

SILMAR LUIZ DA SILVA

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE *HALODULE*
WRIGHTII Asch., CYMODOCEACEAE,
PERNAMBUCO - BRASIL**

RECIFE, 2015

SILMAR LUIZ DA SILVA

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE *HALODULE*
WRIGHTII Asch., CYMODOCEACEAE,
PERNAMBUCO - BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do Título de Mestre em Botânica.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

CO-ORIENTADORA:

Prof^ª Dr^ª. Karine Matos Magalhães

RECIFE, 2015

Ficha catalográfica

S586e Silva, Silmar Luiz da
Estudo citogenético de *Halodule wrightii* Asch.,
Cymodoceaceae, Pernambuco - Brasil / Silmar Luiz da
Silva. – Recife, 2015.
51 f. : il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.

Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife,
2015.

Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

1. Bandeamento cromossômico 2. Heterocromatina
3. Monocotiledônea marinha 4. Variação cariotípica
I. Carvalho, Reginaldo de, orientador II. Título

CDD 581

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE *Halodule wrightii* Asch., CYMODOCEACEAE,
PERNAMBUCO - BRASIL**

SILMAR LUIZ DA SILVA

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em:

__/__/__

Prof.^a Dr.^a Maria Betânia Melo de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Titular

Prof.^a Dr.^a Margareth Ferreira de Sales

Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UFRPE

Titular

Dr.^a Luciana Dias de Oliveira

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Titular

Prof.^a Dra. Carmen Silvia Zickel

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Suplente

RECIFE – PE

2015

DEDICO

Às principais referências que nestas páginas não pude citar

Sebastina Barros da Silva

José Luiz da Silva (*In memoriam*)

“É meu filho... Não é fácil não. Bata com os pés na boca já que a
mão não alcança”.

Seu Zé.

AGRADECIMENTOS

Às Instituições

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo apoio institucional através do Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB);

À família

Minha mãe, Dona Sebastiana... Sempre comigo nas empreitadas a que me proponho fornecendo um suporte imensurável e que materialmente não há como pagar. Esta conquista é nossa e outras mais estão apenas nos esperando. Vamos! Mesmo que distante fisicamente Seu Zé sempre está comigo e seus ensinamentos me direcionam ao caminho que me conduzirá a ser uma pessoa melhor, um homem, um futuro pai de família uma pessoa digna de respeito e merecer a confiança dos companheiros. Lembrome que em uma de nossas conversas ele falava do futuro e dizia: meu filho... Estude... Seja um médico, um engenheiro, um arquiteto, um BOTÂNICO. Bem, hoje sou botânico. Desejo realizado Seu Zé.

Agradeço aos meus irmãos que não são poucos. Em destaque para minha irmã Celsa Alice que sempre fez o que esteve e que muitas vezes saiu do seu alcance para me ajudar. Minha última vitória não seria possível se ela não tivesse ativamente lutado ao meu lado para que eu conseguisse minha cirurgia. Mana essa vai para você.

Aos orientadores

Ao meu orientador Professor Reginaldo de Carvalho que desde meus primeiros passos no mestrado demonstrou grande paciência, compreensão e respeito aos meus problemas e sempre que possível forneceu suporte, conselhos e ajuda na bancada. À minha co-orientadora Professora Karine Matos Magalhães que sempre me escutou apoia minhas decisões e ajuda no possível.

Ao Laboratório de Citogenética Vegetal

Aos meus amigos que muito me ajudaram. Genialdo Ramos o que temos nestas páginas sem tua contribuição não seria a mesma. Quando nasceste teus pais olharam para você e pensaram: Este menino será um gênio quando crescer. Pois é, Gênio até no nome. Obrigado meu amigo. À minha amiga Viviane Moreira que além de me ajudar nas coletas e bancada na reta final em meio ao corre-corre vasculhou meus registros e encontrou resultados que acabaram por dá forma a este trabalho. Emmanuely Xavier que muito ajudou na coleta, bancada, organização, análise e escrita. Meus amigos Vanessa Oliveira, Lamonier Ramos, Angélica Marinho que também foram importantes e muito ajudaram na bancada, campo e análise. Horace Jimenez, David Oliveira, Karla Batista, Valesca Ravanny e Ana Raquel, obrigado pelo apoio.

Ao Laboratório de Ecossistemas Aquáticos

Às minhas amigas Joana D'Arc e Valeria Veronica macrofiteiras, À amiga Geiza que me seguiu da graduação para o LEAqua e se juntou com o pessoal do Recicla Rural (povo do lixo), mas que não me larga por nada. Anna Aca, Ailza Lima, Ingrid Lima (pense num anjo), Isabelle Trindade, Lucas Ferreira, todos vocês obrigado pelo companheirismo.

À Botânica

Aos professores da graduação e da pós-graduação que nos fazem crescer com sua experiência profissional, em especial aos professores: Carmen Zickel, Margareth Sales e Roxana Barreto (UFPE), Ariadne Moura que disse palavras que fizeram refletir sobre a minha vida acadêmica e que guardo comigo e faço uso sempre em situações pertinentes. À secretária Kênia Muniz que é uma pessoa sensacional, otimista, alegre e de espírito bom.

Aos amigos

Aos meus amigos que sempre estão por perto, Carlos Alberto, M^a Cecília, Geiza Lima, Wagner Ferreira, até mesmo aqueles que fisicamente estão longe, mas nada que a internet e as redes de telecomunicações não possa aproximar, meu caro Ivanison Lucena. Tantos outros que construíram uma história, mas que não citarei aqui.

Aos amigos que do PPGB, meu caro Rafael Reinaldo que em determinados momentos sentou junto a mim e tentou me ajudar mediante o possível. Caroline Ximenes que a pesar de tudo que discorreu nem nossa história permanece ao meu lado como minha amiga, sobretudo estando presente nos momentos de fragilidade quando me encontrava com a saúde debilitada. Esta conquista também te pertence.

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Angiospermas marinhas	16
2.2. A Família Cymodoceaceae.....	17
2.3. <i>Halodule wrightii</i>	18
2.3.1. Citogenética do gênero <i>Halodule</i>	19
2.4. Citomixia.....	20
2.5. Cromossomos B	21
2.6. Contribuições da Citogenética à taxonomia	22
3. REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO I.....	31
Caracterização citogenética da angiosperma marinha <i>Halodule wrightii</i> Asch., Cymodoceaceae	32
Introdução	33
Material e Métodos	34
Resultados	35
Discussão.....	36
Referências.....	40
APÊNDICE.....	45
ANEXO	50

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - Citomixia (a-e) e variação numérica em células metafásicas de *H. wrightii* com $2n = 24$ (f), $2n = 34$ (g) e $2n = 39$ (h).....47
- Figura 2** - Figura 2. Coloração convencional com Giemsa, nitrato de prata e CMA/DAPI de *H. wrightii*. a) coloração convencional com Giemsa; b) banda C-Giemsa, seta indica cromossomo B; c) nitrato de prata; d) DAPI; e) CMA, seta indica RON; f-h) DAPI, CMA e sobreposição, respectivamente. Seta indica cromossomo B. Barra = $10\mu\text{m}$ 48
- Figura 3** - Cariograma preliminar de *H. wrightii* ($2n = 38+1B$) apresentando o padrão de bandas heterocromáticas e cromossomo B. Barra $10\mu\text{m}$49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1** Análise morfométrica dos cromossomos de *Halodule wrightii* referente a indivíduos com $2n=38$ cromossomos com indicação para braço longo (BL); braço curto (BC); Comprimento total cromossômico (CTC); relação entre braço longo e curto (r); índice centromérico (IC); posição do centrômero (PC); índice de Assimetria intracromossômica (A_1); índice de assimetria intercromossômica (A_2) e Índice de assimetria de Huziwara (1962) TF%.....45
- Tabela 2** Indivíduos da população de *Halodule wrightii* da Baía de Suape que apresentaram células com citomixia. Foram analisados três campos na objetiva de 100x e contadas todas as células de cada campo para obtenção de média e desvio padrão (DP).....46
- Tabela 3** Números cromossômicos para espécies do gênero *Halodule* descrito previamente na.....46

RESUMO

Halodule wrightii Asch. é uma monocotiledônea marinha que tem todo seu ciclo submerso, dependente da água. Sua forma de reprodução mais frequente é a vegetativa por meio de *ramets* formando extensas pradarias permanentes, porém apresentando problemas no tratamento taxonômico, devido a dificuldade de localização das estruturas reprodutivas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar cariotipicamente *H. wrightii* através de técnicas citogenéticas. As lâminas foram preparadas utilizando-se a técnica de esmagamento seguida da coloração convencional com Giemsa a 2%, bandeamento C, Nitrato de prata e CMA/DAPI. Os cromossomos foram medidos e os valores utilizados para identificar o índice centromérico e a razão entre os braços. O número cromossômico de *H. wrightii* variou de $2n = 24$ a 39, sendo mais frequente $2n = 38$. O cariótipo foi caracterizado como tamanho médio, assimétrico, núcleo interfásico semi-reticulado e padrão de condensação uniforme. Foi relatado o fenômeno de citomixia em vários indivíduos. O bandeamento com Nitrato de prata mostrou a presença de dois núcleos indicando a presença de no máximo duas regiões organizadoras de nucléolos. O bandeamento C evidenciou um cromossomo totalmente heterocromático, o qual foi descrito como cromossomo B. A coloração CMA/DAPI apresentou bandas CMA⁺/DAPI em quase todos os cromossomos do cariótipo, as quais foram localizadas nas regiões proximais, intersticiais e subterminais. Não foi observada nenhuma banda DAPI⁺, porém alguns cromossomos apresentaram marcação CMA⁺/DAPI⁰. Alguns pares de cromossomos apresentaram marcação CMA⁺ dispersa ao longo dos braços. A quantidade e distribuição da heterocromatina observada em *H. wrightii* pode estar relacionada a eventos de remodelação da cromatina que, porventura, pode vir a explicar a adaptação da espécie ao ambiente marinho. Diante da variação interpopulacional encontrada na literatura e a variação cariotípica intrapopulacional encontrada no presente estudo, a citomixia parece ser o principal evento mantenedor dessa variação cromossômica que ocorre na espécie estudada e que possivelmente se caracteriza como evento evolutivo importante mediando à reorganização da cromatina.

Palavras-chave: bandeamento cromossômico, heterocromatina, monocotiledônea marinha, variação cariotípica

ABSTRACT

Halodule wrightii Asch. is a monocot marine has all his submerged cycle, dependent on the water. Its most common form is the reproduction of vegetative ramets by forming extensive permanent grasslands, but having problems in taxonomic treatment because of the difficulty in locating the reproductive structures. The objective of this study was to characterize karyotypically *H. wrightii* through cytogenetic techniques. Slides were prepared using the technique then crushing the conventional stained with Giemsa 2% stain, C-banding, silver nitrate and CMA / DAPI. The chromosomes were measured and the values used to identify the centromeric index and the ratio of the arms. The chromosome number of *H. wrightii* ranged from $2n = 24$ to 39, being more frequent $2n = 38$. The karyotype was characterized as medium-sized, asymmetrical, semi-crosslinked interphase nucleus and pattern of uniform condensation. Cytomixis the phenomenon has been reported in several individuals. The banding with silver nitrate showed the presence of two cores indicating the presence of at most two nucleolar organizer regions. C-banding revealed a totally heterochromatic chromosome, which was described as chromosome B. The coloring CMA/DAPI presented CMA⁺/DAPI⁻ bands in almost all chromosomes of the karyotype, which were located in the proximal surfaces, interstitial and subterminal. No DAPI⁺ band was observed, but some chromosomes showed CMA⁺/DAPI⁰ marking. Some chromosome pairs presenting CMA⁺ marking scattered along the arms. The amount and distribution of heterochromatin observed in *H. wrightii* may be related to chromatin remodeling events that perhaps might explain the adaptation of the species to the marine environment. Given the inter-population variation found in the literature and the intra-population variation karyotype found in the present study, the cytomixis seems to be the main event maintainer of this chromosomal variation that occurs in the species studied and possibly characterized as an important evolutionary event mediating the reorganization of chromatin.

Keywords: chromosome banding, heterochromatin, monocot marine, karyotype variation

1. INTRODUÇÃO

Dentro da família Cymodoceaceae, o gênero *Halodule* Endl é peculiar por ter a morfologia do ápice da folha como principal parâmetro na distinção das espécies (PHILLIPS, 1967; OLIVEIRA; PIRANI; GIULIETTI, 1983). Este parâmetro é variável dentro do gênero frente aos diferentes estágios do desenvolvimento (PHILLIPS *et al.*, 1974) e diferentes condições ambientais (PHILLIPS, 1960; MCMILLAN; PHILLIPS, 1979, BUJANG *et al.*, 2008). Diante deste problema, estudos citogenéticos podem contribuir para a melhor compreensão da taxonômica do gênero *Halodule* (DEN HARTOG, 1972; PHILLIPS; MEÑEZ, 1988), pois é uma ferramenta amplamente usada para entender as variações genéticas envolvidas na evolução de determinados grupos de plantas (GUERRA; NOGUEIRA, 1990; MELO *et al.*, 1997; BALTISBERGER; WIDMER, 2009).

Halodule wrightii Asch. é uma monocotiledônea marinha que tem todo seu ciclo submerso, dependente da água, inclusive para a reprodução sexuada (HEMMINGA; DUARTE, 2000; SHORT; COLES; PERGENT-MARTINI, 2001). Porém, o tipo de reprodução mais frequente é a forma vegetativa por meio de “ramets” formando extensas pradarias permanentes (LABOREL-DEGUEN, 1963; TOMLINSON, 1974).

Estudos citogenéticos em angiospermas marinhas são escassos e estão, em muitos casos, limitados apenas a contagens cromossômicas (DEN HARTOG *et al.*, 1979; DEN HARTOG *et al.*, 1987; KUO *et al.*, 1990; KUO, 2013). O único trabalho publicado para *H. wrightii* relata apenas o número cromossômico $2n = 44$, entretanto havia dúvidas quanto ao número exato devido ao grande número de cromossomos quando comparado com outras espécies, sugerindo assim que a população de *H. wrightii* fosse tetraploide. (DEN HARTOG *et al.*, 1979). Por este motivo, estudos de caracterização cromossômica são importantes para fornecer informações que podem auxiliar estudos taxonômicos, visto que muitas vezes para obter informações precisas sobre determinado táxon, faz-se necessário a utilização de técnicas que forneçam informações mais detalhadas como o bandeamento C e a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, por exemplo.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar citogeneticamente a espécie *H. wrightii* por meio de técnicas de coloração convencional e diferencial a fim de identificar características e/ou marcas citogenéticas que auxiliem nos estudos filogenéticos e taxonômicos da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Angiospermas marinhas

Atualmente, estima-se que sejam descritas cerca de 260 mil espécies vegetais, das quais 70% compreendem as angiospermas (JUDD *et al.*, 2009). Contudo, apenas 0,02% são marinhas (HEMMINGA; DUARTE, 2000), isto corresponde a 60 espécies distribuídas em cinco famílias: Cymodoceaceae, Hydrocharitaceae, Posidoniaceae, Ruppiaceae e Zosteraceae (DEN HARTOG; KUO, 2006). As angiospermas marinhas estão sistematicamente subordinadas a ordem Alismatales e comporta, em geral, as macrófitas aquáticas monocotiledôneas (APG III, 2009; JUDD *et al.*, 2009).

A ordem Alismatales é dividida em dois clados. O primeiro clado contém as famílias Alismataceae, Hydrocharitaceae e Butomaceae, e é sustentado por apomorfias como perianto diferenciado em sépalas e pétalas, mais de seis estames e/ou três carpelos e óvulos esparços sobre a superfície interna dos lóculos. O segundo clado tem como principais famílias Potamogetonaceae, Ruppiaceae, Zosteraceae, Posidoniaceae e Cymodoceaceae, e é sustentado principalmente por caracteres morfológicos do pólen que geralmente não apresenta aberturas e exina (JUDD *et al.*, 2009).

Angiospermas marinhas formam um grupo ecológico e não taxonômico, pois as famílias não estão necessariamente interligadas (HEMMINGA; DUARTE, 2000), por isso, é um grupo polifilético que envolve antecessores de água doce (Hydrocharitaceae), pântanos salinos (Zosteraceae) e exclusivamente marinhos (Cymodoceaceae e Posidoniaceae) (LES *et al.*, 1997; DEN HARTOG; KUO, 2006). A história evolutiva das angiospermas marinhas envolveu a aquisição de adaptações necessárias à colonização bem sucedida do habitat marinho, tais como: (1) folha laminar ou subulada com bainha, adaptada a ambientes de alta energia, (2) polinização hidrófila, (exceto para do gênero *Enhalus* Rich.), e (3) sistemas lacunares que permitam o suprimento de oxigênio exigido por suas estruturas subterrâneas em sedimentos anóxicos (HEMMINGA; DUARTE, 2000).

Estas plantas podem coexistir com outras espécies cobrindo extensas áreas, mas em geral formam prados monoespecíficos (HEMMINGA; DUARTE, 2000; SPALDING *et al.*, 2003). Algumas pradarias destas plantas formam verdadeiras

florestas submersas sob o qual existe uma intrincada associação faunística e florística (PACOBAYHA *et al.*, 1993; BELL, 2001; BARROS; ROCHA-BARREIRA, 2010). Estas pradarias estão presentes na zona costeira de todo o mundo exceto nos polos (HEMMINGA; DUARTE, 2000) e podem ser encontradas desde a zona entre marés até 90 metros de profundidade (DUARTE, 1991).

As plantas marinhas são fundamentais nos ecossistemas costeiros, pois têm alta taxa de produtividade (DUARTE, 1991), seus sistemas de raízes e rizomas fixam e estabilizam o sedimento, além se realizarem ciclagem de nutrientes e removerem contaminantes (LACERDA, 1986; SPALDING *et al.*, 2003). Suas folhas fornecem substrato para organismos epífitos (PACOBAYHA *et al.*, 1993), alimento para diversos táxons (HECK JR; VALENTINE, 2006) e berçário e abrigo para táxons de importância econômica, como a unha-de-velho (*Tagelus gibbus* Spengler, 1794) e o peixe-agulha (*Hyporhamphus unifasciatus*, Ranzani, 1841) (ALVES, 2000; SPALDING *et al.*, 2003). Atualmente o ecossistema formado pelas angiospermas marinhas têm sido o foco de conservacionistas, pois nos últimos anos observou-se redução na cobertura vegetal em todo mundo (SHORT *et al.*, 2006). Tais perdas implicam em redução de lucro visto que os ecossistemas formados pelas angiospermas marinhas geram cerca de 19.000,00 dólares por hectare (COSTANZA *et al.*, 1997), além de perdas em biodiversidade pois, em muitos casos são o principal item alimentar de espécies em risco de extinção, como peixe-boi marinho e tartaruga verde (SEMINOFF, 2004).

2.2. A Família Cymodoceaceae

Cymodoceaceae é uma família monofilética composta por 17 espécies alocadas em cinco gêneros, *Amphibolis* C. Agardh (2 spp.), *Cymodocea* K.D. Koenig (4 spp.), *Halodule* (7 spp.), *Syringodium* Kütz. (2 spp.) e *Thalassodendron* Hartog (2 espécies) (DEN HARTOG; KUO, 2006).

A família é representada por ervas dióicas, perenes, marinhas e com ramificações monopodial e simpodial. Caule ereto com uma aparência anelar. Folhas dísticas com bainha e lâmina distintas, liguladas e auriculatas; lâmina plana e linear ou cilíndrica. Flores subsésseis solitárias ou em inflorescências paniculadas, perianto ausente ou raramente 1-3 brácteas. Flor estaminada subséssil ou pedicelada, 2 anteras com pólen filiforme. Flor pistilada com 2 carpelos livres, sésseis, cada um com um estilete; estilete não dividido ou com 2-3 estigmas filiformes. Polinização hidrófila.

Fruto indescente, ou reprodução vivípara (KUO; DEN HARTOG, 2001; BEENTJE, 2002; DEN HARTOG; KUO, 2006).

Em termos taxonômicos a família pode ser dividida em dois grupos: 1. *Cymodocea*, *Halodule* e *Syringodium*, que apresentam rizoma monopodial herbáceo, e a lâmina foliar forma uma única unidade; 2. *Amphibolis* e *Thalassodendron* que apresentam rizoma simpodial lignificado, a lâmina foliar é liberada como unidades individuais e emitem plântulas vivíparas (GREEN; SHORT, 2003; DEN HARTOG; KUO, 2006). Todos os gêneros são bem estabelecidos taxonomicamente excetuando o gênero *Halodule*, pois não há consenso quanto ao número de espécies (DEN HARTOG; KUO, 2006; SHORT *et al.*, 2007).

No Brasil a família é representada por duas espécies do gênero *Halodule*, *H. emarginata* Hartog e *H. wrightii* Asch., porém a existência da primeira foi questionada devido a plasticidade morfológica (PHILLIPS, 1967). Os parâmetros morfológicos considerados nos estudos taxonômicos do gênero *Halodule* compreendem: diâmetro do rizoma, comprimento dos entrenós, comprimento e largura da lâmina foliar, bainha e forma do ápice (DEN HARTOG, 1960, 1970, 1972; OLIVEIRA; PIRANI; GIULIETTI, 1983). Porém, o número de espécies para o gênero ainda gera discussão (PHILLIPS; MEÑEZ, 1988; HEMMINGA; DUARTE, 2000; GREEN; SHORT, 2003; DEN HARTOG; KUO 2006). Isto se deve ao fato de o principal caráter taxonômico ser a morfologia da folha e esta é passível de variações mediante as diversas condições ambientais (PHILLIPS, 1960, 1967, 1974; PHILLIPS; MEÑEZ, 1988; BUJANG *et al.*, 2008). Desta forma, o número variável de espécies se dá pelas diversas identificações dos ecótipos de *H. wrightii*, levando a crer que os caracteres morfológicos em especial para as angiospermas marinhas não as distinguem uma das outras (DEN HARTOG; KUO 2006).

2.3. *Halodule wrightii*

Halodule wrightii é a angiosperma marinha da família Cymodoceaceae que melhor se distribui ao longo da Costa Oeste do Atlântico, encontrada desde o estado da Carolina do Norte (EUA) até Paraná (Brasil), apresentando-se como dominante no Golfo do México e na costa brasileira, é registrada na costa Leste do Atlântico nas Ilhas Canárias, Marrocos até Angola (GREEN; SHORT, 2003; SHORT *et al.*, 2007). É considerada estenobionte, contudo, sabe-se que esta espécie tolera grandes variações

ambientais, como altos valores de temperatura, salinidade, turbidez, eutrofização e profundidade (PHILLIPS; MEÑEZ, 1988; CREED; PHILLIPS; VAN TUSSENBROEK, 2003; KOCH *et al.*, 2007).

Os requerimentos para ocorrência de *H. wrightii* se situam em torno de 29 °C de temperatura, 17–37% de luminosidade e salinidade em torno de 35% (DENNISON *et al.*, 1993; DUNTON; TOMASKO, 1994; KENWORTHY; FONSECA, 1996). Estudos realizados por Laborel-Deguen (1963) em Pernambuco mostraram que *H. wrightii* é encontrada em áreas geralmente abrigadas por arrecifes de arenito e de corais, e desembocadura de estuários, em locais de até o limite de 10 metros de profundidade.

Halodule wrightii é uma planta é dióica, perene, submersa em água salgada que apresenta rizoma com 0,2–2 mm de diâmetro; entrenós 0,4–3,5 cm de comprimento; bainha 1–4 cm de comprimento; lâmina foliar 2–22 cm de comprimento e 0,2–1,5 mm de largura; linear com nervuras laterais inconspícuas que muitas vezes termina em um ápice acuminado, sendo o mediano geralmente maior; ápice pode se apresentar em forma bicúspide ou tricúspide. Flores estaminadas com uma haste de 1–2,4 cm de comprimento, anteras delgadas com ca. 3,5 mm de comprimento de cor vermelha; flores pistiladas subsésseis com um ovário obovado ou globoso, ca. 1,5 mm de comprimento, estilete de 1–2,6 cm de comprimento, ovário e estilete avermelhados por células de tanino. Fruto obovado, ligeiramente comprimido, ca. 2,5 mm de comprimento, com estilete persistente ou um curto rostro (WOODSON *et al.*, 1975; OLIVEIRA; PIRANI; GIULIETTI, 1983).

2.3.1. Citogenética do gênero *Halodule*

Os estudos citogenéticos para angiospermas marinhas são escassos. A primeira e única contagem cromossômica para *Halodule wrightii* foi realizada por den Hartog *et al.* (1979) nas Antilhas Holandesas. Esses autores determinaram o número cromossômico $2n = 44$, para *Syringodium filiforme* Kütz. ($2n = 20$) e *Thalassia testudinum* Banks & Sol. ex K.D.Koenig ($2n = 18$). Com base no elevando número cromossômico registrado para *H. wrightii* em relação às demais espécies do estudo, os autores sugeriram que a população estudada fosse tetraplóide.

Kuo (2013) determinou o número cromossômico para as plantas marinhas da família Cymodoceaceae ocorrentes na Austrália, visando discutir aspectos taxonômicos,

evolutivos e de distribuição dentro do grupo. As espécies estudadas foram: *Cymodocea angustata* Ostenfeld e *C. rotundata* Ehrenberg et Hemprich ex Asch. com $2n = 14$ e *C. serrulata* (R. Brown) Asch. et Magnus com $2n = 14$ e 28; *Halodule pinifolia* (Miki) den Hartog ($2n = 32$) e *H. uninervis* (Forssk.) Asch. com $2n = 32$ e *H. tridentata* (Steinh.) Endl. ex Unger ($2n = 16$) (sinônimo de *H. uninervis*). Baseado nos dados cariológicos, o autor afirma que os cinco gêneros (*Amphibolis*, *Cymodocea*, *Halodule*, *Syringodium* e *Thalassodendron*) são distintos entre si e dados moleculares com marcadores (ITS, *rbcL* e *trnL*) sustentam esta afirmação (WAYCOTT *et al.*, 2006). Ao discutir sobre os resultados de *Cymodocea*, o autor defende que a especiação do grupo pode estar ligada a variações morfológicas, bioquímicas e moleculares, mas sem variação no número de cromossomos apontada por den Hartog *et al.* (1987). Quanto aos resultados para *Halodule*, o número cromossômico de *H. pinifolia* corresponde ao relatado por Den Hartog *et al.* (1979) para a população de *H. wrightii* das Antilhas Holandesas em que os autores afirmaram ser a espécie um tetraplóide devido ao elevado número de cromossomos.

O número cromossômico para *H. uninervis* e *H. tridentata* foram diferentes de *H. pinifolia* o que não era de se esperar visto que elas estão mais correlacionadas. Considerando den Hartog *et al.* (1979), podemos afirmar que para *H. wrightii* o número haplóide é $n = 11$. Para Kuo (2013) temos *H. pinifolia* $n = 11$, *H. uninervis* $n = 16$ e *H. tridentata* $n = 8$. Atualmente *H. tridentata* é tratada como sinônimo de *H. uninervis*, o que sugere ser o seu número haplóide é $n = 8$.

Porém, Ito e Tanaka (2011) realizaram um estudo de hibridização com *Halodule* relacionando a dados citogenéticos. O número cromossômico das espécies estudadas (*H. pinifolia* e *Halodule* híbrido) foi $2n = 44$, o mesmo registrado para *H. wrightii*. Em suas conclusões, Ito e Tanaka refutam a ideia de poliploidia sugerida por den Hartog *et al.* (1979), pois as análises de hibridização mostram apenas uma cópia de *phyB* nas amostras sugerindo que não ocorre poliploidização no gênero e que as espécies são diplóides.

2.4. Citomixia

O fenômeno de citomixia é caracterizado pela migração de cromatina, produtos gênicos e organelas entre células adjacentes através de canais citoplasmáticos ou pontes intercelulares (FALISTOCCO *et al.*, 1995; LATTOO *et al.*, 2006). A citomixia ocorre

geralmente nas células-mãe dos grãos de pólen e meristemáticas, e, provavelmente é um fenômeno citológico normal, que ocorre sob controle genético direto e fatores fisiológicos que podem ser modificados, como estresse ambiental e poluição (HAROUN, SHEHRI; WADIE, 2004; SONG; LI, 2009).

A citomixia ocorre geralmente na prófase I e pode ocorrer por meio de conexões citoplasmáticas ou fusão direta, sendo a primeira a mais frequente (SOUZA; PAGLIARINI, 1997; SONG; LI, 2009). A migração pode ocorrer do núcleo de uma célula para uma ou mais células ou partir de mais de duas para uma única célula (SONG; LI, 2009). Dependendo da natureza da citomixia, pode haver variações na quantidade de cromatina e/ou número de cromossomos sendo formadas células aneuplóides e até mesmos poliplóides por fusão direta dependendo do número de células envolvidas (HAROUN; SHEHRI; WADIE, 2004).

2.5. Cromossomos B

Cromossomos B são cromossomos extras para o complemento padrão que ocorrem em muitos organismos. Eles podem se originar de várias formas, derivando-se dos cromossomos autossômico, polissômicos e sexuais, a partir de fragmentos cêntricos resultantes de fusões, ampliação da região pericentromérica ou de um fragmentado de cromossomo A (GUERRA 1988; CAMACHO *et al.*, 2000). A sua evolução molecular é semelhante aos demais cromossomos e envolve a supressão de genes, heterocromatização e a acumulação de DNA repetitivo e de transposons. Estudos citológicos e moleculares recentes suportam a noção de que os cromossomos B parecem ser derivados do complemento autossômico da espécie hospedeira atual (CAMACHO *et al.*, 2000).

A frequência de cromossomos B em populações é controlada pelo genoma do hospedeiro podendo ser transmitidos, eliminados ou suprimidos. Os cromossomos B interagem com os cromossomos normais, e podem desempenhar um papel importante na evolução do genoma e útil para o estudo de processos evolutivos moleculares (CAMACHO *et al.*, 2000). Contudo, cromossomos B não são essenciais de modo que podem ser perdidos sem acarretar consequências (GUERRA 1988; CAMACHO *et al.*, 2000; JONES; HOUBEN, 2003). Porém, alguns cromossomos B podem impor fortes formas de conflito intra-genômico, como no cromossomo sexual paterno da vespa

Nasonia vitripennis (Walker, 1836), transmitidos exclusivamente através do esperma (SWIM *et al.*, 2012).

2.6. Contribuições da Citogenética à taxonomia

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução, assim, a citogenética se expandiu dentre os diversos campos da biologia, como taxonomia, medicina clínica e melhoramento animal e vegetal (GUERRA, 1988).

A citogenética pode ser dividida em citogenética clássica e moderna ou molecular. A citogenética clássica se caracteriza pela observação de cromossomos e núcleos interfásicos corados com o uso de técnicas relativamente simples, utilizando-se corantes como o Feulgen, o Carmin, a Orceína acética ou mais frequentemente o Giemsa (GUERRA, 1983). Com essa técnica tem sido possível realizar análises citotaxonômicas, onde a mais simples delas consiste em determinar e comparar o número cromossômico de espécies de um determinado táxon (RODRIGUES; SOUZA; CORRÊA, 2012; KUO, 2013). Frequentemente é possível reconhecer o número cromossômico ancestral de um grupo e inferir relações filogenéticas que norteiam diferentes linhas evolutivas criadas por graduais variações envolvendo principalmente variações numéricas (LES; PHILBRICK, 1993; GUERRA, 2008).

O número cromossômico continua sendo o parâmetro mais utilizado na citotaxonomia vegetal (GUERRA, 1990). Mas, há situações em que o número cromossômico e os parâmetros morfométricos obtidos com a coloração convencional não apresentam informações para distinguir espécies muito próximas. Por isso, o bandejamento cromossômico surgiu a partir da necessidade em parear corretamente os cromossomos que por meio das técnicas convencionais de coloração eram difíceis de identificar os respectivos pares, (GUERRA, 1988) além de detectar variações numéricas e estruturais e comparar cariótipos de espécies relacionadas (ALMEIDA *et al.*, 2007; FELIX *et al.*, 2011). Em estudos evolutivos, o bandejamento possibilita a observação detalhada das transformações que ocorreram em grupos e espécies próximas que apresentam cariótipos muito semelhantes (VANZELA; GUERRA, 2000).

Através do bandejamento cromossômico, pode ser reconhecida a heterocromatina constitutiva através da técnica de bandejamento C, onde as regiões mais

intensamente coradas com Giemsa evidenciam a sua presença ou através da coloração com fluorocromos base-específicos especialmente a cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamido-2-fenilindol (DAPI) que marcam regiões heterocromáticas ricas em bases C-G e A-T, respectivamente (GUERRA, 2000).

A heterocromatina pode ser dividida em heterocromatina constitutiva e facultativa. A primeira consiste na parte da cromatina que permanece condensada durante todo o ciclo, se apresenta em blocos nos homólogos, não contém genes estruturais e concentra a maior parte do DNA satélite; A segunda ora se comporta como heterocromatina ora como eucromatina típica distinguindo da primeira por aparecer em apenas um dos homólogos (GUERRA, 1988). Atualmente ela é uma plataforma dinâmica destinada a recrutar e espalhar uma infinidade de proteínas reguladoras para controlar vários processos cromossômicos, incluindo a transcrição, a segregação cromossômica e interações da cromatina (DILLON, 2004; GREWAL; JIA, 2007).

O uso de técnicas de bandeamento cromossômico com CMA/DAPI tem sido muito empregado em estudos de caracterização. Vanzela e Guerra (2000) analisaram cinco espécies de *Rhynchospora* Vahl e identificaram padrão de bandas CMA⁺/DAPI⁺ diferente entre as espécies, variando quanto a local (proximal, terminal e intersticial) e distribuição dos blocos, sendo estes individualizados e intercalados. Feitoza *et al.* (2010) ao estudar espécies das famílias Limnocharitaceae e Alismataceae relatou a co-localização de bandas CMA⁺/DAPI⁺ e sítios de DNAr 45S. Além disso, o padrão de bandas CMA/DAPI pode fornecer informações evolutivas importantes, como as relatadas no trabalho realizado por Costa e Forni-Martins (2004). Neste estudo os autores indicam que a regiões cromossômicas marcadas por CMA e DAPI são compostas de heterocromatina constitutiva e que a diferença numérica e posição similar de bandas heteromórficas CMA⁺/DAPI⁺ entre as populações diplóides e triplóides indica que uma das populações é um citótipo autopoliploide.

3. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. C. S.; PAULO, C. L. C.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 155, p. 541-547. 2007.

ALVES, M. S. Fauna associada aos prados de *Halodule wrightii* Aschers. In. BARROS, H. M.; ESKINAZI-LEÇA, E.; MACÊDO, S. J.; LIMA, T. (eds.) **Gerenciamento**

participativo de estuários e manguezais. Ed. Universitária da UFPE, Recife. 2000. p. 75-87.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 161, p. 105-121. 2009.

BALTISBERGER, M.; WIDMER, A. Chromosome numbers and karyotypes within the *Ranunculus alpestris*-group (Ranunculaceae). **Organisms, Diversity & Evolution**, n. 9, p.232-243. 2009.

BARROS, K. V. S.; ROCHA-BARREIRA, C. A. Responses of the molluscan fauna to environmental variations in a *Halodule wrightii* Asch. ecosystem from Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n. 4, p. 1397-1410. 2013.

BEENTJE H, J. Cymodoceaceae. In: BEENTJE H.J.; SMITH SAL (eds), **Flora of tropical East Africa**, A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, p. 1-10. 2002.

BELL, K. I.; COWLEY, P. D.; WHITFIELD, A. K. Seasonality in Frequency of Marine Access to an Intermittently Open Estuary: Implications for Recruitment Strategies. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 52, p. 327-337. 2001.

BUJANG, J. S.; NAZRI, N. A.; ZAKARIA, M. H.; OGAWA, H. Morphological plasticity of *Halodule* species in response to different environments. **Marine Research. Indonesia** v. 33, n. 1, p. 11-16. 2008.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 355, p. 163-178. 2000.

COSTA, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R. A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus*. **Aquatic Botany**, v. 79, p. 325–332. 2004.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; DE GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; BRUCE, H.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R.V.; PARUELO, J.; RASKIN, R.G.; SUTTON, P.; VAN DEN BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253-260. 1997.

- CREED, J. C.; PHILLIPS, R. C.; VAN TUSSENBROEK, B. I. The seagrasses of the Caribbean. In GREEN, E. P. SHORT, F. T. (Eds.). **World atlas of seagrasses**. p. 234-250. 2003.
- DEN HARTOG, C. New seagrasses from Pacific Central America. **Pac. Nat.**, v. 1, n. 15, p. 1-8. 1960.
- DEN HARTOG, C. *Halodule emarginata* nov. sp. a new seagrass from Brazil (Potamogetonaceae) **Blumea**, v. 18, p. 65-66. 1970.
- DEN HARTOG, C. The sea-grasses of Brazil. **Acta Botanica Neerlandica**, n. 21, v. 5, p. 512-516. 1972.
- DEN HARTOG, C.; KUO, J. Taxonomy of seagrasses. In. LARKUM, A. W. D.; ORTH, R. J.; DUARTE, C. D. (Eds.). **Seagrasses: biology, ecology and conservation**. Springer: Netherlands. 2006. p.1-23.
- DEN HARTOG, C.; VAN LOENHOUD, P. J.; ROELOFS, J. G. M.; VAN DE SANDE, J. C. P. M. Chromosome numbers of three seagrasses from the Netherlands Antilles. **Aquatic Botany**, n. 7, p. 267-271. 1979.
- DEN HARTOG, C.; HENNEN, J.; NOTEN, T. M. P. A.; VAN WIJK, R. J. Chromosome numbers of the European seagrasses. **Plant Systematic and Evolution**, v. 156, p. 55-59. 1987.
- DENNISON, W. C.; ORTH, R. J.; MOORE, K. A.; STEVENSON, J. C.; CARTER, V.; KOLLAR, S.; BERGSTROM, P. W.; BATUIK, R. A. Assessing water quality with submersed aquatic vegetation. **Bioscience**, n. 43, p. 86-94. 1993.
- DILLON, N. Heterochromatin structure and function. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 631-637. 2004. doi:10.1016/j.biocel.2004.06.003
- DUARTE, C. M. Allometric scaling of seagrass form and productivity. **Marine Ecology Progress Series**, v. 77, p.289-300. 1991.
- DUNTON, K. H.; TOMASKO, D. A. In situ photosynthesis in the seagrass *Halodule wrightii* in a hypersaline subtropical lagoon. **Marine Ecology Progress Series**, v. 107, p. 281-293. 1994.

- FALISTOCCO, E., TOSTI, N.; FALCINELLI, M. Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of origins of 2n gametes. **Journal of Heredity**, v.86, p. 448-453. 1995.
- FEITOZA, L. L.; MARTINS, M. I. G.; CASTRO, A. A. J. F.; FÉLIX, L. P.; CARVALHO, R. Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 286, p. 199-208, 2010.
- FELIX, W. J. P.; FELIX, L. P.; MELO, N. F.; DUTILH, J. H. A.; CARVALHO, R. Cytogenetics of Amaryllidaceae species: heterochromatin evolution in different ploidy levels. **Plant Systematics and Evolution**, v. 292, p. 215–221. 2011. DOI 10.1007/s00606-011-0418-2
- GREEN, E. P.; SHORT, F. T. **World Atlas of Seagrasses**. Berkeley, University of California Press. 2003. 298p.
- GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v.8, p.35-46. 2007.
- GUERRA, M. O uso de Giemsa na citogenética vegetal - Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e cultura**, v. 35, n. 2, p. 190-193. 1983.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988. 142p.
- GUERRA, M. Asituação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Acta bot. bras.* v.4, n. 2, p. 75-86. 1990.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041. 2000.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenet and Genome Research**, v. 120, p. 339–350. 2008. doi: 10.1159/000121083

- GUERRA, M. S.; NOGUEIRA, M. T. M. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (Asteraceae: Senecioneae) occurring in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, n. 170, p. 229-236. 1990.
- HAROUN, S. A.; SHEHRI, A. M. AI; WADIE H. M. AI. Cytomixis in the Microsporogenesis of *Vicia faba* L. (Fabaceae). **Cytologia**, v. 69, n. 1, p. 7–11, 2004
- HECK JR, L.; VALENTINE, J. F. Plant–herbivore interactions in seagrass meadows. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 330, p. 420–436. 2006.
- HEMMINGA, M. A., DUARTE, C. M. **Seagrass ecology**. Cambridge University 2000. Press. 298p.
- ITO, Y.; TANAKA, N. Hybridisation in a tropical seagrass genus *Halodule* (Cymodoceaceae), inferred from plastid and nuclear DNA phylogenies. **Telopea**, n. 13, p. 219-231. 2011.
- JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **TRENDS in Plant Science**, v.8, n. 9, p. 417-423. 2003. doi:10.1016/S1360-1385(03)00187-0
- JUDD, W.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. 3 ed. Porto Alegre, artmed. 2009. 632p.
- KENWORTHY, W.J.; FONSECA. M.S. Light Requirements of Seagrasses *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme* derived from the relationship between diffuse light attenuation and maximum depth distribution. **Estuaries**, n.19, p.740-750. 1996.
- KOCH, M. S.; SCHOPMEYER, S.; KYHN-HANSEN, C.; MADDEN, C.J. Synergistic effects of high temperature and sulfide on tropical seagrass. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** n. 341, p. 91–101. 2007.
- KUO, J.; JAMES, S. H.; KIRKMAN, H.; DEN HARTOG, C. Chromosome numbers and their systematic implications in Australian marine angiosperms: the Posidoniaceae. **Plant Systematics and Evolution** v. 171, p.199-204. 1990.

- KOU, J.; DEN HARTOG, C. Seagrass taxonomy and identification key. In SHORT, F. T.; COLES, R. G. (Eds.) **Global Seagrass Research Methods**. Elsevier Science, New York. 2001. p. 31-58.
- KUO, J. Chromosome numbers of the Australian Cymodoceaceae. **Plant Systematics and Evolution**. n. 299, p. 1443-1448. 2013.
- LABOREL-DEGUEN, F. Nota preliminar sobre a ecologia das pradarias de fanerógamas nas costas dos estados de Pernambuco e Paraíba. **Trabalhos do Instituto de Biologia Marítima e Oceanografia**. p.39-50. 1963.
- LACERDA, L. D. Pesquisas brasileiras sobre ciclagem de nutrientes em ecossistemas costeiros: identificação de prioridades. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.1 p. 3-27. 1986.
- LATTOO, S. K.; KHAN, S.; BAMOTRA, S.; DHAR, A. K. Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 5, p. 629–637. 2006.
- LES, D. H.; PHILBRICK, C. T. Studies of hybridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms: evolutionary implications. **Aquatic Botany**, v. 44, p. 181-228. 1993.
- LES, D. H.; CLELAND, M. A.; WAYCOTT, M. A Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. **Systematic Botany**, v. 22, p. 443-463. 1997.
- MELO, N. F.; GUERRA, M.; BENKO-JSEPPON, A. M.; MENEZES, N. L. Cytogenetics and cytotaxonomy of Velloziaceae. **Plant Systematics and Evolution**, n. 204, p. 257-273. 1997.
- MCMILLAN, C.; PHILLIPS R. C. *Halodule wrightii* Aschers. in the sea of Cortez, Mexico. **Aquatic Botany**, n. 6, p. 393-396. 1979.
- OLIVEIRA, E. C.; PIRANI, J. R.; GIULIETTI, A. M. The Brazilian seagrasses. **Aquatic botany**, n 16, p.251-267. 1983.

- PACOBAYHA, L. D.; ESKINAZI-LEÇA, E.; SILVA-CUNHA, M. G.; KOENING, M. L. Diatomáceas (Bacilariophyceae) epífitas na fanerógama marinha *Halodule wrightii* Aschers (Cymodoceaceae). **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 22, p. 39-63. 1993.
- PHILLIPS, R. C. Environmental effect on leaves of *Diplanthera* du petit-thouars. **Bulletin of marine Science of the Gulf and Caribbean**. n. 40. p. 346-353. 1960.
- PHILLIPS, R. C. On species of the seagrass, *Halodule* in Florida. **Bulletin of Marine Science**. n. 17, v. 3, p. 673-676. 1967.
- PHILLIPS, R. C.; MCMILLAN, C.; BITTAKER, H. F.; HEISER, R. *Halodule wrightii* Asch. in the Gulf of Mexico. **Contributions in Marine Science**, v. 18, p. 257-261. 1974.
- PHILLIPS, R. C.; MEÑEZ, E. G. Seagrasses. Washigton: **Smithsonian contributions to the Marine Sciences**, n 34. 1988. 104p.
- RODRIGES, P. S.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, R. X. Karyomorphology of *Caesalpinia* Species (Caesalpinioideae: Fabaceae) from Caatinga and Mata Atlantica Biomes of Brazil. **Journal of Plant Studies**, v. 1, n. 2, p. 82-91. 2012. doi:10.5539/jps.v1n2p82
- SEMINOFF, J.A. *Chelonia mydas*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2004. Disponível em: <www.iucnredlist.org>
- SHORT, F. T.; COLES, R. G.; PERGENT-MARTINI, C. Global seagrass distribution. In SHORT, F. T.; COLES, R. G. (Eds.) **Global Seagrass Research Methods**. Elsevier Science, New York. 2001. p.5-29.
- SHORT, F. T.; KOCH, E. W.; CEED, J. C.; MAGALHÃES, K. M.; FERNANDEZ, E.; GAECKLE, J. L. SeagrassNet monitoring across the Americas: case studies of seagrass decline. **Marine Ecology**. v. 27 p. 277-289. 2006.
- SHORT, T.; CARRUTHERS, T.; DENNISON, W.; WAYCOTT, M. Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n 350, p. 3-20. 2007.

SOUZA, A. M.; PAGLIARINI, M. S. Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (Brassicaceae). **Cytologia**, v. 62, p. 25-29. 1997.

SONG, Z.; LI, X. Cytomixis in Pollen Mother Cells of *Salvia miltiorrhiza*. **Caryologia**, v. 62, n. 3, p. 213-219. 2009.

SPALDING, M.; TAYLOR, M.; RAVILIOUS, C. SHORT, F.; GREEN, E. The distribution and status of seagrasses. In GREEN, E. P.; SHORT, F. T. **World Atlas of Seagrasses**. Berkeley, University of California Press. 2003. p.5-26.

SWIM, M. M.; KAEDING, K. E.; FERREE, P. M. Impact of a selfish B chromosome on chromatin dynamics and nuclear organization in *Nasonia*. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 21, p. 5241-5249. 2012.

TOMLINSON, P. B. Vegetative morphology and meristem dependence - the foundation of productivity in seagrass. **Aquaculture**, n. 4, p. 107-130. 1974.

VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 453-456. 2000.

WAYCOTT, M.; PROCACCINI, G.; LES, D. H.; REUSCH, T. B. Seagrass evolution, ecology and conservation: a genetic perspective. In: LARKUM A.W.D.; ORTH, R. J.; DUARTE, C. M. (eds) **Seagrasses: biology, ecology and conservation**. Springer: Netherlands. 2006. p. 25-50.

WOODSON, R. E. JR.; SCHERY, R. W. Flora of Panama Part II Family 3A. Potamogetonaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v 62, n. 1, p. 1-10. 1975.

CAPÍTULO I

Caracterização citogenética da angiosperma marinha *Halodule wrightii* Asch., Cymodoceaceae

MANUSCRITO A SER ENVIADO À REVISTA:
PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION

Caracterização citogenética da angiosperma marinha *Halodule wrightii* Asch., Cymodoceaceae

Silmar Luiz Da Siva¹, Karine Matos Magalhães² e Reginaldo de Carvalho¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco; Departamento de Biologia, Genética; Programa de Pós-graduação em Botânica; Laboratório de Citogenética Vegetal, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco; Departamento de Biologia, Ecologia; Recife, Pernambuco, Brasil. Laboratório de Ecossistemas Aquáticos, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail para correspondência: reginaldo.ufrpe@gmail.com

RESUMO

Halodule wrightii Asch. é uma monocotiledônea marinha que se reproduz principalmente de forma vegetativa e apresenta problemas taxonômicos, devido a dificuldade de localização das estruturas reprodutivas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar cariotipicamente *H. wrightii* através de técnicas citogenéticas. As lâminas foram preparadas utilizando-se a técnica de esmagamento seguida da coloração convencional com Giemsa a 2%, bandeamento C, Nitrato de prata e CMA/DAPI. O número cromossômico de *H. wrightii* variou de $2n = 24$ a 39, sendo mais frequente $2n = 38$. O cariótipo foi assimétrico, núcleo interfásico semi-reticulado e padrão de condensação uniforme. Foi relatado o fenômeno da citomixia. O bandeamento com Nitrato de prata mostrou a presença de dois núcleos indicando a presença de no máximo duas regiões organizadoras de nucléolos. O bandeamento C evidenciou um cromossomo totalmente heterocromático, o qual foi descrito como cromossomo B. A coloração CMA/DAPI apresentou bandas $CMA^+/DAPI^-$ em quase todos os cromossomos do cariótipo, as quais foram localizadas nas regiões proximais, intersticiais e subterminais. Alguns pares de cromossomos apresentaram marcação CMA^+ dispersa ao longo dos braços. O número cromossômico foi diferente do registrado na literatura e a variação cromossômica intrapopulacional encontrada foi associada a citomixia e cromossomos B que são dois eventos responsáveis por diversificação cariotípica. Os dados de coloração diferencial são os primeiros para a espécie e sugerem que o padrão de distribuição e quantidade de heterocromatina estejam associados a remodelação da cromatina.

Palavras-chave: bandeamento cromossômico, heterocromatina, monocotiledônea marinha, variação cariotípica

Introdução

O gênero *Halodule* Endl é considerado um complexo taxonômico. A principal característica que distingue as espécies deste grupo é a morfologia do ápice foliar (Phillips 1967; Oliveira et al. 1983). Porém, esta característica é variável dentro do gênero frente aos diferentes estágios do desenvolvimento da planta (PHILLIPS *et al.*, 1974) e de diferentes condições ambientais (Phillips 1960; Mcmillan e Phillips 1979; Bujang et al. 2008). Por isso, den Hartog (1972) propôs a realização de investigações citogenéticas para auxiliar os estudos taxonômicos relacionados ao gênero. Contudo, o estudo citogenético realizado por den Hartog et al. (1979) representou a primeira contagem cromossômica para *Halodule wrightii* Asch. ($2n = 44$) seguido de contagens cromossômicas para *H. uninervis* (Forsskål) Asch. ($2n = 16, 32$) e *H. pinifolia* (Miki) den Hartog ($2n = 23, 44$) (Ito e Tanaka 2011; Kuo 2013).

Os estudos citogenéticos para o gênero não dispõem de informações precisas sobre o cariótipo destas espécies, devido à dificuldade de obtenção de material favorável para obtenção de metáfases com bom espalhamento cromossômico e bom nível de condensação cromossômica, principal requisito para análises cromossômicas. As variações cromossômicas numéricas merecem atenção, pois podem estar relacionadas a evolução do grupo (Guerra 2008). No entanto, há muitos casos em que apenas a contagem cromossômica não fornece informações precisas sobre determinado táxon (Baltisberger e Widmer 2009). Neste aspecto, os bandeamentos cromossômicos são essenciais para fornecer informações que podem auxiliar estudos taxonômicos, por meio de técnicas como coloração nitrato de prata, CMA/DAPI e FISH, por exemplo.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar citogeneticamente a espécie *H. wrightii* por meio de técnicas de coloração convencional e diferencial a fim de identificar características e/ou marcas citogenéticas que auxiliem nos estudos filogenéticos e taxonômicos da espécie.

Material e Métodos

Pontas de raízes e gemas foram coletadas da população de *Halodule wrightii* em maré de sizígia com o auxílio de snorkel e máscara de mergulho na Baía de Suape, litoral sul de Pernambuco (8°21'24.91"S / 34°57'22.20"O) à profundidade de até 1m. A população se apresenta como uma extensa pradaria descontínua em forma de mosaico com manchas distando entre si em até 10m. O material vegetal foi pré-tratado com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2mM, a 8 °C por 60 minutos, fixado em Carnoy 3:1 etanol/ácido acético glacial (v/v) por 24h e estocado em freezer a -20 °C até a preparação das lâminas.

Coloração convencional

Para a coloração convencional os meristemas foram lavados duas vezes com água destilada por 5 minutos cada, hidrolisados com HCL 5N por 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida esmagados em uma gota de ácido acético 45% sobre a lâmina. As lâminas foram mergulhadas em uma solução com Giemsa 2% por sete minutos e montadas em Entellan Merk (Guerra e Souza 2002).

Preparo de lâminas para bandeamento

O preparo de lâminas foi realizado pela técnica de esmagamento proposto por Guerra e Souza (2002). Para isso, o material foi digerido por 40 minutos em uma solução de celulase (2%) e pectinase (20%) a 37 °C, lavado em água destilada e o meristema esmagado em uma gota de ácido acético 45%. Em seguida, as lâminas foram prensadas e congeladas em nitrogênio líquido para a remoção das lamínulas e depois secas ao ar.

Bandeamento C

O bandeamento C seguiu o protocolo descrito por Schwarzacher, Ambros e Schweizer (1980), com pequenas modificações: as lâminas envelhecidas por três dias foram imersas em ácido acético 45% a 60 °C por 10 min, tratadas com 5% de hidróxido de bário a temperatura ambiente por 10 min., desnaturadas em 2 x SSC a 60 °C por 80 minutos e coradas com Giemsa 3% por 10 minutos.

Coloração com nitrato de prata

A coloração com nitrato de prata a 50% foi realizada segundo Guerra e Souza (2002) na qual as lâminas receberam 50µl da solução e foram cobertas com tela de nylon em câmara úmida a 60 °C por 15 minutos. Após isso, foram lavadas para remoção do excesso de corante de prata, secas ao ar e montada com Entellan Merk.

Coloração com fluorocromos CMA e DAPI

Para a coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamido-2-fenilindol (DAPI) foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros (1994). As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com 10 µl de CMA a 0,5 mg/mL por 60 minutos. Em seguida, foram coradas com 10 µl de DAPI a 2 µg/ml por 30 minutos e, finalmente, lavadas, secas e montadas em tampão McIlvaine-glicerol 1:1 (v/v).

Análise morfométrica

Os cromossomos foram medidos no software MicroMeasure versão 3.3 e analisados os valores da razão entre braço longo e curto (r) e índice centromérico (IC) para determinar a posição do centrômero (Guerra 1988); os índice de Assimetria intracromossômica (A₁) e índice de assimetria intercromossômica (A₂) de Romero Zarco (1986) e TF% (Huziwara, 1962).

Captura, edição de imagens e análise cromossômica

As imagens foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica DM 2500 equipado com câmera digital DFC 345FX. A edição das imagens foi realizada no Paint Shop Pro 5 versão 5.01 e Adobe Photoshop CS3 versão 10.0, ajustando-se apenas brilho e contraste.

Resultados

Os parâmetros morfométricos de *Halodule wrightii* estão sumarizados na tabela 1. O menor cromossomo apresentou tamanho de 1,42 µm e o maior 9,91 µm. O tamanho médio cromossômico foi de 4,33 µm. O índice de assimetria intercromossômica e intracromossômica foi de 0,94 e 0,54, respectivamente e o índice de assimetria de Huziwara foi de 38,26, indicando que a espécie apresenta cariótipo

assimétrico. Observou-se nas células de diferentes indivíduos “pontes” de DNA nuclear, as quais foram associadas ao fenômeno da citomixia (Fig. 1 a-e). Foram observadas também células com números cromossômicos variando entre $2n = 24$ e $2n = 39$ em indivíduos distintos (Fig. 1f-h). Contudo, a população de *H. wrightii* estudada apresentou número cromossômico diplóide $2n = 38$ como o mais frequentemente observado (Fig. 2a). O cariótipo foi considerado assimétrico de acordo com os índices de assimetria e núcleos interfásicos semi-reticulados com presença de alguns cromocentros. Este fenômeno foi relatado em quatro indivíduos com a relação de 35:3 que corresponde a aproximadamente 10% (Tab. 2). Um par cromossômico submetacêntrico pertencente ao grupo dos grandes cromossomos apresentou a região organizadora de nucléolos (RON) no braço curto (Fig. 2a). Este dado foi confirmado através da marcação com nitrato de prata que evidenciou até dois nucléolos formados (Fig. 2c). A técnica bandeamento C revelou uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, porém não correspondente quantitativamente às bandas CMA^+ , observadas. Contudo, houve a coloração por inteiro de um pequeno cromossomo totalmente heterocromático, tratando-se possivelmente de um cromossomo B (Fig. 2b).

O padrão de bandas com fluorocromos em *H. wrightii* foi diversificado apresentando cromossomos com uma banda, com duas bandas sendo uma em cada braço e cromossomos sem bandas. A maioria foi caracterizada como do tipo $CMA^+/DAPI^-$, embora algumas bandas $CMA^+/DAPI^0$ também tenham sido observadas (Fig. 2f-h). Quase todos os cromossomos apresentaram bandas $CMA^+/DAPI^-$ localizadas nas regiões proximais, intersticiais e subterminais. Foram observadas bandas subterminais nos braços curtos de 15 cromossomos e no braço longo de 16 cromossomos. Bandas intersticiais foram encontradas no braço curto e longo de cinco cromossomos. Além disso, o cromossomo considerado B no bandeamento C apresentou alto nível de coloração com o fluorocromo (Fig. 2f-g). Alguns cromossomos apresentaram coloração com CMA^+ disperso ao longo dos braços sem formar bandas (Fig. 3).

Discussão

O número cromossômico obtido neste estudo para *H. wrightii* foi diferente do registrado para a espécie (den Hartog et al. 1979) e para o gênero (Ito e Tanaka 2011; Kuo 2013). Den Hartog et al. (1979) relataram $2n = 44$ para *H. wrightii* e sugeriram que as populações estudadas eram tetraplóides quando compararam o número cromossômico dessa espécie com o encontrado das demais espécies estudadas. Contudo, Ito e Tanaka (2011) relataram o mesmo número cromossômico para *H. pinifolia* ($2n = 44$) e concluíram por meio da análise das cópias do gene *phyB* que todas as espécies de *Halodule* são diplóides, e que a poliploidização não ocorre no gênero. Porém, mediante as variações observadas (Tabela 2) é necessário maior esforço amostral para estabelecer o número cromossômico básico para o gênero, pois mesmo em populações naturais *H. wrightii* apresenta variação entre indivíduos de uma mesma população com elevada riqueza clonal (Travis e Sheridan 2006).

A propagação clonal é uma importante forma de reprodução para as plantas marinhas (Rozenfeld et al. 2007) e esta capacidade de se reproduzir vegetativamente induz somaticamente variação no número de cromossomos, processo que permite origem e perpetuação de novos citótipos (Les e Philbrick 1993), como a ocorrência de citótipos interpopulacionais, mais frequentemente derivados de poliploidização nos gêneros *Ruppia* e *Cymodocea* (Miege 1960; Mason 1967; den Hartog et al. 1987; Talavera et al. 1993; Kuo 2001). Outro fator que pode estar relacionado à variação numérica, relatada no estudo em questão é a ocorrência da citomixia. A citomixia é a transferência de cromatina e outros elementos de uma célula para outra por meio de canais citomíticos que ocorre mais frequentemente nos meiócitos, mas que também pode ocorrer em células somáticas de meristema (Souza e Pagliarini 1997; Guzicka e Wozny 2005). Este fenômeno é importante para a diversificação e evolução cariotípica através de variações numéricas como aneuploidia e poliploidia (Falistocco et al. 1995; Haroun et al. 2004; Lattoo et al. 2006). A citomixia geralmente ocorre em resposta a diversos fatores como alterações fisiológicas, mudança de temperatura e estresse ambiental (Souza e Pagliarini 1997; Haroun et al. 2004). Short et al. (2006) relataram redução da cobertura vegetal na costa brasileira, fato este explicado por Pitanga et al. (2012) que identificaram os principais fatores antrópicos que influenciaram negativamente na abundância e distribuição das pradarias de *H. wrightii*. Na praia de Suape, o prado de *H. wrightii* sofre com pisoteio dos banhistas, ancoragem de embarcações e os efeitos do complexo portuário (observações de campo). Além disso,

Barros, Rocha-Barreira e Magalhães (2013) indicaram que a redução da cobertura vegetal no nordeste do Brasil provavelmente está relacionada às mudanças climáticas.

As análises morfométricas indicam que o conjunto cromossômico de *H. wrightii* é médio e assimétrico. Segundo Stabbins (1971) esse alto índice assimétrico tem valor evolutivo e pode indicar que esta espécie é derivada. Porém, no estudo feito por Koce et al. (2003) os autores correlacionaram os resultados obtidos por meio da análise de citometria de fluxo com dados morfométricos disponíveis na literatura e consideraram a família Cymodoceaceae como primitiva baseando-se nos valores de 2C, comprimento cromossômico e comprimento cromossômico total de *Cymodocea nodosa* Asch. Contudo, os resultados do presente estudo fornecem informações que nos levam a não corroborar com o apontado por Koce et al. (2003) visto que seu estudo considerou apenas dados de uma única espécie. Portanto, faz-se necessário obter informações dos demais gêneros para uma inferência mais concisa.

Até o presente momento os trabalhos citogenéticos empregados no estudo cromossômico de angiospermas marinhas têm se limitado a coloração convencional, de modo que este é o primeiro trabalho utilizando bandeamento cromossômico para angiospermas marinhas. O bandeamento C revelou uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, embora menor do que a apresentada pela coloração com fluorocromos CMA/DAPI, apresentando bandas CMA⁺ em quase todos os cromossomos de *H. wrightii*, o maior número relatado para Classe Alismatidae que variaram de 2-4 bandas CMA⁺ (Costa e Forni-Martins 2004; Costa, Forni-Martins, Vanzela et al. 2006; Feitoza et al. 2010). Regiões coradas por CMA⁺/DAPI⁻ indicam regiões ricas em bases guanina e citosina que, em geral são regiões heterocromáticas que desempenha diversas funções, como estrutural, reguladora de expressão gênica, etc. (Guerra 2000; Dillon 2004; Grewal e Jia 2007).

Halodule wrightii apresenta grande quantidade de heterocromatina evidenciada pela quantidade de bandas CMA⁺ observadas. A quantidade e distribuição variável da heterocromatina observada em *H. wrightii* provavelmente está relacionada a eventos de remodelação da cromatina que, porventura, pode vir a explicar a adaptação da espécie ao ambiente marinho, visto que quantidade/distribuição de bandas pode estar relacionada a rearranjos estruturais (Deumling e Greilhuber 1982; Grewal e Jia 2007).

Nosso estudo indica a ocorrência de cromossomos B baseado na presença de um cromossomo totalmente heterocromático (Jones e Houben, 2003) observado com bandeamento C^+/CMA^+ . Cromossomos B em geral são dispensáveis e podem estar presente ou ausente em indivíduos dentro de uma população; assim como não emparelham ou recombinaem com quaisquer cromossomos do conjunto diplóide (ou poliplóide) durante a meiose, sua herança é irregular e não mendeliana (Jones e Houben, 2003; Jones et al. 2008). Mesmo não sendo essenciais e considerados anteriormente sem função (Guerra, 1988), os cromossomos B interagem com os cromossomos A, e podem desempenhar um papel importante na evolução do genoma e serem úteis para o estudo de processos evolutivos moleculares (Camacho et al. 2000). Frequentemente sua presença gera polimorfismos em populações naturais, podendo ser mantidos e transmitidos caso pareiem-se entre si mesmo causando danos fenotípicos a planta (Jones e Houben, 2003; Jones et al 2008; Jones, Viegas e Houben 2008).

Os estudos citogenéticos em angiospermas marinhas ainda são incipientes. Os principais trabalhos descrevem em sua maioria apenas números cromossômicos. Para Kuo (2013) a dificuldade na obtenção de metáfases com espalhamento adequado foi a principal dificuldade encontrada.

No presente estudo as variações numéricas foram relacionadas a citomixia onde se observou pontes entre núcleos de células diferentes. A ocorrência de cromossomos B é outro fator promotor de diversificação no número cromossômico. Alguns estudos de populações indicam que há maior diversidade genética intrapopulacional do que interpopulacional (Angel, 2002; Waycott e Barnes, 2001). Considerando a elevada diversidade genética intrapopulacional numa população com a predominância da reprodução vegetativa, conclui-se que os mecanismos de diversificação cariotípica atuam em resposta as pressões ambientais que no caso da população estudada é de origem antropica.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo do primeiro autor, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e ao Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Referências

- Angel, R (2002) Genetic diversity of *Halodule wrightii* using random amplified polymorphic DNA, **Aquat Bot**, 74: 165-174.
- Baltisberger, M, Widmer, A (2009) Chromosome numbers and karyotypes within the *Ranunculus alpestris*-group (Ranunculaceae). **Organisms, Diversity & Evolution**. 9: 232-243.
- Barros, KVS, Rocha-Barreira, CA, Magalhães, KM (2013) Ecology of Brazilian seagrasses: Is our current knowledge sufficient to make sound decisions about mitigating the effects of climate change? **Iheringia** 68(1): 163-178.
- Bujang, JS, Nazri, NA, Zakaria, MH, Ogawa, H (2008) Morphological plasticity of *Halodule* species in response to different environments. **Mar. Res. Indonesia** 33(1): 11-16.
- Camacho, JPM, Sharbel, TF, Beukeboom, LW (2000) B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 355: 163-178.
- Costa, JY, Forni-Martins, ER (2004) A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus*. **Aquat Bot**, 79: 325–332.
- Costa, JY, Forni-Martins, ER, Vanzela, ALL (2006) Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismataceae) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH. **Plant Syst Evol** 257(1-2): 119-127.
- den Hartog, C. (1972) The sea-grasses of Brazil. **Acta Bot. Neerl**, 21(5): 512-516.
- den Hartog, C.; van Loenhoud, PJ, Roelofs, JGM, van de Sande, JCPM (1979) Chromosome numbers of three seagrasses from the Netherlands Antilles. **Aquat Bot** 7: 267-271.
- den Hartog, C.; Hennen, J.; Noten, T. M. P. A.; van Wijk, R. J. (1987) Chromosome numbers of the European seagrasses. **Plant Syst Evol**, v. 156, p. 55-59.
- Deumling, B, Greilhuber, J (1982) Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. **Chromosoma** 84: 535-555.

- Dillon, N (2004) Heterochromatin structure and function. **Biology of the Cell**, 96: 631–637.
- Falisticco, E, Tosti, N, Falcinelli, M (1995) Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of origins of 2n gametes. **Journal of Heredity**, 86: 448-453.
- Feitoza, LL, Martins, MIG, Castro, AAJF, Félix, LP, Carvalho, R (2010) Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. **Plant Syst Evol**, 286: 199-208.
- Grewal, SIS, Jia, S (2007) Heterochromatin revisited. **Nat. Rev. Genet.** 8: 35-46.
- Guerra, M (1988) **Introdução à citogenética geral**. Guanabara, Rio de Janeiro, 142p.
- Guerra, M. (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genet. Mol. Biol**, 23(4): 1029-1041.
- Guerra, M, Souza, MJ (2002) **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. 131p.
- Guerra, M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenet Genome Res** 120:339–350.
- Guzicka, M, Wozny A (2005) Cytomixis in shoot apex of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. **Trees**, 18(6): 722-724.
- Haroun, SA, Shehri, AMAI, Wadie HMAI (2004) Cytomixis in the Microsporogenesis of *Vicia faba* L. (Fabaceae). **Cytologia** 69(1): 7–11. 2004.
- Huziwara, Y (1962) Karyotype in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of Aster. **Am. J. Bot** 49:116-119.
- Ito, Y, Tanaka, N (2011) Hybridisation in a tropical seagrass genus *Halodule* (Cymodoceaceae), inferred from plastid and nuclear DNA phylogenies. **Telopea**, 13: 219-231.
- Jones N, Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **TRENDS in Plant Science** 8(9):417-423.

- Jones, R N, Viegas W, Houben A (2008) A century of B chromosomes in plants: so what? **Annals of Botany** 101:767-775.
- Jones R N, González-Sánchez M, González-García, Vega J M, Puertas M J (2008) Chromosomes with a life of their own. **Cytogenet Genome Res** 120:265–280.
- Koce, JD, Vilhar, B, Bohanec, B, Bermastia, M (2003) Genome size of Adriatic seagrasses. **Aquat Bot** 77: 17–25.
- Kuo, J. (2001) Chromosome numbers of the Australian Zosteraceae. **Plant Syst. Evol** 226: 155-163.
- Kuo, J (2013) Chromosome numbers of the Australian Cymococaceae. **Plant Systematics and Evolution** 299:1443-1448.
- Lattoo, SK, Khan, S, Bamotra, S, Dhar, AK (2006) Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications. **J. Biosci.** 31(5): 629–637.
- Les, DH, Philbrick, CT (1993) Studies of hybridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms: evolutionary implications. **Aquat Bot** 44: 181-228.
- McMillan, C, Phillips RC (1979) *Halodule wrightii* Aschers. in the sea of Cortez, Mexico. **Aquat Bot** 6: 393-396.
- Miege, J (1960) Nombres chromosomiques de plantes d'Afrique Occidentale. **Cytol. et Veg** 21: 373-384.
- Mason, R (1967) The species of *Ruppia* in New Zealand, **New Zealand Journal of Botany**, 5:4, 519-531. doi: 10.1080/0028825X.1967.10428771
- Oliveira, EC, Pirani, JR, Giulietti, AM (1983) The Brazilian seagrasses. **Aquat Bot** 16: 251-267.
- Phillips, RC (1960) Environmental effect on leaves of *Diplanthera* du petit-thouars. **Bulletin of marine Science of the Gulf and Caribbean.** 40: 346-353.

- Phillips, RC (1967) On species of the seagrass, *Halodule* in Florida. **Bulletin of Marine Science** 17(3): 673-676.
- Phillips, RC, Mcmillan, C, Bittaker, HF, Heiser, R (1974) *Halodule wrightii* Asch. in the Gulf of Mexico. **Contributions in Marine Science** 18: 257-261.
- Pitanga, ME, Montes, MJF, Magalhães, KM, Reis, TNV (2012) Quantification and classification of the main environmental impacts on a *Halodule wrightii* seagrass meadow on a tropical island in northeastern Brazil. **An Acad Bras Cienc**, 84(1): 35-42.
- Romero Zarco, C (1986) A new method for estimating karyotype asymmetry. **Taxon** 35(5): 526-530.
- Rozenfeld, AF, Arnaud-Haond, S, Hernández-Garcá, E, Eguíluz, VM, Matías, MA, Serrão, E, Duarte, CM (2007) Spectrum of genetic diversity and networks of clonal organisms. **J. R. Soc. Interface** 4: 1093–1102.
- Schwarzacher, T, Ambros, P, Schweizer, D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematic and Evolution**. 134(3): 293-297.
- Schweizer, D, Ambros, PF (1994) Chromosome banding: stain combinations for specific regions. In: GOSDEN, J. R. (Ed.). **Methods in molecular biology: Chromosome analysis protocols**. 29: 97-112. Humana Press. 508p.
- Short, FT, Koch, EW, Creed, JC, Magalhães, KM, Fernandez, E, Gaeckle, JL (2006) SeagrassNet monitoring across the Americas: case studies of seagrass decline. **Marine Ecology** 27: 277–289.
- Souza, AM, Pagliarini, MS (1997) Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (Brassicaceae). **Cytologia**, 62: 25-29.
- Stebbins, G. L. (1971) **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. Edward Arnold: London. 216p.
- Talavera, S, Garcia-Murillo, P, Herrera, J (1993) Chromosome numbers and a new model for karyotype evolution in *Ruppia* L. (Ruppiaceae). **Aquat Bot** 45: 1-13.

- Travis, SE, Sheridan, P (2006) Genetic structure of natural and restored shoalgrass *Halodule wrightii* populations in the NW Gulf of Mexico. **Mar Ecol Prog Ser** 322: 117–127.
- Waycott, M, Barnes, PAG (2001) AFLP diversity within and between populations of the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae), **Mar. Biology**, 139: 1021-1028.

APÊNDICE

Tabela 1: Análise morfométrica dos cromossomos de *Halodule wrightii* referente a indivíduos com 2n=38 cromossomos com indicação para braço longo (BL); braço curto (BC); Comprimento Total Cromossômico (CTC); relação entre braço longo e curto (r); índice centromérico (IC); posição do centrômero (PC); índice de Assimetria intracromossômica (A₁); índice de assimetria intercromossômica (A₂) e Índice de assimetria de Huziwarra (1962) TF%.

Nr. Crom.	BL (µm)	BC (µm)	CT (µm)	r	IC%	PC	A1	A2	TF%
1	5,48±1,23	4,70±0,89	9,91±2,21	1,17	46,16	m	0,94	0,52	38,26
2	5,13±1,12	3,98±1,04	9,01±1,93	1,29	43,70	m			
3	5,04±0,77	3,36±0,74	8,22±1,22	1,50	39,99	sm			
4	5,52±1,13	2,63±1,11	7,92±1,42	2,10	32,29	sm			
5	4,64±1,44	2,75±0,73	7,10±1,61	1,69	37,24	sm			
6	4,63±0,70	1,89±0,62	6,30±0,77	2,44	29,03	sm			
7	3,87±0,57	2,44±0,43	6,11±0,64	1,59	38,67	sm			
8	4,22±0,75	1,89±0,67	5,96±0,69	2,24	30,88	sm			
9	4,07±0,88	1,85±0,68	5,76±0,69	2,20	31,21	sm			
11	3,42±0,57	2,06±0,51	5,36±0,59	1,66	37,58	sm			
10	3,50±0,32	2,23±0,56	5,57±0,60	1,57	38,91	sm			
13	3,13±0,31	2,03±0,51	5,06±0,50	1,54	39,35	sm			
12	3,07±0,42	2,19±0,40	5,20±0,59	1,40	41,62	m			
14	3,12±0,43	1,83±0,42	4,87±0,42	1,70	37,03	sm			
18	2,48±0,38	1,71±0,47	4,04±0,10	1,45	40,82	m			
19	2,26±0,30	1,70±0,27	3,77±0,25	1,33	42,90	m			
20	2,32±0,37	1,52±0,26	3,63±0,19	1,53	39,54	sm			
21	2,18±0,32	1,44±0,41	3,47±0,23	1,51	39,77	sm			
22	2,28±0,32	1,09±0,31	3,33±0,28	2,09	32,40	sm			
17	2,64±0,31	1,65±0,24	4,17±0,19	1,60	38,52	sm			
15	2,89±0,51	1,79±0,28	4,65±0,48	1,61	38,25	sm			
16	2,76±0,30	1,80±0,34	4,51±0,37	1,53	39,54	sm			
24	2,00±0,20	0,98±0,20	2,90±0,27	2,03	32,96	sm			
26	1,77±0,33	0,99±0,14	2,69±0,24	1,78	35,92	sm			
27	1,71±0,13	0,95±0,18	2,57±0,21	1,81	35,63	sm			
28	1,53±0,32	0,91±0,16	2,30±0,18	1,69	37,20	sm			
25	1,74±0,28	1,16±0,24	2,83±0,27	1,49	40,16	m			
23	1,89±0,22	1,31±0,13	3,15±0,15	1,45	40,89	m			
29	1,43±0,18	0,94±0,17	2,27±0,16	1,52	39,70	sm			
33	1,31±0,27	0,84±0,24	2,07±0,07	1,56	39,09	sm			
34	1,35±0,25	0,76±0,17	2,04±0,06	1,78	35,93	sm			
37	1,12±0,30	0,67±0,15	1,71±0,07	1,67	37,47	sm			
30	1,46±0,14	0,83±0,18	2,21±0,14	1,76	36,29	sm			
31	1,42±0,14	0,80±0,27	2,13±0,14	1,76	36,19	sm			
32	1,26±0,26	0,92±0,10	2,10±0,10	1,37	42,17	m			
36	1,08±0,20	0,80±0,26	1,79±0,06	1,36	42,37	m			
35	1,08±0,18	0,90±0,06	1,89±0,08	1,20	45,47	m			
38	0,86±0,26	0,70±0,11	1,42±0,24	1,24	44,72	m			
Média	2,67	1,66	4,33	1,64	38,36	sm			
DP	1,37	0,92	2,24	0,29	4,02				

Tabela 2: Indivíduos da população de *Halodule wrightii* da Baía de Suape que apresentaram células com citomixia. Foram analisados três campos na objetiva de 100x e contadas todas as células de cada campo para obtenção de média e desvio padrão (DP).

	Cél. Normais	Cél. Citomixia
	5	2
Indivíduo 1	114	13
	48	4
	5	2
Indivíduo 2	38	2
	32	2
	5	2
Indivíduo 3	94	3
	14	3
	9	2
Indivíduo 4	12	2
	48	4
Média	35	3
DP	15,03	1,97

Tabela 3: Números cromossômicos para espécies do gênero *Halodule* descrito previamente na literatura.

Espécie	2n	Local	Referência
<i>Halodule</i> híbrido	44	Okinawa, Japan	Ito e Tanaka (2011)
<i>H. pinifolia</i>	44	Okinawa, Japan	Ito e Tanaka (2011)
<i>H. pinifolia</i>	32	Cairns, Queensland	Kuo (2013)
<i>Halodule</i> sp.	44	Ishigaki, Japan	Uchiyama (1993)*
<i>H. tridentata</i> (sinônimo de <i>H. uninervis</i>)	16	Denham, W Austrália	Kuo (2013)
<i>H. uninervis</i>	32	Denham, W Austrália	Kuo (2013)
<i>H. wrightii</i>	44	Curaçao, Antilhas Holandesas	den Hartog <i>et al.</i> (1979)
<i>H. wrightii</i>	38	Cabo Sto. Agostinho, Brasil	Presente estudo

*Citação de Kuo (2013)

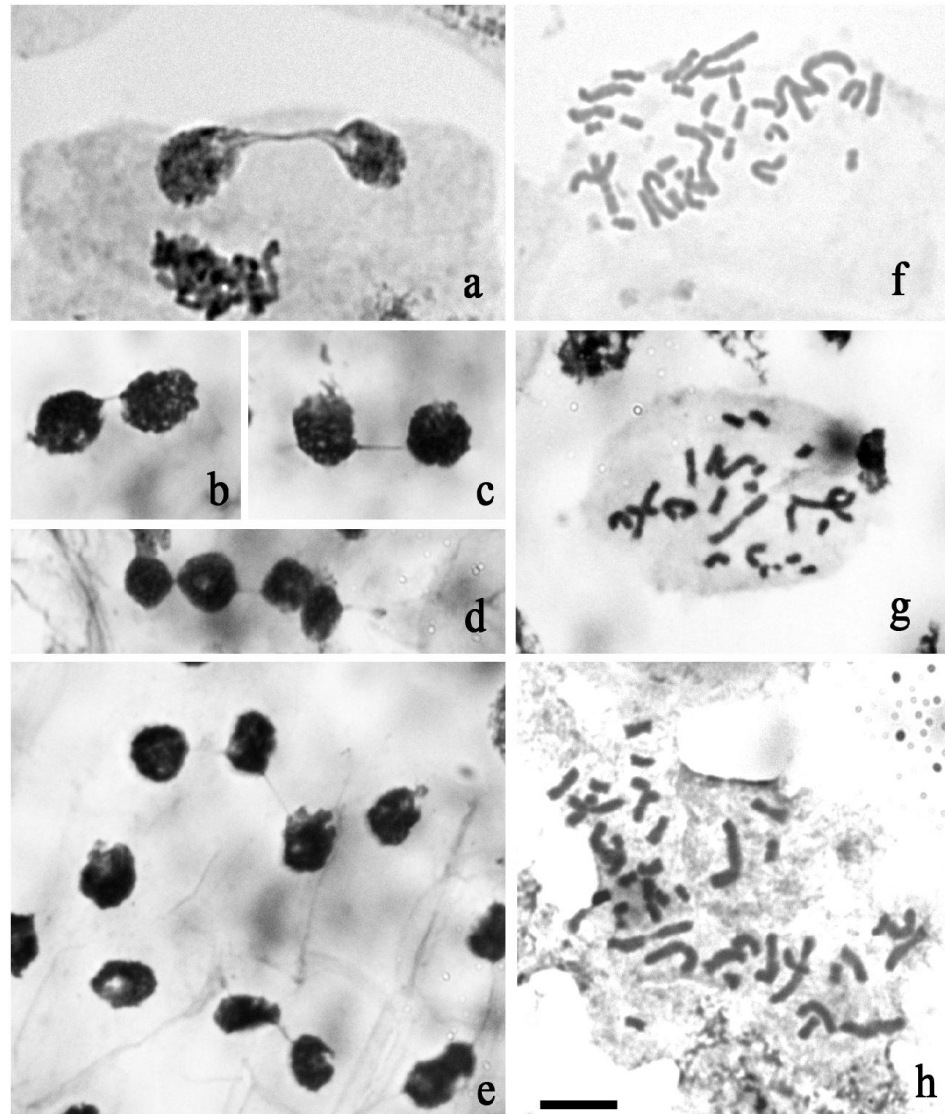


Figura 1. Citomixia (a-e) e variação numérica em células metafásicas de *H. wrightii* com $2n = 24$ (f), $2n = 34$ (g) e $2n = 39$ (h).

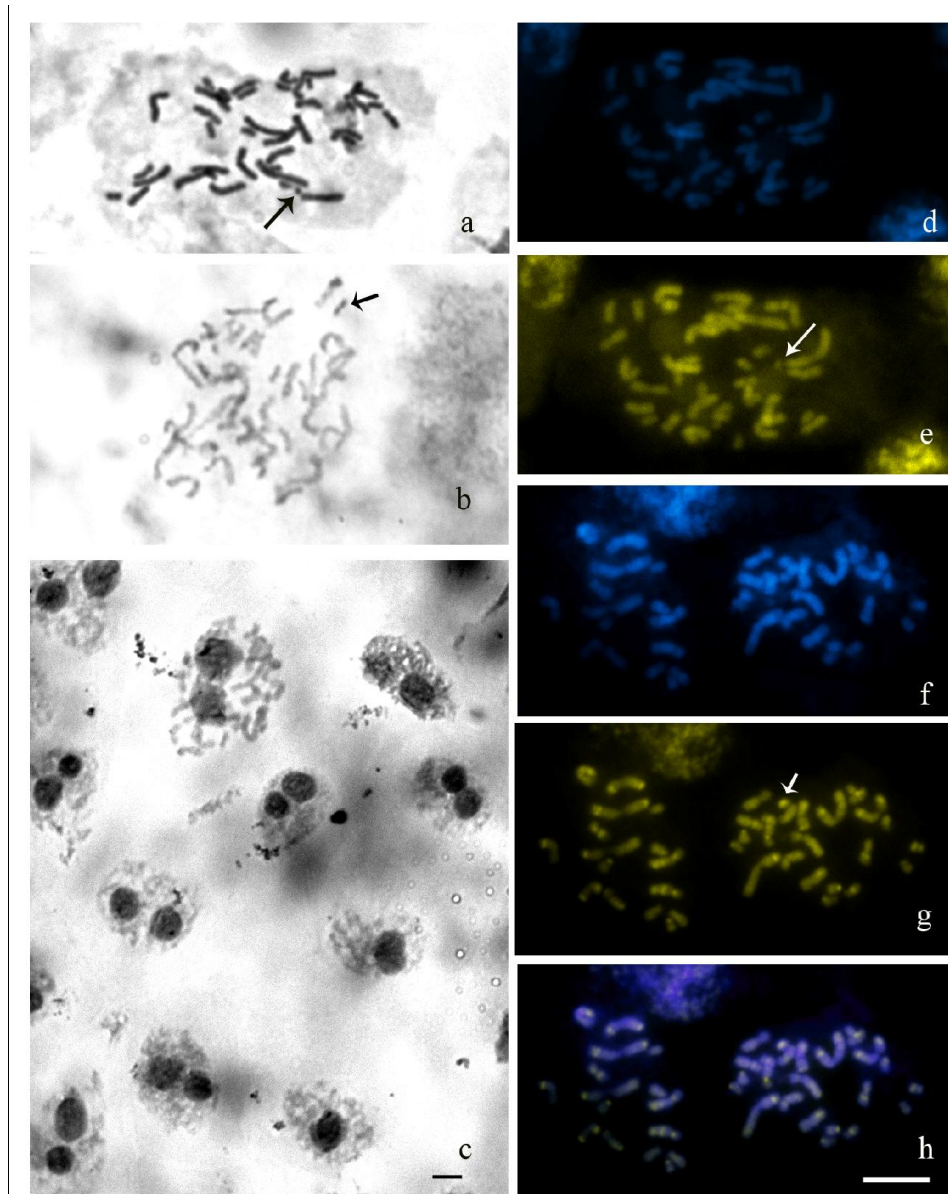


Figura 2. Coloração convencional com Giemsa, nitrato de prata e CMA/DAPI de *H. wrightii*. a) coloração convencional com Giemsa; b) banda C-Giemsa, seta indica cromossomo B; c) nitrato de prata; d) DAPI; e) CMA, seta indica RON; f-h) DAPI, CMA e sobreposição, respectivamente. Setas indica cromossomo B. Barra = 10 μ m.

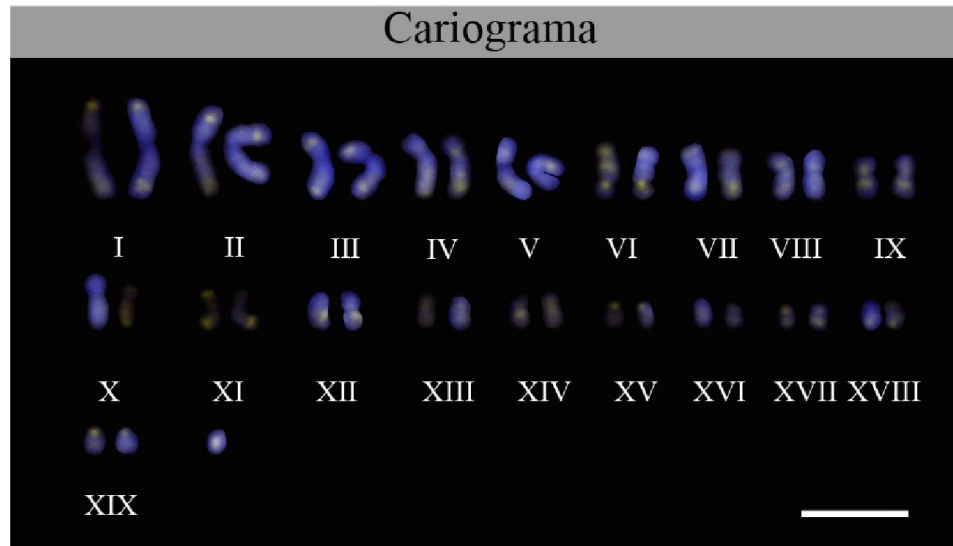


Figura 3. Cariograma preliminar de *H. wrightii* ($2n = 38+1B$) apresentando o padrão de bandas heterocromáticas e cromossomo B. Barra $10\mu\text{m}$.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA AUTORES

REVISTA

Plant Systematics and Evolution

Editors-in-Chief: M. Koch; M.A. Lysak; K. Marhold

ISSN: 0378-2697 (print version)

ISSN: 2199-6881 (electronic version) Springer Wien

Journal no. 606

**Plant Systematics
and Evolution**
Printed in Austria

Manuscripts Submission

Manuscripts should be submitted to: <http://www.editorialmanager.com/plsy> The online manuscript submission and review system for the journal offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript. NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "Contact us" from the tool bar.

General

Only papers written in English will be considered. Maximum length is twenty printed pages including tables and figures. Papers submitted should only comprise new and important results. They must be written in concise form and in clear, grammatical language. Papers sent to the authors for revision should be returned within two months; otherwise they will be treated as new submissions. It is essential that manuscripts be submitted in their final form ready for printing, with the approximate desired position of all figures and tables marked in the margins. To facilitate communication between authors, editors and publisher, the telephone and fax numbers and/or e-mail address of the corresponding author should be provided in the accompanying letter. The full names and addresses of the authors must also be included at the end of the manuscript.

Text

The title should be brief and characterise the main contents of the paper. An eventual series title has to be given as footnote.

Abstract. All papers should be preceded by an abstract (150 words in maximum) denoting the most important taxa, problems and results treated in the paper.

Key words. A list of up to 8 key words, including the complete botanical name and common name (if any) of the plant material, must be supplied. Other key words should include the topic investigated and any special techniques used. A running title (up to 75 characters) should be suggested by the author(s). Headings. Main headings (Introduction, Materials and methods, etc.) should be placed on separate lines. Small print. Footnotes, Materials and methods sections, Acknowledgements, References, Tables, and figure legends should be marked for small print. Scientific names. Italics should be used for names at generic and lower taxonomic rank, but not for names at higher ranks. Units and symbols. Temperatures may be expressed in degrees Celsius, time in seconds (s), minutes (min), hours (h), days (d). Otherwise, the International System of Units (SI) should be used. Standard chemical symbols and abbreviations for chemical names may be used if they are concise and widely accepted, see *Eur J Biochem* (1993) 213: 1-3. Gene symbols must be written in lower case italics. Protein symbols designated on the basis of gene names are written with first or all letters capitalized and in roman type.

Footnotes to the text should be numbered consecutively. Literature citations in the text should be by author(s) and year. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

Example: ... has been investigated by Sorensson (1993) and Sorensson and Brewbaker (1994) ... Yang et al. (1992) have shown. The list of references should include only publications cited in the text. They should be in alphabetical order by name of the first author with all authors and the complete title of each work cited. Citation must obey the same rules as for the main text. The second and subsequent lines are indented.

Examples are:

- a) Articles from journals and other serial publications: Knapp S., Persson V., Blackmore S. (1998) Pollen morphology and functional dioecy in *Solanum* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 210: 113–139.
- b) Articles from non-serial collective publications (symposia volumes, encyclopedias, etc.) and books: Verma D. P. S., Nadler K. (1984) Legume-Rhizobium symbiosis: host's point of view. In: Verma D. P. S., Hohn T. (eds.) *Genes involved in microbe-plant interactions*. Springer, Wien New York, pp. 57–93 (Plant gene research).

For standardization of formats, authors are requested to adhere to the following: in Literature Cited, use of abbreviations of journals contained in B-P-H (G. H. M. Lawrence, A. F. G. Buchheim, G. S. Daniels and H. Dolezal, eds., 1968, *Botanico-Periodicum-Huntianum*, Hunt Botanical Library, Pittsburgh), including Supplementum; (G. D. R. Bridson and E. R. Smith, eds., 1991, B-P-H/S, Hunt Institute for Botanical Documentation, Pittsburgh); in taxonomic treatments, use of book abbreviations from TL-II (F. A. Stafleu and R. S. Cowan, 1976–1988, *Taxonomic Literature*, ed. 2, vols. 1–7, Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht; plus Supplements); throughout the text, use of taxonomic author abbreviations from *Authors of Plant Names* (R. K. Brummitt and C. E. Powell, eds., 1992, Royal Botanic Gardens, Kew).

It is recommended that the work be divided into Introduction (without heading), Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (without heading) and References. Details must be given about origin and determination of each organism studied. Scientific (Latin) names should conform to the international rules of nomenclature. Authors of species and infraspecific taxa investigated must be given either when first mentioned in text or included all in one of the tables. In principal, voucher specimens are to be deposited in a large public herbarium quoted using the abbreviation given in the "Index Herbariorum".

Data matrices including sequence alignments must be made available to the public. There must be a sentence included in the Materials and methods section that such information is available from the corresponding author. "DNA or protein sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor."

Tables

Tables should be numbered consecutively with arabic numbers. Footnotes to tables should be indicated by lower case superscript letters, beginning with a in each table.

Illustrations

The number of illustrations should be kept at the minimum needed to clarify the text. Double documentation of the same points in figures and tables is not acceptable.

All figures should be numbered consecutively. Halftone illustrations should be submitted as sharp, glossy, high quality photographic prints. Line drawings should be supplied as black-and-white drawings suitable for reproduction. Figures that are to appear together should be either photographed as a group or mounted together on flexible white drawing paper (0.4 mm thick, about 300 g/m²). All figures should be trimmed at right angles and be of a size permitting direct printing: no more than 7.6 cm across for column width, no more than 15.9 cm for page width, no higher than 22.7 cm. (The publisher reserves the right to reduce illustrations.)

Illustrations can be published in colour only if authors agree to bear some of the extra costs for reproduction and printing.

In line drawings all lines should be of uniform thickness; letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions (approx. 2 mm high after reduction). Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings. Photographs should exhibit high contrast. Arrows, letters and numbers should be inserted with template rub-on letters. Illustrations showing organisms or their details should have an internal scale with the dimensions stated in the legend.

Legends should be typed on a separate sheet. Each legend should be explanatory and meaningful without reference to the text.

Open Choice Publication

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a

subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular 'subscription-based' article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular subscriptionmodel articles. We regret that Springer

Open Choice cannot be ordered for published articles.

www.springeronline.com/openchoice

Proofs, Offprints

For all papers page proofs will be sent as PDF files to the authors. Misprints only should be corrected, and no changes of contents or style should be made on the page proofs. Costs caused by changes or revisions in the page proofs – other than those resulting from printer's errors – exceeding 10 per cent of the typesetting costs will be charged to the author. Springer will supply the corresponding author with one PDF-file of each paper free of charge for your own personal use. Additional offprints may be ordered at cost price. A price list and an order form will be sent with the proofs. The filled – in order form should accompany the corrected proofs when they are returned.

Online First Publication

Online First articles are published in electronic form weeks before distribution of the printed journal. An Online first publication date is published in each Online First article and its print version. Authors should be aware that after electronic publication they cannot withdraw an article or change its content. Any corrections have to be made in an Erratum which will be hyperlinked to the article. Online First articles can be cited using their Digital Object Identifier, a unique and consistent identification code included in both the print and the electronic versions.

Communication

All business communications and all correspondence concerning technical details, financial items, and offprints should be addressed directly to

SpringerWienNewYork

Production Department

Sachsenplatz 4-6

P.O. Box 89

1201 Wien

Austria