajkus J, Schubert V, Houben A (2015) Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. *Chromosoma* DOI.
- Lipnerová I, Bureš P, Horová L, Šmarda P (2012) Evolution of genome size in *Carex* (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition. *Annals of Botany* 111: 79-94.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany* 100: 875-888.
- Luceño M, Guerra M (1996) Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 49: 301-309.
- Luceño M, Vanzela ALL, Guerra M (1998) Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can J Bot* 76: 440-449.
- Luceño M, Mendes AP, Vanzela ALL, Alves MV (1998b) Agmatoploidy and Symploidy in *Rhynchospora cephalotes* (L.) Vahl (Cyperaceae). *Cytologia* 63: 79-81.
- Maddison WP, Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- Marques A, Ribeiro T, Neumann P, Macas J, Novak P, Schubert V, Pellino M, Fuchs, Ma W, Kuhlmann M, Brandt R, Vanzela ALL, Besada T, Simkova H, Pedrosa-Harand A, Houben A (2015) Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed amongst euchromatin. *PNAS* 112: 13633.

- Melters DP, Paliulis LV, Korf IF, Chan SWL (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* 20: 579-593.
- Michael TP (2014) Plant genome size variation: bloating and purging DNA. *Briefings in Functional Genomics* 13: 308-317.
- Roalson EH, McCubbin AG, Whitkus R (2007) Chromosome evolution in Cyperales. *Aliso* 23: 62-71.
- Roalson EH (2008) A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. *Bot Rev* 74: 209-393.
- Ruban A, Fuchs J, Marques A, Schubert V, Soloviev A, Raskina O, Badaeva E, Houben A (2014) B Chromosomes of *Aegilops speltoides* are enriched in organelle genome-derived sequences. *PLoS One* 9: 2.
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109–115.
- Schubert I, Lysak MA (2011) Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics* 27: 207-216.
- Sousa A, Barros e Silva AE, Cuadrado A, Loarce Y, Alves MV, Guerra M (2011) Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the "chromosome field" hypothesis. *Micron* 42: 625-631.
- Sousa A, Cusimano N, Renner S (2014) Combining FISH and model-based predictions to understand chromosome evolution in *Typhonium* (Araceae). *Ann Bot* 113: 669-80.
- Thomas WW, Araújo AC, Alves MV (2009) A Preliminary molecular phylogeny of the Rhynchosporae (Cyperaceae). *Bot Rev* 75: 22-29.
- Vaio M, Gardner A, Emshwiller E, Guerra M (2013) Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections Corniculatae and Ripariae (Oxalidaceae). *Mol Phylogenet Evol* 68: 199-211.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceno M (1996) *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios* 88 (355):219-228.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Jouve L, Luceño M, Guerra M (1998) Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chromosome Research* 6: 345-350.
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M (2000) Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Bot J Linn Soc* 134: 557-566.

- Vanzela ALL, Cuadrado A, Guerra M (2003) Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology* 26: 199-201.
- Verdaasdonk JS, Bloom K (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nature Reviews* 12: 320-332.
- Yoshido A, Yasukochi Y, Sahara K (2011) *Samia Cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochem Molec Biol* 41: 370-377.
- Zedek F, Šmerda J, Šmarda P, Bureš P (2010) Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. *BMC Plant Biology* 10: 265.

Tabela suplementar 1. Sumário dos números cromossômicos e distribuição dos sítios de DNA ribossomal (DNAr) publicados para *Rhynchospora*.

Espécie	2n	DNAr (número diploide)		Referência
		5s	45S	
<i>R. alba</i> (L.) Vahl	26	-	-	Luceño et al. 1998
<i>R. albiceps</i> Kunth	20	-	-	Vanzela et al. 2000-
<i>R. armerioides</i> J.Presl & C.Presl.	10	-	-	Luceño et al. 1998
<i>R. barbata</i> (Vahl) Kunth	10	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. brasiliensis</i> Boeckeler	ca. 36	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. brevirostris</i> Griseb.	10	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. brownie</i> Roem. & Schult.	36	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. cephalotes</i> (L.) Vahl	18	2 i	2 t	Vanzela et al. 2000; Sousa et al. 2011
<i>R. ciliata</i> Kük	10	2 i	4 t	Vanzela et al. 2000; Sousa et al. 2011
<i>R. ciliolata</i> Boeckeler	10	-	-	Luceño et al. 1998
<i>R. confinis</i> (Nees) C.B.Clarke.	10, 20	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. corymbosa</i> (L.) Britton.	18	-	-	Luceño et al. 1998
<i>R. consaguinea</i> (Kunth) Boeckeler	10	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. emaciata</i> (Nees) Boeckeler	10	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. exaltata</i> Kunth	20	-	-	Luceño et al. 1998
<i>R. filiformis</i> Vahl	10	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. fusca</i> (L.) W.T.	26	-	-	IPCN (2013)
<i>R. gigantea</i> Link	18	-	16t	Luceño et al. 1998;

<i>R. globosa</i> (Kunth)	24, 36, 36, 37, 45,	-		Luceño et al., 1998
Roem. & Schult.	and 58			
	36, 45 and 58	-		Arguelho et al. 2012
<i>R. holoschoenoides</i>	10	-		Luceño et al. 1998
(Rich.) Herter.				
	20	4i	6t	Luceño et al. 1998;
				Sousa et al. 2011
<i>R. pubera</i> L.	10	6-8i e 4t	6t	Sousa et al., 2011
<i>R. marisculus</i> Nees	36	-	-	Vanzela et al. 2000
ex Lindl. & Nees				
<i>R. microcarpa</i>	36	-	-	Luceño et al. 1998
Baldwin ex A.				
Gray.				
<i>R. nervosa</i> (Vahl)	10	-	-	Arguelho et al. 2012
Boeckeler				
	20, 30	-	-	Luceño et al. 1998
<i>R. recurvate</i>	10	-	-	Luceño et al. 1998
(Nees) Steud.				
<i>R. ridleyi</i> C. B.	12	-		Vanzela et al. 2000
Clarke				
<i>R. riedeliana</i> C.B.	12	-	8t	Vanzela et al. 1998;
Clarke				Vanzela et al. 2000
<i>R. robusta</i> (Kunth)	10	-	-	Vanzela et al. 2000
Boeck.				
<i>R. rugosa</i> (Vahl)	36	-	-	Vanzela et al. 2000
Gale				
<i>R. setigera</i> Griseb	10, 20	-	-	Vanzela et al. 2000
<i>R. scutellata</i>	18	-	-	Luceño et al. 1998
Griseb				
<i>R. speciosa</i>	20	-	18t	Vanzela et al. 1998;
(Kunth) Boeckeler				Vanzela et al. 2000
<i>R. tenuis</i> Link	4	2i	2t	Vanzela et al. 1996;
				Sousa et al. 2011
	5			Arguelho et al. 2012
	8	-	-	Vanzela et al. 1996;
				Vanzela et al. 1998

<i>R. tenerrima</i> Nees ex Spreng.	20			Vanzela et al. 2000;
<i>R. velutina</i> (Kunth) Boeckeler	10	-	-	Arguelho et al. 2012

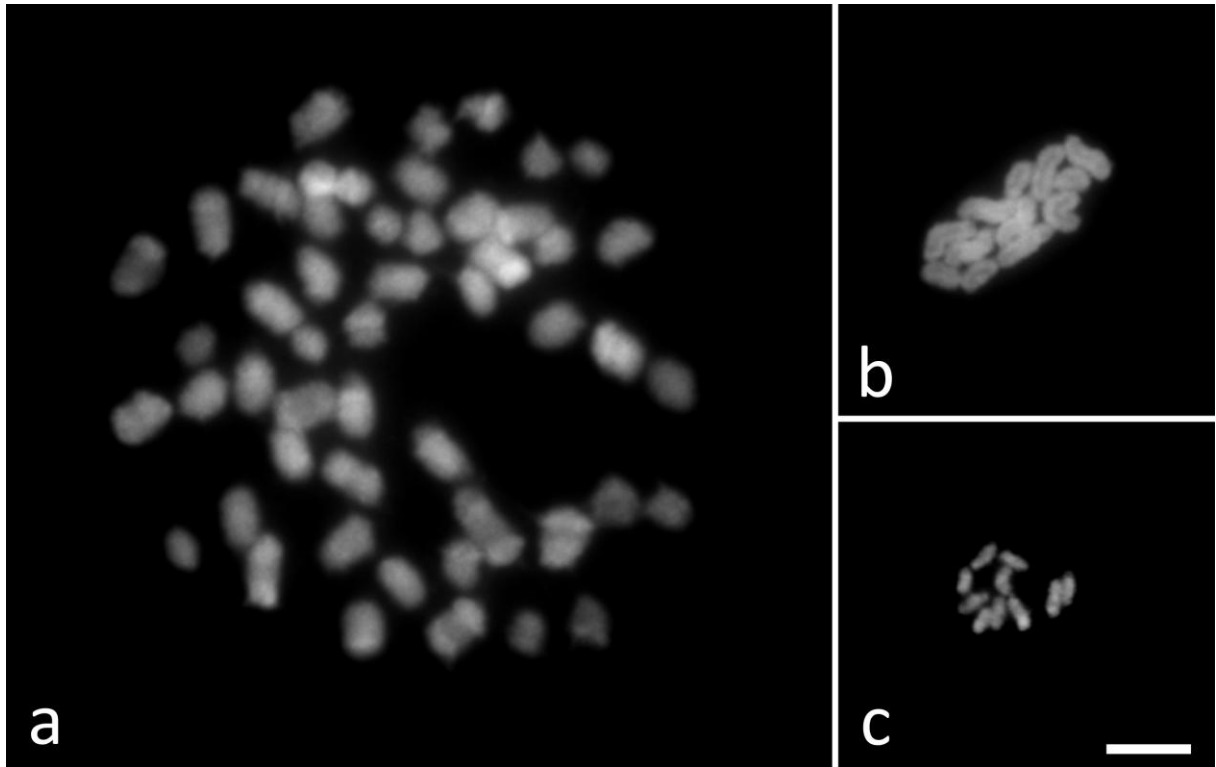


Figura suplementar 1. Metáfases de *R. globosa* ($2n = 50$), *R. elatior* ($2n = 12$) e *R. radicans* ($2n = 10$) coradas com DAPI. Barra = 5 μm .

5. Capítulo2: Artigo a ser submetido ao periódico

Chromosoma

Mapeamento citogenético de DNAs satélites revela uma complexa organização da cromatina no gênero holocêntrico *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae)

Tiago Ribeiro¹, André Marques¹, Petr Novak², Veit Schubert³, André L. L. Vanzela⁴, Jiri Macas², Andreas Houben³ and Andrea Pedrosa-Harand^{1,*}

¹*Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.*

²*Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Plant Molecular Biology, České Budějovice, Czech Republic.*

³*Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), OT Gatersleben, 06466 Stadt Seeland, Germany*

⁴*Universidade Estadual de Londrina, 86057970, Paraná, Brazil*

**For correspondence: andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br*

RESUMO

Sequências de DNA satélite (SatDNA) são elementos de rápida evolução, usualmente associados à heterocromatina condensada. Os resultados dos estudos com a Cyperaceae *Rhynchospora pubera*, entretanto, demonstraram um padrão contrastante para a distribuição dessas sequências, com um SatDNA (Tyba) com condensação ciclo-celular dependente. Para realizar uma melhor caracterização da heterocromatina e da organização de DNAs satélites em *Rhynchospora*, uma abordagem combinada empregando análise citológica e computacional foi utilizada na identificação e caracterização de SatDNAs no genomas de *R. ciliata* ($2n = 10$), *R. globosa* ($2n = 50$) e *R. tenuis* ($2n = 4$ e 8). Contrastando com *R. pubera*, as três espécies apresentaram duas ou três famílias de satDNAs adicionalmente a Tyba. A análise citológica demonstrou três diferentes perfis de distribuição: associado ao centrômero, com padrão de marcação disperso em intérfase e co-localizado com os holocentrômeros em metáfase (Tyba); associado à heterocromatina, com sinais condensados ao longo de todo ciclo celular (RcSAT2, RgSAT1 e RgSAT2) e outro com distribuição condensada mas não associada à heterocromatina clássica (RcSAT20 e RtSAT239). Em conjunto, os dados apontam uma alta complexidade na organização da cromatina em *Rhynchospora*. A identificação de novos satélites confirmou que a maioria das sequências mostra o padrão de condensação típico, corroborando que o perfil peculiar encontrado para Tyba reflete sua associação com o centrômero funcional. A natureza holocêntrica, portanto, não impõe limites para a organização da cromatina nem restringe a presença dos SatDNAs apenas as regiões terminais, não-centroméricas, em *Rhynchospora*.

Palavras-chave: distribuição centromérica e não centromérica, heterocromatina, cromossomos holocêntricos, *Rhynchospora*, DNAs satélites.

INTRODUÇÃO

Os domínios heterocromáticos são conhecidos por sua estrutura compacta, permanecendo condensados durante quase todo o ciclo celular. Também conhecida como heterocromatina constitutiva, essas regiões são frequentemente pobres em genes e formadas basicamente por sequências repetitivas, como DNAs satélites (SatDNA) (Oberdoerffer e Sinclair, 2007). SatDNAs são elementos universais dos genomas eucarióticos e consistem de arranjos de até centenas de repetições de uma unidade básica, denominada monômero. Essas sequências são usualmente localizadas na forma de blocos ao longo dos cromossomos (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998; Hemleben et al., 2007) e também podem estar associadas ao telômeros e aos centrômeros da maioria das espécies vegetais e animais (Melters et al., 2013; Garrido-Ramos et al., 2015).

Os cromossomos são classificados em duas principais categorias de acordo com a organização do centrômero. Cromossomos monocêntricos são encontrados na maioria das espécies e apresentam um centrômero localizado e de tamanho restrito, visualizado como constrição primária, e que serve de local de montagem para a estrutura cinetocórica e associação dos microtúbulos. Em contraste, nos holocêntricos a atividade cinetocórica é encontrada ao longo de quase toda a extensão do cromossomo e nenhuma constrição primária é visualizada. Este estado centromérico derivado evoluiu independentemente diversas vezes e é encontrado em grupos como as famílias de plantas Cyperaceae e Juncaceae (Melters et al. 2012; Bureš et al. 2013). Mais recentemente, cromossomos (meta)policêntricos, os quais podem representar um passo intermediário entre os dois estados, mono- e holocêntrico, foram identificados em plantas (Neumann et al., 2012; Neumann et al., 2015).

Os estudos relacionados à organização de SatDNAs têm sido focados em organismos com cromossomos monocêntricos e, em geral, sequências com monômeros curtos, em torno de 160-180 pb ou 320-370 pb, e orientação *head-to-tail* têm sido encontradas (Macas et al. 2002; Hemleben et al. 2007). Essas sequências estão presentes preferencialmente em regiões heterocromáticas dos subtelômeros e pericentrômeros/centrômeros, formando blocos condensados em intérfase (cromocentros) e em cromossomos metafásicos, como em rato (*Mus musculus domesticus*) e *Camellia japonica* (Guenatri et al., 2004; Heitkam et al., 2015). Em holocêntricos, os poucos registros demonstram um padrão citológico similar. No gênero

de plantas *Luzula* (Juncaceae), dezenas de SatDNAs produziram grandes blocos em intérfase e metáfase, mas com uma distribuição enviesada, com localização preferencial nos terminais cromossômicos (Haizel et al. 2005; Heckmann et al. 2013). Similarmente, o repeat MBSAT1 identificado na mariposa do repolho (*Mamestra brassicae*; Lepidoptera) foi encontrado primariamente na forma de blocos nos cromossomos Z e W (Mandrioli et al. 2003).

Novos estudos em *Rhynchospora* (Cyperaceae), entretanto, desafiam a visão clássica para a distribuição de SatDNAs. Ao invés de um genoma refletido dessas sequências, *R. pubera* mostrou a predominância de apenas um SatDNA, denominado Tyba (Marques et al., 2015). Tyba ocorre como sinais dispersos em intérfase e, com o progresso da condensação cromossômica, é encontrado formando, ao invés de blocos, uma linha longitudinal ao longo dos cromossomos mitóticos. As análises detalhadas de imunoprecipitação de cromatina centromérica (CENH3-ChIP) confirmaram Tyba como a primeira sequência centromérica em espécies holocêntricas (Marques et al., 2015).

No intuito de entender a organização e evolução de SatDNAs em espécies com cromossomos holocêntricos e testar se a natureza holocêntrica pode influenciar a distribuição dessas sequências, a identificação e caracterização de SatDNAs foi realizada em três espécies de *Rhynchospora*, as quais apresentam cromatina com diferentes tipos de organização: *Rhynchospora tenuis*, sem domínios heterocromáticos ao longo dos cromossomos, similar a *R. pubera*, e *R. ciliata* e *R. globosa*, com claros cromocentros e blocos de heterocromatina nos cromossomos metafásicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA genômico

Espécimes de *R. ciliata* (Vahl) Kükenth ($2n = 10$), *R. globosa* (Kunth) Roem. & Schult. ($2n = 50$) e *R. tenuis* Link (citotipos diploide, $2n = 4$, e tetraploide, $2n = 8$) foram coletados de populações naturais e mantidos no jardim experimental do laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal (UFPE, Recife-PE, Brasil). DNA genômico foi obtido de folhas jovens usando o kit DNeasy Plant Mini kit (Qiagen).

Sequenciamento NGS

DNA genômico (*R. ciliata*, *R. globosa* e um citotipo diploide de *R. tenuis*) foi usado para o sequenciamento de nova geração. Em resumo, o DNA foi fragmentado por nebulização e usado para a preparação de uma biblioteca de fragmentos pareados de cerca de 500 pb. As leituras foram realizadas utilizando um sequenciador Illumina HiSeq2000.

Identificação de SatDNAs

A clusterização das sequências geradas foi realizada no programa Repeat Explorer (Nóvak et al., 2010; Nóvak et al., 2013). Um total de 1,269,680, 617,000 e 4,766,968 reads foi usado na identificação e caracterização dos elementos repetitivos mais abundantes em *R. ciliata*, *R. globosa* e *R. tenuis*, respectivamente. Os clusters foram investigados em maior detalhe utilizando Dot plot (Sonnhammer and Durbin, 1996) para confirmação da presença de SatDNAs e as sequências foram usadas para desenho de primers.

Amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento de plasmídeos

Pares de primers foram desenhados para cada uma das novas famílias de SatDNA identificadas (Tabela Sup. 1) e usados, em conjunto com aqueles para Tyba (Marques et al., 2015), para amplificação dos fragmentos a partir de DNA genômico de *R. ciliata* e *R. tenuis*. As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 50 ng de DNA genômico, 0.1 mM dNTP, 1× tampão de PCR, 0.4 µM de cada primer e Taq polimerase Platinum (Invitrogen) e submetidas a 30 ciclos de amplificação (1 min à 94°C para denaturação, 1 min à 50°C para anelamento e 1 min à 72° para extensão). Os amplicons obtidos foram limpos usando o kit Nuclei Spin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), ligados no vetor pJET1.2 (Life Technologies) e transformados em células competentes SoloPack Gold (Agilent Technologies). Clones positivos foram identificados por PCR de colônia e sequenciados na plataforma de sequenciamento LABCEN/CCB (Brasil).

Preparações cromossômicas

Raízes foram obtidas de plantas vivas, pré-tratadas com 2 mM 8-hidroxiquinoleína à 10° C por 20 horas, fixadas em metanol/ácido acético 3:1 (v/v) e estocadas à -20° C. As lâminas foram preparadas seguindo o protocolo descrito em Carvalho e Saraiva (1993). Os meristemas foram tratados com uma mistura enzimática contendo 1.4% celulase R10, 1.4% celulase, 2.0% pectoliase, e 2.0% citohelicase em 1× tampão citrato por 1 h – 1 h 30 min à 37° C e lavadas em 1× tampão citrato. As raízes foram então colocadas em uma lâmina inclinada, lavadas com fixador gelado, e fragmentadas em pequenos pedaços com auxílio de agulhas. O macerado resultante foi novamente lavado com fixador gelado, forçando as células livres a deslizar ao longo da lâmina, e seco ao ar. Em seguida, as lâminas foram incubadas em ácido acético 45% por 5 min e incubadas à 37° C até secagem completa.

Hibridização in situ fluorescente (FISH)

As sonda foram amplificadas por PCR para *R. ciliata* e *R. tenuis* e marcadas por Nick translation com Cy3-dUTP (Jena) ou Alexa 488-5-dUTP (Life Technologies) usando o Nick translation mix (Roche). Para *R. globosa*, oligonucleotídeos marcados na região 5' (5'-Cy3 ou 5'-FAM; Eurofins MWG Operon, <http://www.eurofinsdna.com>) foram utilizados (*RgSAT1*: 5'-GTGT6TGTTTCTGCTGAAATAGTGATTTTGAGTAA-3') e *RgSAT2*: 5'-GTTTATGCTGAAATAGTGATTTTGAGAAGTTTCA-3'). Adicionalmente, o plasmídeo pTa71 (Gerlach e Bedbrook, 1979), contendo o DNAr 18S-5.8S-26S de trigo, foi obtido por miniprep usando o Qiagen Mini prep kit e marcado como descrito acima. O pré-tratamento das lâminas e a desnaturação das sondas foi realizado segundo Fonsêca et al. (2010). O mix de hibridização consistiu de 50% (v/v) formamida, 2× SSC, 5mM EDTA, 0.2M Tris-HCl pH 8, 2.8 µg de esperma de salmão e 200-300 ng de sonda. As lâminas foram desnaturadas por 8 min à 75° C e hibridizadas à 37°C por até dois dias. As lavagens estringentes foram realizadas em 2× SCC à 58° C por 20 min. As lâminas foram então submetidas à uma série alcóolica (70, 90 and 100%) e contracoradas com DAPI/Vectashield (Vector). As imagens foram capturadas usando um microscópio Leica DM5500B equipado com câmera CCD (Leica DFC345 FX).

Microscopia de alta resolução

A microscopia de alta resolução 3D (3D-SIM) foi realizada utilizando uma objetiva C-Apo 63×/1.2W Korr acoplada a um sistema de microscopia Elyra e software de captura ZEN (Zeiss, Germany). A análise da distribuição espacial dos SatDNAs foi realizada em uma resolução de ~120 nm.

RESULTADOS

A caracterização da fração de DNAs satélites em três outras espécies de *Rhynchospora* revelou a presença de organizações distintas entre as sequências. O DNA satélite centromérico Tyba (Marques et al., 2015) foi encontrado como a sequência mais abundante apenas nos genomas de *R. ciliata* (5.29 %) e *R. tenuis* (2.97 %), com nenhum indício de que esteja presente em *R. globosa*. SatDNAs adicionais variando em abundância, mas compreendendo mais de 0,01% do genoma, também foram identificados nas três espécies: dois em *R. ciliata*; um em *R. tenuis* e seis em *R. globosa* (Tabela 1). Análise por *dot plot* foi usada para confirmar a organização em tandem. Os gráficos para *R. ciliata* e *R. tenuis* (RcSAT2, RcSAT20 e RtSAT239) mostraram layouts complexos, sugerindo a presença de SatDNAs com tamanho do arranjo irregular e/ou presença de repetições internas curtas. Para essas espécies, portanto, a unidade de repetição não foi determinada, mesmo após clonagem dos fragmentos de PCR. *Rhynchospora globosa*, ao contrário, apresentou sequências mais conservadas com unidades de repetições em torno de 184 pb (RgSAT1), 186 pb (RgSAT2), 182 pb (RgSAT35), 166 pb (RgSAT47), 209 pb (RgSAT158) e 156 pb (RgSAT173), respectivamente (Figura Sup. 1).

A distribuição cromossômica foi analisada por FISH. As sondas para Tyba (RcTyba e RtTyba) resultaram num padrão de hibridização em *R. ciliata* e *R. tenuis* similar ao previamente descrito para *R. pubera* (Marques et al., 2015). Em intérfase, os sinais foram visualizados de forma dispersa ao longo de toda a superfície do núcleo (Fig. 1a, d). Na metáfase, com a continuação do ciclo celular, os sinais foram encontrados de forma mais agrupada formando uma linha ao longo da superfície lateral de cada cromátide, reproduzindo a posição dos holocentrômeros (Fig.1c, f).

Todos os outros SatDNAs mostraram um padrão de distribuição agrupado, mas com diferenças na localização dependendo da espécie. *Rhynchospora ciliata* e *R. globosa* apresentaram grandes cromocentros DAPI+ (ricos em bases AT), os quais estavam associados com os sinais dos SatDNAs RcSAT2 em *R. ciliata* (Fig. 2b) e RgSAT1 (Fig. 3b) / RgSAT2 (Fig. 3c) em *R. globosa*, respectivamente. Na última espécie, apenas as duas sequências mais abundantes foram analisadas e mostraram uma marcação complementar em alguns cromocentros (Fig. 3a). Adicionalmente, os sinais para RcSAT20 em *R. ciliata* foram observados como blocos fora dos cromocentros (Fig. 2c). Para *R. tenuis*, RtSAT239 mostrou o mesmo padrão de distribuição em intéfase (Fig. 4a).

Nos cromossomos metafásicos, todos os repeats, exceto Tyba, apresentaram distribuição na forma de blocos compactos predominantemente terminais (*R. globosa*) ou ao longo dos cromossomos (*R. ciliata* e *R. tenuis*). No caso do RcSAT20 (Fig. 2f), entretanto, algumas alças de cromatina fora dos cromossomos também mostraram interação com a sequência (Fig. 2i). RgSAT1 e RgSAT2 foram detectados em quase todos os terminais cromossômicos de *R. globosa* (Fig. 3e and 3f). Em contraste, a maioria dos sinais de RtSAT239 foram majoritariamente detectados ao longo do maior par cromossômico, enquanto que apenas nas regiões subterminais do par pequeno (Fig. 4b). Similar ao repeat RcSAT20, RtSAT239 também mostrou interação com um tipo de cromatina menos compactada (Fig. Sup 2).

Mesmo com a presença de um padrão peculiar de distribuição para todos os novos repeats caracterizados, a identificação de pares e uma associação completa no número e tamanho dos blocos entre homólogos não foi possível de realizar nem em *R. tenuis* (Fig. Sup. 2) nem em *R. ciliata*. Neste último caso, mesmo quando uma marca para DNAr 45S foi empregada em conjunto, o padrão de marcação entre cromossomos homólogos não se mostrou conservado (Fig. Sup. 3).

DISCUSSÃO

A composição de DNAs satélites foi investigada no genoma de diferentes espécies de *Rhynchospora* e revelou uma complexa diversidade comparada à *R. pubera* (Marques et al., 2015). Cinco SatDNAs não relacionados, além da sequência centromérica Tyba, foram identificados em *R. ciliata*, *R. globosa* e *R. tenuis*. A localização cromossômica revelou uma distribuição contrastante para diferentes

sequências. Enquanto Tyba mostrou o mesmo padrão disperso em intérfase e possível associação com os holocentrômeros em metáfase de *R. ciliata* e *R. tenuis*, como descrito para *R. pubera* (Marques et al., 2015), as outras famílias de SatDNAs exibiram o típico padrão de distribuição para esse tipo de sequências, como já encontrado em outras espécies com cromossomos monocêntricos e holocêntricos.

Os diversos registros da distribuição de SatDNAs para espécies monocêntricas (ver, por exemplo, Rosato et al., 2012; Čížkova et al., 2013) apontam essas sequências como regiões de cromatina condensada. A identificação de Tyba em *R. pubera* apresentando um status descondensado em intérfase e associação com os holocentrômeros (Marques et al., 2015) modificou a visão geral sobre a organização de SatDNAs. Esse achado também contrasta com os estudos em outro grupo de plantas com holocêntricos, o gênero *Luzula*, no qual mais de 20 diferentes famílias de SatDNAs foram identificadas e nenhuma associação com os holocentrômeros foi observada (Heckmann et al., 2013). Sinais dispersos em intérfase são usualmente observados para sequências repetitivas mais curtas, como microssatélites, mas para Tyba esse padrão está provavelmente relacionado à sua associação com os centrômeros funcionais (Marques et al., 2015).

Em *R. tenuis*, sem a presença de cromocentros, um DNA satélite não centromérico foi identificado na forma de clusters em intérfase e localizado nos terminais do menor par cromossômico ou como grandes blocos ao longo do maior par em cromossomos mitóticos. Em contraste, *R. ciliata* e *R. globosa* apresentaram distintos cromocentros interagindo com os SatDNAs. Estudos prévios demonstraram a contrastante composição e distribuição da heterocromatina em *Rhynchospora* (Vanzela e Guerra, 2000). Enquanto algumas espécies exibiram claros blocos ao longo dos cromossomos (interagindo positivamente com fluorocromos ou banda C positivos), como em *R. ciliata*, outras mostraram possuir heterocromatina apenas associada às RONS, como *R. pubera*, sugerindo a ausência de um padrão típico de distribuição da heterocromatina no gênero (Vanzela e Guerra 2000).

A distribuição de sequências repetitivas ou da heterocromatina nas regiões subterminais dos cromossomos foi descrita como uma característica comum para espécies com holocêntricos (e.g. Guerra e Garcia, 2004; Heckmann et al., 2012) e associada ao fenômeno de manutenção da associação entre bivalentes (conexão *end-to-end*) durante a meiose invertida em *L. elegans* (Heckmann et al., 2014). *Rhynchospora*

também apresenta esse tipo de meiose (Cabral et al., 2014) e a presença de conexão entre cromossomos homólogos provavelmente existe. A comparação do padrão de distribuição dos SatDNAs ao longo dos cromossomos, entretanto, não demonstrou qualquer local preferencial para localização dos mesmos. Essas sequências foram encontradas como blocos em posições intersticiais e terminais em *R. ciliata* e *R. tenuis*. Neste caso, portanto, SatDNAs não devem estar envolvidos nas conexões *end-to-end*. Para *R. globosa*, ao contrário, ambas as sequências mapeadas (*RgSAT1* e *RgSAT2*) foram localizadas preferencialmente nos terminais cromossômicos e nenhum sinal para o DNA satélite centromérico Tyba foi visualizado. Assim, fica claro que a distribuição enviesada de SatDNAs não é uma característica compulsória dos cromossomos holocêntricos. Entretanto, não é possível confirmar se a distribuição intersticial de algumas sequências em *Rhynchospora* poderia estar associada ao repeat centromérico atípico. A presença de Tyba de forma dispersa poderia resultar na sua associação com outros SatDNAs em intérfase e a consequente dispersão destes ao longo dos cromossomos com o progresso da condensação (*R. tenuis* e *R. ciliata*), enquanto sua ausência poderia limitar outros SatDNAs presente no genoma a ocupar apenas os terminais cromossômicos (*R. globosa*). Para o DNAr, a localização terminal é uma característica comum de várias espécies com holocêntricos e pode ser explicada pelo possível efeito deletério de posicionamento intersticial. Em geral, as RONS apresentam um perfil descondensado e isso poderia favorecer a quebra do holocentrômero em dois e permitir a migração da mesma cromátide para pólos opostos, como um cromossomo dicêntrico (Heckmann et al., 2013). Essa limitação não seria aplicável, entretanto, a outras sequências organizadas em tandem que permanecem condensadas durante a mitose.

A distribuição genômica dos SatDNAs em *Rhynchospora* também revelou um terceiro tipo de organização de cromatina nesses genomas. Adicionalmente as famílias associadas à heterocromatina condensada e Tyba, os repeats *RcSAT20* e *RtSAT239* apareceram condensados em intérfase e metáfase, mas não estavam associados aos cromocentros e blocos de cromatina presentes em metáfase. Neste último estágio, inclusive, os repeats apareceram interagindo com fios de cromatina descompactada fora dos cromossomos, os quais não foram identificados para os SatDNAs heterocromáticos. Um padrão de descondensação como esse foi observado apenas para os sítios de DNAr 45S terminais em *Rhynchospora* (Sousa et al., 2011), devido a transcrição dos genes

ribossomais (ver, por exemplo, Huang et al., 2008). É possível que estes repeats estejam associados à diferentes modificações epigenéticas, evidenciando a presença de três tipos de cromatina e um complexo empacotamento dos cromossomos nesses genomas (Figura 5), maior do que o proposto para outras espécies com holocêntricos como *L. elegans* (Heckmann et al., 2012) e *R. pubera* (Marques et al., 2015).

Em geral, a localização de uma determinada sequência tende a ser a mesma entre cromossomos homólogos. Quando considerada a distribuição da fração repetitiva, o padrão combinado de diferentes famílias em um mesmo genoma pode ser usado para a identificação de alguns ou todos os pares cromossômicos (Fonsêca et al., 2010; Badaeva et al., 2015; He et al., 2015). No presente trabalho, utilizando o padrão dos SatDNAs, combinado com o DNAr 45S, a tentativa de identificação de homólogos foi feita em *R. ciliata*. A ausência de conservação no padrão de distribuição, entretanto, não permitiu uma correlação apropriada. Uma situação similar também foi observada para a distribuição do RtSAT239 em *R. tenuis*. É possível que as diferenças encontradas no número/tamanho dos blocos entre homólogos seja devido a ausência ou baixa frequência de recombinação observada para os cromossomos dessas espécies, como mostrado para *R. tenuis*, ou a sua restrição a regiões intersticiais, como para *R. pubera* (Cabral et al., 2014) e possivelmente válida para *R. ciliata*. Uma baixa recombinação levaria ao acúmulo diferencial de sequências entre os homólogos, como observado para cromossomos sexuais (revisado por Hobza et al., 2015). Alternativamente, rearranjos cromossômicos estruturais em heterozigose ou o empacotamento diferencial dos cromossomos durante a condensação mitótica poderiam também resultar na aparente distribuição diferencial dos SatDNAs.

A análise comparativa dos DNAs satélites em *Rhynchospora* revelou um cenário extremamente dinâmico. Enquanto Tyba apresentou uma maior conservação, estando associado aos holocentrômeros em três espécies, a cromatina em *R. ciliata*, *R. globosa* e em *R. tenuis* foi mais complexa e diversos SatDNAs, diferindo em sua composição e distribuição, puderam ser identificados. A organização da cromatina de forma mais complexa também já foi observada em algumas espécies com monocêntricos (Filion et al., 2010; Fonsêca et al., 2014) e pode não depender da natureza do centrômero. A condensação do cromossomo metafásico, entretanto, pode ser influenciada pela organização centromérica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as fundações de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro.

.

Tabela 1. Proporções genômicas de SatDNAs em espécies de *Rhynchospora*.

Repeat / Espécie	<i>R. ciliata</i>	<i>R. globosa</i>	<i>R. tenuis</i>
<i>Tyba</i>	5.29	-	2.97
<i>RcSAT2</i>	3.52	-	-
<i>RcSAT20</i>	0.4	-	-
<i>RgSAT1</i>	-	7.91	-
<i>RgSAT2</i>	-	3.34	-
<i>RtSAT239</i>	-	-	0.01

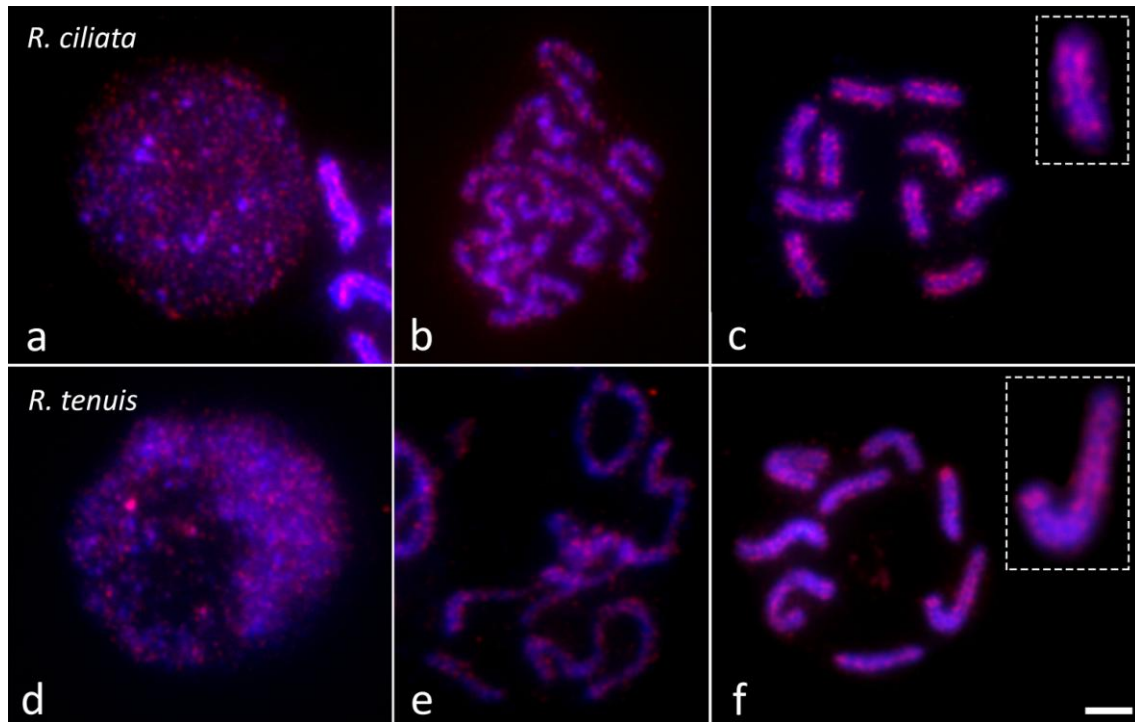


Figura 1. Distribuição do DNA satélite centromérico Tyba em diferentes estágios celulares de *R. ciliata* e *R. tenuis*. (**a, d**) núcleos interfásicos mostrando marcação dispersa; (**b, e**) prometáfase com cromátides replicadas e (**c, f**) metáfase mostrando Tyba com uma distribuição linear. Barra em f = 5 μ m. Insertos em **c** e **f** mostram um cromossomo selecionado em maior aumento.

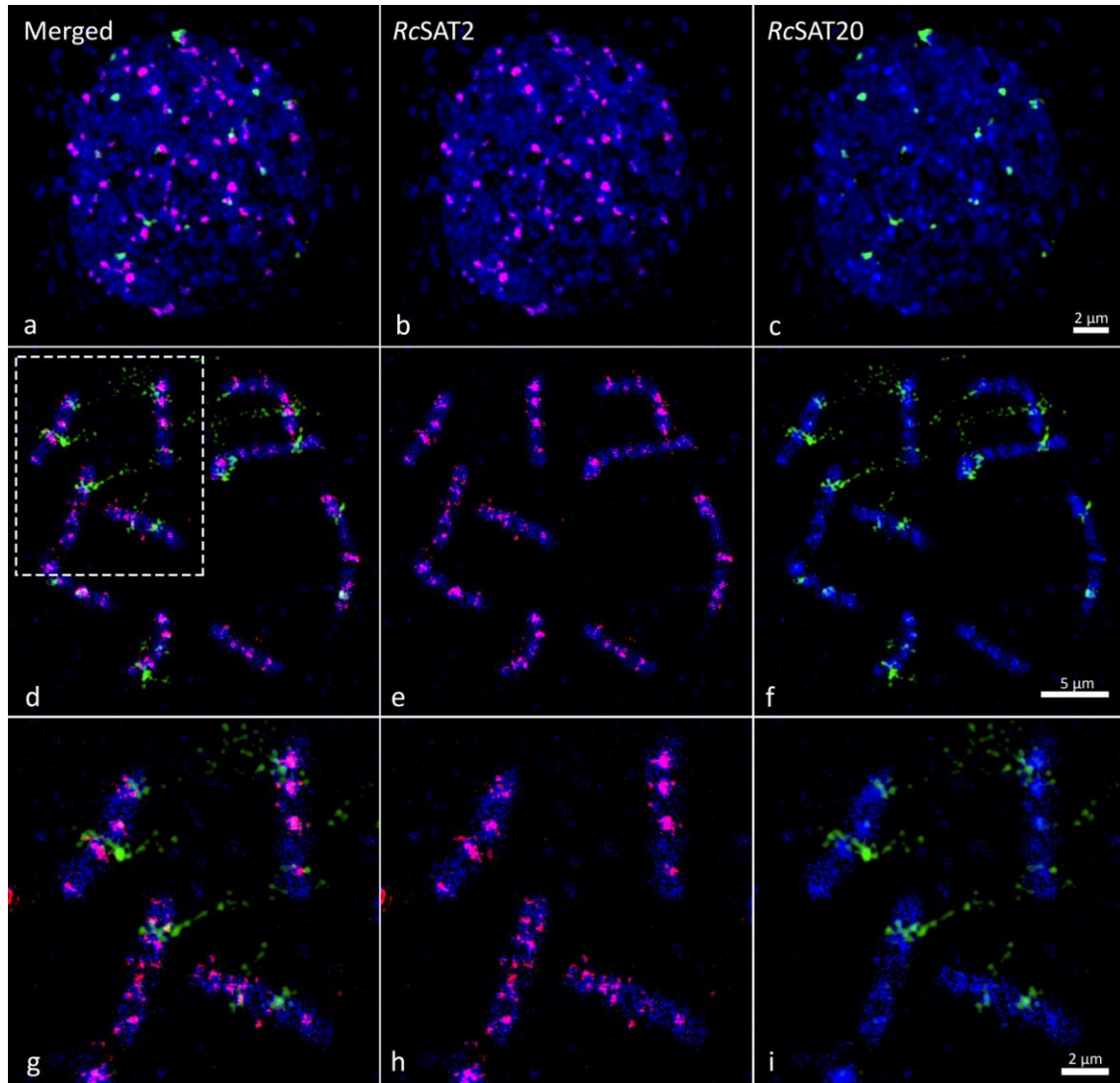


Figura 2. Localização comparativa de repeats não centroméricos em *R. ciliata*. *RcSAT2* (vermelho) e *RcSAT20* (verde) apresentam distribuição em blocos no núcleo interfásico (**b** e **c**) e metáfase (**e** e **f**), mas ocupam distintos domínios (**a** e **d**). Adicionalmente, *RcSAT20* se apresenta parcialmente descondensado em metáfase. Área destacada em **d** é mostrada em maior aumento (**g**, **h** e **i**).

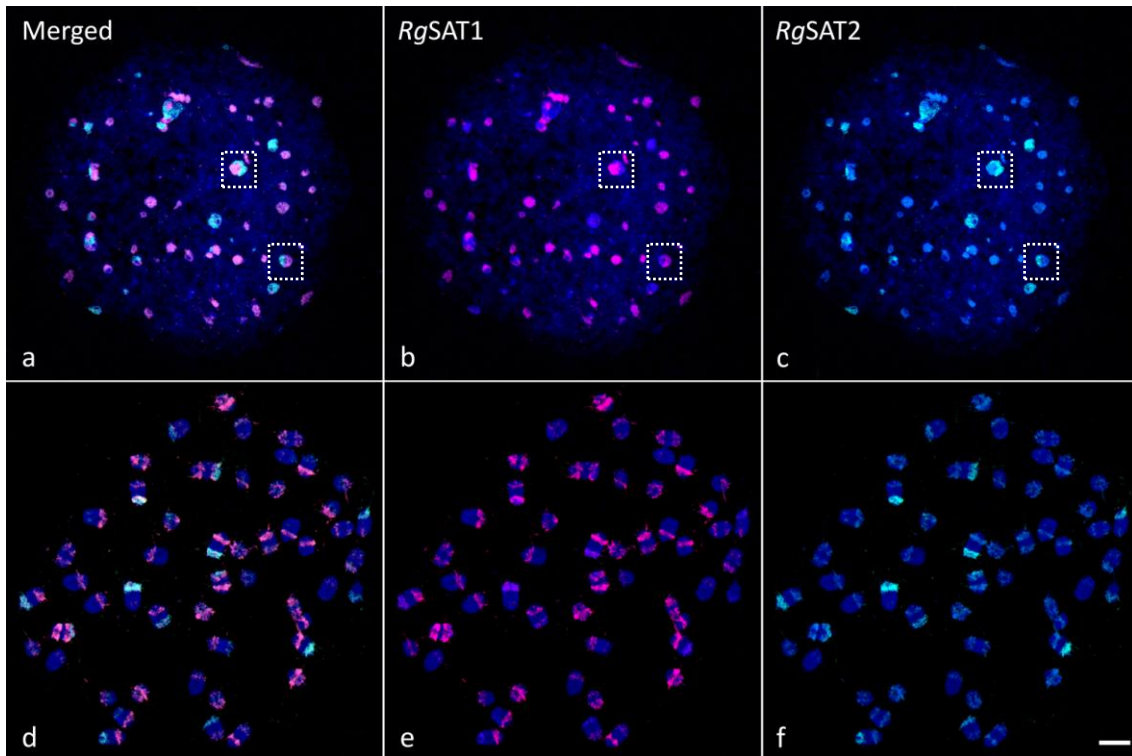


Figura 3. Distribuição cromossômica dos repeats mais abundantes de *R. globosa* em microscopia de alta resolução. *RgSAT1* (**b, e**) e *RgSAT2* (**c, f**) sobreposto ao DAPI (azul) em cromossomos interfásico (**a-c**) e metafásicos (**d-f**), mostrando a localização preferencial nos cromocentros (**a-c**) e nos terminais cromossômicos (**d-f**). Barra em **f** = 5 μ m. Caixas (**a-c**) destacam alguns cromocentros onde os sinais de ambas as sequências mostram padrão complementar de marcação.

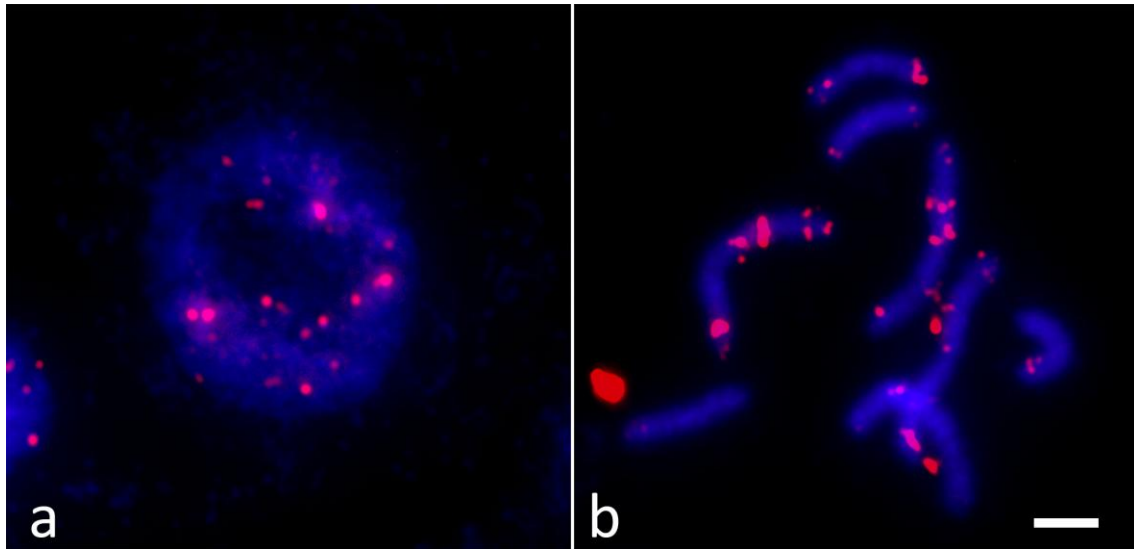


Figura 4. Cromossomos interfásicos (**a**) e metafásicos (**b**) de *R. tenuis* mostrando a distribuição do *RtSAT239*. Barra em **b** = 5 μ m.

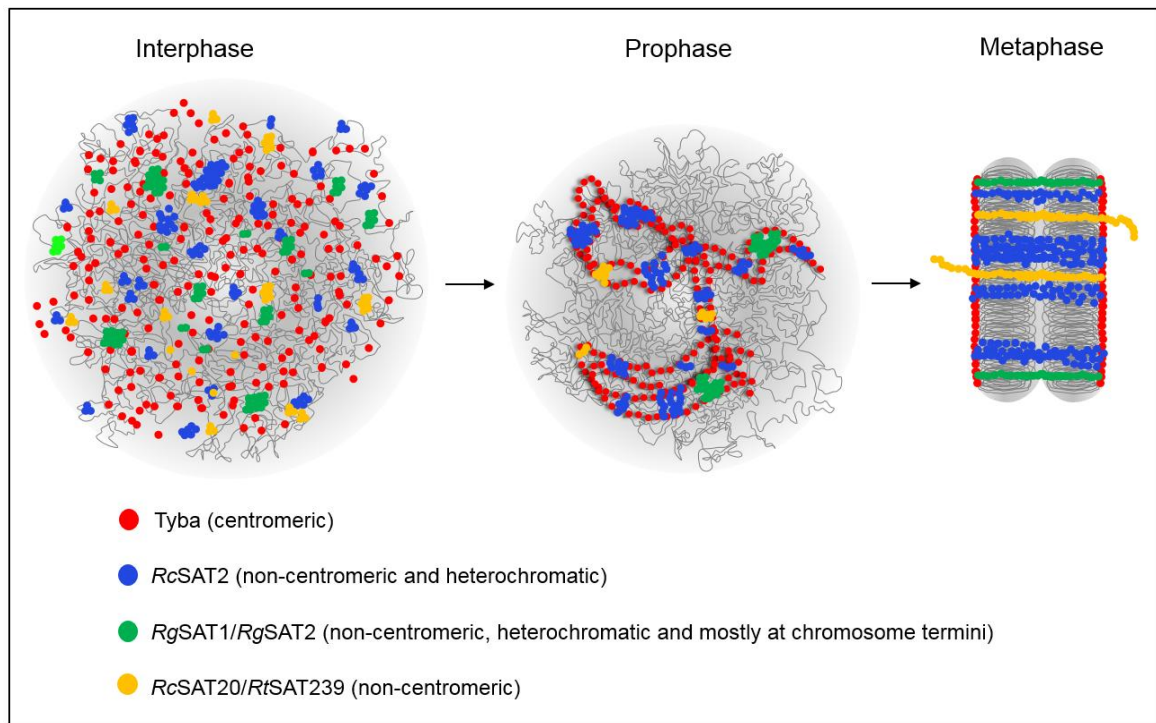


Figura 5. Dinâmica de DNAs satélites durante a condensação cromossômica em espécies de *Rhynchospora*. As sequências foram hibridizadas nos cromossomos de *R. ciliata*, *R. globosa* ou *R. tenuis* e mostraram diferentes padrões de condensação como visualizado para Tyba (vermelho), RcSAT2 (azul), RgSAT1/2 (verde) e RcSAT20/RtSAT239 (laranja).

REFERÊNCIAS

- Badaeva ED, Amosova AV, Goncharov NP, Macas J, Ruban AS, Grechishnikova IV, Zoshchuk SA, Houben A (2015) A Set of Cytogenetic Markers Allows the Precise Identification of All A-Genome Chromosomes in Diploid and Polyploid Wheat. *Cytogenet Genome Res.* 146:71-79.
- Bureš P, Zedek F, Marková M (2013) Holocentric chromosomes. In I.J. Leitch et al. (eds.), *Plant Genome Diversity Volume 2*. pp. 187-208.
- Cabral G, Marques A, Schubert V, Pedrosa-Harand A, Schlölgeholfer (2014) Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. *Nature Communication* 5: 5070.
- Carvalho CR, Saraiva LS (1993) An air dry technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic and Histochemistry* 68: 142-145.
- Čížková J, Hřibová E, Humplíková L, Christelová P, Suchánková P, Doležel J (2013) Molecular analysis and genomic organization of major DNA satellites in banana (*Musa* spp.). *PLOS One* 8: 54808.
- Feitoza L, Guerra M (2011) Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica* 139: 305-314.
- Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B. Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in *Drosophila* Cells. *Cell* 143: 212-224.
- Fonsêca A, Ferreira J, Santos TRB, Mosiolek M, Belluci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18: 487-502.
- Fonsêca A, Richard MM, Geffroy A, Pedrosa-Harand A (2014) Epigenetic analyses and the distribution of repetitive DNA and resistance genes reveal the complexity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) heterochromatin. *Cytogenet Genome Res* 143: 168-78.
- Guarrido-Ramos MA (2015) Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenet Genome Res* 146: 153-170
- Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *JCB* 166: 493-505.

- Gerlach WL and Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl Acid Res* 7:1869-1885.
- Guerra M, Garcia MA (2004) Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47: 134-140.
- Haizel T, Lim YK, Leitch AR, Moore G (2005) Molecular analysis of holocentric centromeres of *Luzula* species. *Cytogenet Genome Res* 109: 134-143.
- He Q, Cai Z, Hu T, Liu H, Bao C, Mao W, Jin W (2015) Repetitive sequence analysis and karyotyping reveals centromere-associated DNA sequences in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Plant Biol* 15: 105.
- Heckmann S, Macas J, Kumke K, Fuchs J, Schubert V, Ma L, Novak P, Neumann P, Taudien S, Platzer M, Houben A (2013) The holocentric species *Luzula elegans* shows an interplay between centromere and large-scale genome organization. *The Plant Journal* 73: 555-565.
- Heckmann S, Jankowska M, Schubert V, Kumke K, Ma W, Houben A (2014) Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nature Communications* 5: 4979.
- Heitkam T, Petrash S, Zakrzewski F, Kögler A, Wenke T, Wanke S, Schmidt T (2015) Next-generation sequencing reveals differentially amplified tandem repeats as a major genome component of Northern Europe's oldest *Camellia japonica*. *Chromosome Res* 23: 791-806.
- Hembelen V, Kovarik A, Torrez-Ruiz RA, Volkov RA, Beridze T (2007) Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Systematics and Biodiversity* 5: 277-289.
- Hobza R, Kubat Z, Cegan R, Jesionek W, Vyskot B, Kejnovsky E (2015) Impact of repetitive DNA on sex chromosome evolution in plants. *Chromosome Research* 23: 561-570.
- Huang J, Ma L, Yang F, Fei S, Li L (2008) 45S rDNA Regions Are Chromosome Fragile Sites Expressed as Gaps In Vitro on Metaphase Chromosomes of Root-Tip Meristematic Cells in *Lolium* spp. *PLoS ONE* 3: e2167.
- Marques A, Ribeiro T, Neumann P, Macas J, Novak P, Schubert V, Pellino M, Fuchs, Ma W, Kuhlmann M, Brandt R, Vanzela ALL, Besada T, Simkova H, Pedrosa-Harand A, Houben A (2015) Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated

- with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed amongst euchromatin. PNAS 112: 13633.
- Macas J, Mészáros T, Nouzova M (2002) PlantSat: a specialised database for plant satellite repeats. Bioinformatics 18: 28-35.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Marec F (2003) Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). Chromosome Research 11: 51- 56.
- Melters DP, Paliulis LV, Korf IF, Chan SWL (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. Chromosome Research 20: 579-593.
- Melters DP, Bradnam KR, Young HA, Telis N, May MR, Ruby JG, Sebra R, Peluso P, Eid J, Rank D, Garcia JF, DeRisi JL, Smith T, Tobias C, Ross-Ibarra J, Korf I, Chan SWL (2013) Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. Genome Biology 14: 10.
- Neumann P, Navrátilová A, Schroeder-Reiter E, Koblížková A, Steinbauerová V, Chocholová E, Novák P, Wanner G, Macas J (2012) Stretching the rules: monocentric chromosomes with multiple centromere domains. PLOS Genetics 8: e1002777.
- Neumann P, Pavlíková Z, Koblížková A, Fuková I, Jedličková V, Novak P, Macas J (2015) Centromeres off the hook: massive changes in centromere size and structure following duplication of cenH3 gene in Fabaceae species. Mol. Biol. Evol. 32: 1862–1879.
- Novak P, Neumann P, Macas J (2010) Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. BMC Bioinformatics 11: 378.
- Novak P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013) RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. Bioinformatics 29: 792–793.
- Oboerdoerffer P, Sinclair DA (2007) The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. Nature Reviews 8: 692-702.

- Rosato M, Galián JA, Rosselló JÁ (2012) Amplification, contraction and genomic spread of a satellite DNA family (E180) in *Medicago* (Fabaceae) and allied genera. *Ann Bot* 109: 773-782.
- Sonnhammer ELL, Durbin R (1996) A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Gene* 167: 1-10.
- Sousa A, Barros e Silva AE, Cuadrado A, Loarce Y, Alves MV, Guerra M (2011) Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the “chromosome field” hypothesis. *Micron* 42: 625-631.
- Vanzela ALL, Guerra M (2000) Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* 23: 453-456.

Tabela suplementar 1. Lista de primers usados para amplificar os diferentes DNAs satélites de *R. ciliata* e *R. tenuis*

Espécie	Nome do primer	Sequência (5'->3')	Temperatura de anelamento (° C)
<i>R. ciliata</i>	<i>RcSAT2F</i>	CACGAGTTTTGGGCGAAA	50
	<i>RcSAT2R</i>	CCCGAAACTCGAATTCAG	
	<i>RcSAT20F</i>	CCCGTCCCACGTTTTTAT	50
	<i>RcSAT20R</i>	ATGATAGAAACGTGGGGC	
<i>R. tenuis</i>	<i>RtSAT239F</i>	AAGAAAATTGGTCGTAGGGGG	50
	<i>RtSAT239R</i>	CCCTACGACCAAGTTCCTCT	

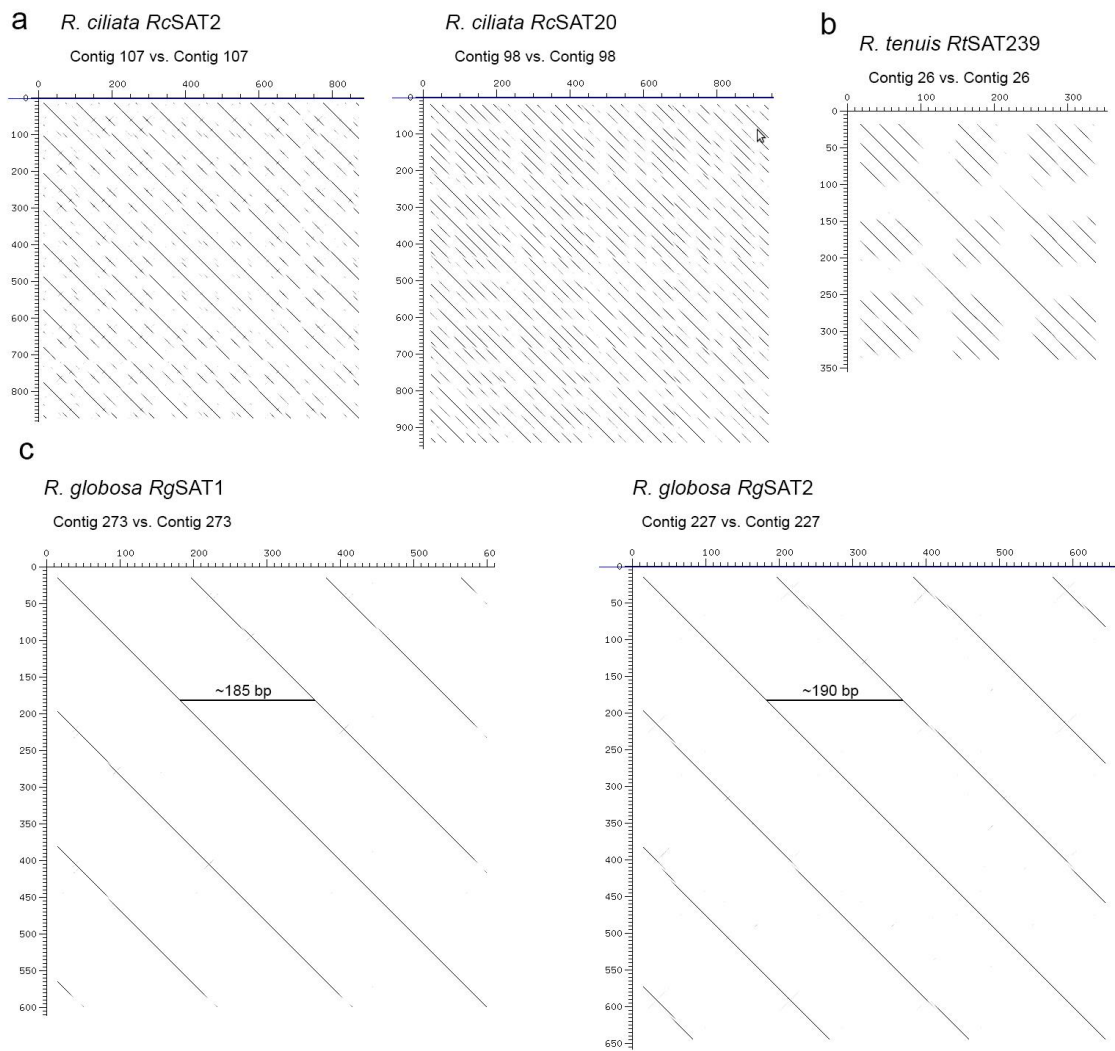


Figura suplementar 1. Análise por *Dot plot* mostrando a organização dos DNAs satélites identificados nas espécies de *Rhynchospora*. A unidade de repetição é indicada como uma barra nos casos em que foi possível determiná-la.

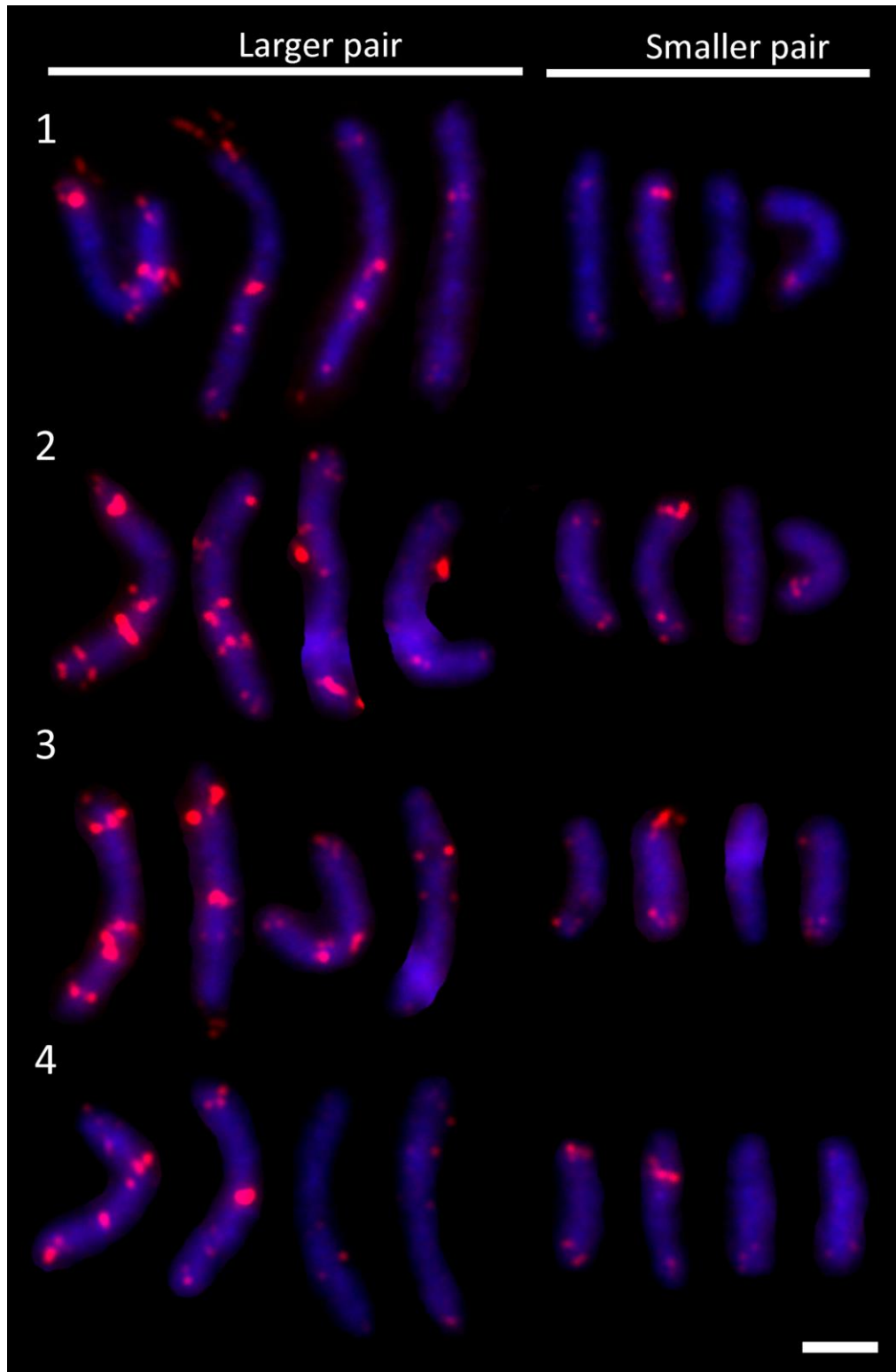


Figura suplementar 2. Cariograma de quatro metáfases selecionadas de *R. tenuis* ($2n = 4x = 8$) mostrando o padrão de marcação contrastante do *RtSAT239* entre cromossomos homólogos. Barra = 5 μm .

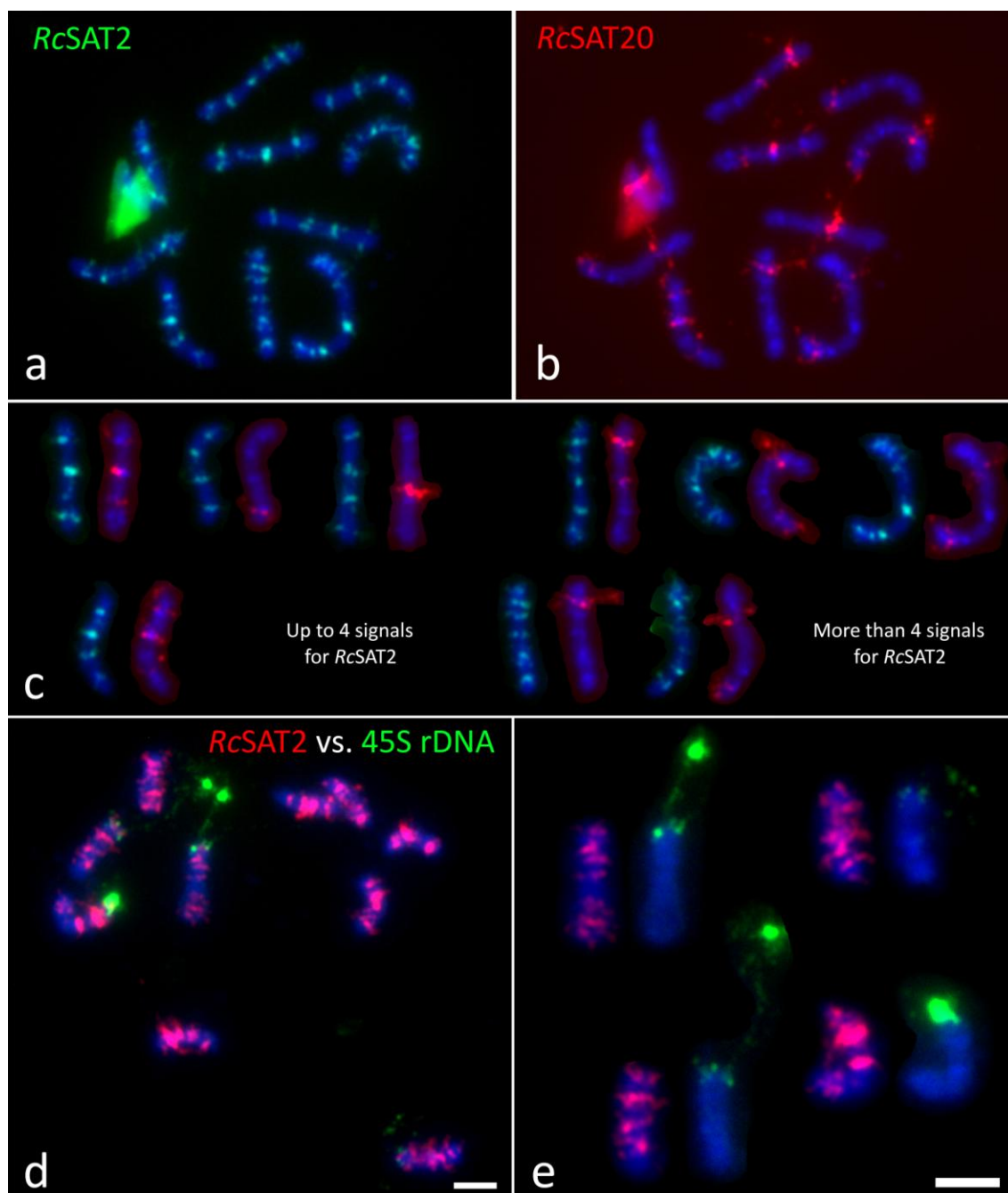


Figura suplementar 3. Padrão de distribuição comparativo para *RcSAT2* (**a**, **d**), *RcSAT20* (**b**) e DNAr 45S (**d**) em *R. ciliata*. Em **c**, os cromossomos foram organizados em dois grupos baseado no número de sinais de *RcSAT2*: esquerda (até 4 blocos maiores) e direita (mais que 4 blocos). Em **e**, os quatro cromossomos com sítios de DNAr 45S foram separados para permitir uma melhor comparação do padrão de marcação do *RcSAT2*. Barra = 5 μm.

6. Conclusões

1. O complemento diploide $2n = 10$ é o mais provável para o ancestral do grupo, tendo sido mantido em diferentes linhagens.
2. Eventos de disploidia ascendente e descendente, possivelmente associada à poliploidia, atuam de forma restrita no remodelamento dos cariótipos, uma vez que uma baixa proporção de números cromossômicos homoplásicos foi encontrada em espécies não relacionadas.
3. Do ponto de vista da composição de DNAs satélites (DNAsats), os genomas das *Rhynchospora* analisadas, *R. ciliata*, *R. globosa* e *R. tenuis*, apresentam uma maior diversidade de *repeats* em relação à espécie previamente caracterizada (*R. pubera*).
4. O *repeat* centromérico Tyba foi confirmado como a sequência mais abundante em *R. ciliata* e *R. tenuis*, apresentando o mesmo padrão de distribuição cromossômica ciclo celular-dependente descrito para *R. pubera*. Em *R. globosa*, no entanto, Tyba não foi identificado entre as sequências repetitivas com abundância maior que 0,01% do genoma.
5. Outras famílias de DNAsats foram identificadas nas três espécies, mas a localização citológica não demonstrou associação com o holocentrômero. Ao contrário, esses DNAsat formam blocos intercalares ou terminais nos cromossomos, numa distribuição similar à observada em monocêntricos.
6. Embora presentes como sequências altamente condensadas em intérfase, a ausência de associação com as regiões heterocromáticas para alguns dos *repeats* não-centroméricos sugere uma clara diferença na organização da cromatina entre os mesmos. Em metáfase, esses *repeats* apresentam-se parcialmente descondensados, formando alças externas ao cromossomo.
7. Três padrões de organização para os SatDNAs, possivelmente correlacionados a diferentes tipos de cromatina, foram identificados: associado aos

holocentrômeros com condensação e distribuição dependente do ciclo celular (Tyba); formando blocos associados à heterocromatina clássica, nitidamente condensada (*RcSAT2*, *RgSAT1* e *RgSAT2*); ou formando blocos não associados à uma cromatina compactada (*RcSAT20* e *RtSAT239*).

8. A presença de cromossomos holocêntricos e a sua consequente estrutura centromérica difusa parece não influenciar em larga escala a evolução cariotípica em *Rhynchospora*. Os números cromossômicos se mostraram consistentes e relativamente estáveis quando analisados em uma perspectiva evolutiva, demonstrando que fenômenos de quebras e fusões não ocorrem de maneira aleatória e frequente. Da mesma forma, a identificação de *repeats* ao longo de todo o cromossomo refutou a teoria inicialmente proposta de que em cromossomos holocêntricos as regiões terminais, livres de centrômero, seriam sítios preferenciais para o acúmulo de sequências satélites.

Normas da revista *Botanical Journal of the Linnean Society*

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1095-8339/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1095-8339/homepage/ForAuthors.html))

Instructions for Authors

The Linnean Society publishes four periodicals: the *Biological*, and *Zoological Journals*, and *The Linnean*, the Society's newsletter and proceedings.

The *Botanical Journal of the Linnean Society* publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. The journal will only publish new taxa in exceptional circumstances as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Submissions to the Botanical Journal are now made on-line using ScholarOne Manuscripts. To submit to the Journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/botjls>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision. Manuscripts submitted by other methods will not be considered.

Conflict of Interest

The *Botanical Journal of the Linnean Society* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or

Normas da Revista *Chromosoma*

(http://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/412?print_view=true&detailsPage=pltdci_1060507)

Authorship Policy

Types of Papers

- Research Articles

For Research Articles there are no strict limits on the length of text, the number of Figures or the number of references. However, authors are asked to present manuscripts in a concise fashion and use electronic supplementary material where appropriate. Results and Discussion can be in separate sections or combined.

- Reviews / Mini-Reviews

"Chromosoma" publishes both Mini-reviews and full Review articles. Mini-reviews are expected to comprise approximately 2,500 words and up to 4 display items (tables and figures). Full review articles may run up to 10,000 words (including references) and 10 display items. Reviews and mini-reviews should be preceded by an abstract (max. 300 words) that introduces the subject and summarizes the purpose and take-home message(s) of the article. The main text should be structured by using subtitles. The mini-review format is particularly appropriate for focusing on a recent highlight in a field, whereas the full review provides the opportunity for a more comprehensive survey of a research topic. Suggestions for review topics are welcome at all times, but review articles should be submitted only after prior approval by a member of the Editorial Board. All review articles will be subject to peer review.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.