

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS E DA MADEIRA

ANDREI CAÍQUE PIRES NUNES

CARIÓTIPO, CONTEÚDO DE DNA E COMPOSIÇÃO DE BASES
(AT E GC) DE *Pitcairnia flammaea* (L. B. Smith) L. B. Smith
(BROMELIACEAE)

JERÔNIMO MONTEIRO
ESPÍRITO SANTO

2013

ANDREI CAÍQUE PIRES NUNES

CARIÓTIPO, CONTEÚDO DE DNA E COMPOSIÇÃO DE BASES
(AT E GC) DE *Pitcairnia flammea* (L. B. Smith) L. B. Smith
(BROMELIACEAE)

Monografia apresentada ao
Departamento de Ciências
Florestais e da Madeira da
Universidade Federal do Espírito
Santo, como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro
Florestal.

JERÔNIMO MONTEIRO

ESPÍRITO SANTO

2013

ANDREI CAÍQUE PIRES NUNES

CARIÓTIPO, CONTEÚDO DE DNA E COMPOSIÇÃO DE BASES (AT E GC)
DE *Pitcairnia flammea* (L. B. Smith) L. B. Smith (BROMELIACEAE) CARIÓTIPO,

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Aprovada em 09 de Agosto de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo

DBIO/CCA – UFES

Orientador



Profa. Dra. Milene Miranda Praça-Fontes

DBIO/CCA – UFES

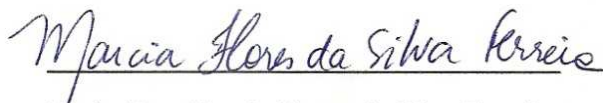
Examinador



Profa. Dra. Tatiana Tavares Carrijo

DBIO/CCA – UFES

Examinador



Profa. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira

DBIO/CCA – UFES

Examinador

*“Descobrir consiste em olhar
para o que todo mundo está vendo
e pensar uma coisa diferente.”*

- Roger Von Oech

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realização do curso e formação profissional.

Ao CNPq e a FAPES, pelo apoio financeiro fundamental para realização deste trabalho.

Ao professor Wellington Ronildo Clarindo pela amizade e credibilidade a mim depositada em todos os momentos, pela orientação, parceria, paciência, ensinamentos e incentivo a sempre buscar a excelência em tudo que fosse feito, contribuindo, de forma singular, para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

À professora Andrea Passos Lima, pelo fornecimento das sementes de *Pitcairnia flammea* para realização do presente estudo.

As professoras Milene Miranda Praça-Fontes, Tatiana Tavares Carrijo e Marcia Flores da Silva Ferreira por participarem da banca examinadora, contribuindo com sugestões essenciais ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de citogenética e cultura de tecidos vegetais Anelise, Letícia, Samara, Stéfanie, Geovana, Renata, Thais, Ariane, Darley, Lucas e Victor, pela agradável convivência, pelos momentos de descontração e auxílio nos momentos difíceis.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e buscarem, de todas as formas, me proporcionar a melhor educação e formação como cidadão, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo exemplo de vida, que sempre foi sinônimo de caráter reto e de luta. Ao meu irmão pelo apoio incondicional, pelos momentos de diversão e aprendizado, sem o qual eu não teria chegado até aqui.

A minha namorada e companheira Mariana, por me tornar uma pessoa mais feliz e radiante a cada dia, estando sempre ao meu lado em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A família Bromeliaceae, com 58 gêneros e 3140 espécies, tem sido representada, tradicionalmente, por três subfamílias; Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae. Apesar das bromeliáceas serem estudadas sob diversos aspectos botânicos, ecológicos e evolutivos, análises de citometria de fluxo e citogenética são extremamente escassas no grupo. O elevado número cromossômico ($2n = 50, 100$ e 150), a morfologia similar e o tamanho relativamente pequeno dos cromossomos, são fatores que tem impossibilitado a montagem do cariógrama de uma espécie de Bromeliaceae até o momento. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivos estimar o conteúdo de DNA nuclear e a proporção de bases (AT% e GC%) de *Pitcairnia flammea* (L. B. Smith) L. B. Smith., caracterizar morfometricamente seus cromossomos metafásicos e estabelecer o cariógrama dessa espécie. Suspensões nucleares do padrão (*Solanum lycopersicum* Linnaeus 'Stupické') e da amostra (*P. flammea*) foram obtidas e analisadas em citômetro de fluxo para determinação do valor $2C$ nuclear e proporção de bases AT% e GC%. O procedimento de citometria de fluxo foi adequado, gerando histogramas com picos de fluorescência em G_0/G_1 apresentando coeficientes de variação abaixo de 5%. A partir da análise desses histogramas, o valor $2C$ nuclear de *P. flammea* foi estimado em $2C = 1,440$ pg, a proporção de bases AT = 64,28% e GC = 35,72%. Com o propósito de caracterizar o cariótipo, raízes de *P. flammea* foram tratadas com antitubulícos, fixadas, armazenadas e submetidas ao processo de preparação de lâminas, as metáfases foram visualizadas em microscópio de luz e capturadas posteriormente. A metodologia citogenética aplicada proveu cromossomos com constrições primárias bem definidas, sem sobreposições, deformações da cromatina ou fragmentos citoplasmáticos. Esse resultado foi considerado primordial para realização das análises morfométricas, o pareamento dos cromossomos homólogos e elaboração do primeiro cariógrama de uma Bromeliaceae. O cariótipo dispôs de $2n = 50$ cromossomos, sendo todos submetacêntricos com tamanho total variando de 1,65 (cromossomo 1) a 0,60 μm (cromossomos 24–25). As análises cariomorfológicas revelaram grupos de cromossomos citogeneticamente idênticos (2–3, 4–5, 6–9, 10–17, 18–19, 20–23 e 24–25), e um cromossomo (1)

morfometricamente diferente de todos os outros. Esse dado sugere que o genoma de *P. flammaea* apresenta uma origem alopoliploide e que o número básico da família Bromeliaceae não é $x = 25$ cromossomos. No presente trabalho, a metodologia citogenética possibilitou, pela primeira vez na literatura, o estabelecimento do kariograma de uma Bromeliaceae. Cromossomos de *P. flammaea* foram caracterizados morfometricamente, e o conteúdo de DNA, assim como a composição de bases, foram determinados para esta espécie. Além disso, constatou-se que, assim como o tamanho dos seus cromossomos, o genoma dessa espécie é relativamente pequeno se comparado com a maioria das Angiospermas. Dessa forma, foi possível ampliar as informações acerca da evolução do genoma das bromeliáceas e do número cromossômico básico do grupo, revelando citogeneticamente, evidências de um processo de poliploidização na família.

Palavras-chave: Evolução do genoma, *P. flammaea*, Citogenética; Tamanho do genoma nuclear.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo.....	3
1.1.1. Objetivo geral.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Citometria de fluxo em Bromeliaceae.....	3
2.2. Citogenética na família Bromeliaceae.....	11
3 METODOLOGIA.....	21
3.1. Material vegetal.....	21
3.2 Citometria de fluxo.....	21
3.2. Citogenética.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Citometria de fluxo.....	23
4.2. Citogenética.....	28
5 CONCLUSÕES.....	33
6 REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de conteúdo de DNA nuclear reportados na literatura, referentes a 2,3% de todas as espécies da família Bromeliaceae.....	5
Tabela 2 – Número cromossômico 2n reportados na literatura referentes a diferentes espécies de Bromeliaceae.....	15
Tabela 3 - Valores de conteúdo de DNA nuclear referentes às espécies do gênero <i>Pitcairnia</i>	27
Tabela 4 – Caracterização morfométrica dos cromossomos de <i>P. flammea</i>	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema representativo do processo evolutivo que culminou no número básico $x = 25$ cromossomos da família Bromeliaceae. Primeiramente, uma hibridação entre espécies paleo-diploides com $x = 9$ (1) e 8 (2), com duplicação cromossômica gerando um paleo-alotetraploide com $x = 17$ (3). Posteriormente, uma hibridação entre o paleo-alotetraploide (3) e o paleo-diploide (2), com $x = 8$, poderia ter resultado em um alo-hexaploide com $x = 25$ (4).....12
- Figura 2 – Histogramas apresentando os picos referentes aos núcleos G_0/G_1 , com coeficiente de variação menor que 5%, obtidos por meio das suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo (a) e DAPI (b). (a) O pico posicionado no canal 200 refere-se aos núcleos G_0/G_1 de *P. flammea* e no canal 277,8 ao padrão interno *S. lycopersicum*. (b) O pico posicionado no canal 168 refere-se aos núcleos em G_0/G_1 de *P. flammea*, e no canal 300 ao padrão interno *S. lycopersicum*.....25
- Figura 3 – Preparações citogenéticas de *P. flammea* com cromossomos em diferentes níveis de compactação da cromatina. (a) Prófase. (b) Prometáfase inicial (c) Cromossomos profásicos e prometafásicos sobrepostos. (d) Prófase evidenciando o elevado número e tamanho relativamente pequeno dos cromossomos de *P. flammea*.....29
- Figura 4 – Dois kariogramas de *P. flammea* distintos com relação ao nível de compactação da cromatina dos cromossomos (a) Cariograma composto por cromossomos com grau máximo de compactação da cromatina, dispendo de $2n = 50$ cromossomos, sendo todos submetacêntricos. As análises morfométricas evidenciaram um cromossomo (1) distinto morfometricamente dos demais e grupos e pares de cromossomos citogeneticamente idênticos (2–3, 4–5, 6–9, 10–17, 18–19, 20–23 e 24–25) em relação ao tamanho total, dos braços curto e longo e classe. Os cromossomos metafásicos exibiram tamanho total variando de 1,65 (cromossomo 1) a 0,60 μm (cromossomos 24–25). (b) Cariograma composto por cromossomos metafásicos em estágio inicial de compactação da cromatina, dispendo de $2n = 50$ cromossomos. Barra 5 μm31

1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae pertence à ordem Poales (APG III, 2009) e compreende cerca de 58 gêneros e 3.140 espécies distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais do continente americano (GIVNISH et al., 2011). Aproximadamente, 50% dessas espécies são encontradas no Brasil, ocorrendo na Caatinga, Campos Rupestres, regiões semi-áridas, Escudo das Guianas e predominantemente na Mata Atlântica (CEITA et al., 2008; FAVORETO et al., 2012). Dessa forma, este país é considerado um dos mais importantes núcleos de biodiversidade da família (LOUZADA et al., 2010).

Economicamente, as bromélias têm sido utilizadas na ornamentação, produção de fibras e na medicina natural com o uso da enzima proteolítica bromelina. Esta enzima está presente na espécie *Ananas comosus* (Linnaeus) Merrill, a qual é também, uma espécie amplamente utilizada na agricultura como fonte de frutos (BARFUSS et al., 2005; VERSIEUX, 2009). Além dos aspectos econômicos, as bromeliáceas assumem importante papel nas interações ecológicas dos ambientes onde ocorrem, fornecendo néctar concentrado e volumoso para beija-flores e proporcionando micro-habitats para outras espécies vegetais e animais, sendo consideradas assim, amplificadoras da biodiversidade (VERSIEUX, 2009; FAVORETO et al., 2012).

As bromeliáceas têm sido tradicionalmente distribuídas em três subfamílias: Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae. Entretanto, Givnish et al. (2007) propuseram uma nova divisão para a família Bromeliaceae, subdividindo-a em oito novas subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae. Se por um lado a sistemática da família não levanta dúvidas, por outro, as delimitações referidas para esses grupos não são satisfatórias. Dessa forma, há necessidade de amostragem e análise genômica de um maior número de espécies, visando dar suporte para estudos taxonômicos, evolutivos e filogenéticos do grupo (GIVNISH et al., 2007).

Nesse sentido, análises envolvendo a citometria de fluxo (CF) têm sido reportadas com a finalidade de determinar o conteúdo de DNA nuclear e a

proporção de bases AT e GC de espécies de bromeliáceas, expandindo dessa forma, os dados acerca de seu genoma (FAVORETO et al., 2012). Essas análises têm contribuído com dados para estudos de taxonomia, evolução (EBERT; TILL, 1997; RAMÍREZ-MORILLO; BROWN, 2001) e diversidade genética (SGORBATI et al., 2004; FAVORETO et al., 2012).

Além das análises de CF, estudos citogenéticos têm sido reportados com o objetivo de esclarecer aspectos taxonômicos e evolutivos na família Bromeliaceae (FAVORETO et al., 2012). Inicialmente, os trabalhos objetivavam a contagem cromossômica. Lindschous (1933) reportou o número cromossômico básico de $x = 9$ para a subfamília Tillandsioideae, enquanto Weiss (1965) sugeriu $x = 8$. Marchant (1967) determinou o número cromossômico de 72 espécies, revelando $2n = 48, 50, 56, 64, 72, 94, 96, 100, 126$ e 34 (*Cryptanthus*) cromossomos, indicando um número básico para a família de $x = 25$ (citados por PALMA-SILVA et al., 2004). De acordo com Cotias-de-Oliveira et al. (2000), Cotias-de-Oliveira et al. (2004), Gitaí, Horres, Benko-Iseppon (2005), Bellintani, Cotias-de-Oliveira e Assis (2005) e Ceita et al. (2008), o número básico de cromossomos para a família Bromeliaceae é $x = 25$, com a exceção de *Cryptanthus* (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; PALMA-SILVA et al., 2004; GITAÍ; HORRES; BENKO-ISEPPON, 2005; CEITA et al., 2008).

Apesar dos avanços alcançados, os estudos de CF são escassos, e apenas 2,3% das bromeliáceas tem seu genoma estimado (Tabela 1). Além disso, as análises citogenéticas em Bromeliaceae abrangem, somente, 10% de todas as espécies do grupo (Tabela 2). Este fato deve-se, especialmente, ao número relativamente alto ($2n = 50$) e do tamanho total dos cromossomos. Nesse sentido, torna-se importante a aplicação de metodologias que ampliem as informações acerca do cariótipo, conteúdo de DNA e composição de bases (AT% e GC%) das espécies de Bromeliaceae.

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Caracterizar o genoma de *Pitcairnia flammea* (L. B. Smith) L. B. Smith quanto ao tamanho do genoma nuclear, relação de bases AT e GC, e cariótipo.

1.1.2. Objetivos específicos

- Estimar o conteúdo de DNA nuclear e a proporção de bases (AT% e GC%) dessa espécie por meio da CF.
- Determinar o número cromossômico dessa espécie, caracterizar morfometricamente seus cromossomos metafásicos e estabelecer o kariograma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citometria de fluxo em Bromeliaceae

As análises de CF têm sido aplicadas em espécies da família Bromeliaceae, visando, principalmente, mensurar o conteúdo de DNA nuclear 2C em picogramas (pg). Arumuganathan e Earle (1991), por meio dos procedimentos de CF, reportaram, pela primeira vez, o valor 2C nuclear de duas espécies de Bromeliaceae. A espécie *Ananas bracteatus* (Lindley) Schultes f. apresentou valor 2C = 0,920 pg e *A. comosus* (Linnaeus) Merrill 2C = 1,090 pg.

Ebert e Till (1997) utilizaram essa ferramenta para mensurar o tamanho do genoma nuclear 1C de 47 espécies de 10 gêneros da subfamília Pitcairnioideae. Os valores encontrados variaram de 1C = 0,300 pg para *Pitcairnia* L'Héritier a 1C = 0,930 pg referente à *Fosterella* L. B. Smith.

Também empregando a CF, Ramírez-Morillo e Brown (2001) mensuraram e compararam o tamanho do genoma nuclear de espécies de *Cryptanthus* (Bromelioideae), 2n = 34 ou 36 cromossomos, com outras bromélias conhecidas por apresentarem 2n = 50 cromossomos. O maior valor do tamanho do genoma nuclear

encontrado foi de *Cryptanthus beuckeri* E. Morren equivalente a $2C = 1,458$ pg e o menor foi de *Cryptanthus schwackeanus* Mez ($2C = 0,710$ pg). Em relação às outras espécies, *Orthophytum saxicola* (Ule) L. B. Smith teve o menor conteúdo de DNA, estimado em $2C = 0,640$ pg.

Sgorbati et al. (2004) analisaram a diversidade genética e biologia reprodutiva de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae), examinando relações entre as populações dessa espécie e suas estratégias reprodutivas, com fins de se obter subsídios para adoção de estratégias de conservação da mesma. Por meio da CF verificou-se que a espécie possui $2C = 1,130$ pg, que o embrião apresenta um conteúdo relativo de DNA equivalente a $2C$ e o endosperma $3C$. Esses últimos dados revelaram um sistema sexuado de reprodução nessa espécie.

Zonneveld et al. (2005) mensuraram o tamanho do genoma nuclear de duas espécies de bromeliáceas, *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch, $2C = 2,200$ pg e *Tillandsia usneoides* (Linnaeus) Linnaeus, $2C = 2,500$ pg. Em análises mais recentes, Favoreto et al. (2012) reportaram o conteúdo de DNA nuclear e composição de bases AT% de 14 espécies de Bromeliaceae, os quais variaram de $2C = 0,770$ pg para *Billbergia horrida* Regel a $2C = 3,340$ pg para *Tillandsia loliaceae* Martius ex Schultes f., e AT = 60,26% para *Vriesea racinae* L. B. Smith e AT = 66,05% para *Billbergia tweediana* Baker.

Como sumarizado na Tabela 1, apesar das bromélias serem estudadas sob diversos aspectos botânicos, ecológicos e evolutivos, os estudos de CF são extremamente escassos, abrangendo apenas 2,3% das espécies da família. Portanto, é imperativo a ampliação de trabalhos nesse sentido, para possibilitar análise do valor $2C$ nuclear de um maior número de espécies desse grupo.

Tabela 1 – Valores de conteúdo de DNA nuclear reportados na literatura referentes a 2,3% de todas as espécies da família Bromeliaceae

Gênero	Espécie	Valor 2C (pg)	Referência
<i>Cryptanthus</i>			
	<i>C. bahianus</i> L. B. Smith	0,750	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>C. schwackeanus</i> Mez	0,710	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>C. beuckeri</i> E. Morren	1,458	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>C. acaulis</i> (Lindley) Beer	1,380	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>Cryptanthus</i> sp.	1,330	Favoreto et al. (2012)
<i>Billbergia</i>			
	<i>B. nutans</i> H. Wendle ex Regel	0,752	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>B. horrida</i> Regel	0,770	Favoreto et al. (2012)
	<i>B. euphemiae</i> E. Morren	0,890	Favoreto et al. (2012)
	<i>B. tweedieana</i> Baker	0,950	Favoreto et al. (2012)
<i>Brocchinia</i>			
	<i>B. acuminata</i> L. B. Smith	0,760	Ebert e Till (1997)
	<i>B. tatei</i> L. B. Smith	0,780	Ebert e Till (1997)

Gênero	Espécie	Valor 2C (pg)	Referência
<i>Deuterocohnia</i>			
	<i>D. longipetala</i> (Baker) Mez	0,740	Ebert e Till (1997)
	<i>D. schreiteri</i> Castellanos	0,800	Ebert e Till (1997)
<i>Aechmea</i>			
	<i>A. nudicaulis</i> var. <i>cuspidata</i> Baker	0,780	Favoreto et al. (2012)
	<i>A. ramosa</i> Martius ex Schultes f.	1,370	Favoreto et al. (2012)
<i>Bromelia</i>			
	<i>B. antiacantha</i> Bertoloni	0,810	Favoreto et al. (2012)
<i>Pitcairnia</i>			
	<i>P. felicianae</i> (A. Chevalier) Harms & Mildbraed	0,600	Ebert e Till (1997)
	<i>P. heterophylla</i> (Lindley) Beer	0,880	Ebert e Till (1997)
	<i>P. prolifera</i> Rauh	0,840	Ebert e Till (1997)
	<i>P. cardenasii</i> L. B. Smith	1,020	Ebert e Till (1997)
	<i>P. rectiflora</i> Rauh	1,200	Ebert e Till (1997)
	<i>P. scepterigera</i> Mez	1,200	Ebert e Till (1997)
	<i>P. piepenbringii</i> Rauh & E. Gross	1,200	Ebert e Till (1997)
	<i>P. poeppigiana</i> Mez	1,200	Ebert e Till (1997)

Continuação tabela 1

Gênero	Espécie	Valor 2C (pg)	Referência
	<i>P. heerdeae</i> E. Gross & Rauh	1,180	Ebert e Till (1997)
	<i>P. palmoides</i> Mez & Sodiro	1,180	Ebert e Till (1997)
	<i>P. atrorubens</i> (Beer) Baker	1,200	Ebert e Till (1997)
	<i>P. chiapensis</i> Mirea	1,220	Ebert e Till (1997)
	<i>P. spicata</i> (Lamarck) Mez	1,220	Ebert e Till (1997)
	<i>P. aphelandriflora</i> L. B. Smith	1,240	Ebert e Till (1997)
	<i>P. pomacochae</i> Rauh	1,240	Ebert e Till (1997)
	<i>P. aureobrunnea</i> Rauh	1,120	Ebert e Till (1997)
	<i>P. yaupi-bajaensis</i> Rauh	1,120	Ebert e Till (1997)
	<i>P. riparia</i> Mez	1,140	Ebert e Till (1997)
	<i>P. halophila</i> L. B. Smith	1,080	Ebert e Till (1997)
	<i>P. micotrinensis</i> R.W. Read	1,100	Ebert e Till (1997)
	<i>P. tabuliformis</i> Linden	1,100	Ebert e Till (1997)
	<i>P. angustifolia</i> Soleer in Aiton	1,060	Ebert e Till (1997)
	<i>P. albomarginata</i> L. B. Smith	1,280	Ebert e Till (1997)
	<i>P. flammea</i> Lindley	1,280	Ebert e Till (1997)

Continuação tabela 1

Gênero	Espécie	Valor 2C (pg)	Referência
	<i>P. villetaensis</i> Rauh	1,260	Ebert e Till (1997)
	<i>P. andrena</i> Linden	1,300	Ebert e Till (1997)
	<i>P. paraguayensis</i> L. B. Smith	1,360	Ebert e Till (1997)
	<i>P. venezuelana</i> L.B. Smith & Steyermark	1,360	Ebert e Till (1997)
	<i>P. schultzei</i> Harms	1,360	Ebert e Till (1997)
	<i>P.grafii</i> Rauh	1,340	Ebert e Till (1997)
<i>Orthophytum</i>			
	<i>O. saxicola</i> (Ule) L. B. Smith	0,640	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
<i>Puya</i>			
	<i>P. mirabilis</i> (Mez) L. B. Smith	0,880	Ebert e Till (1997)
	<i>P. stenothyrsa</i> (Baker) Mez	0,940	Ebert e Till (1997)
	<i>P. raimondii</i> Harms	1,130	Sgorbati et al. (2004)
<i>Ayensua</i>			
	<i>A. uaipanensis</i> L. B. Smith	0,860	Ebert e Till (1997)
<i>Ananas</i>			
	<i>A. macrodontes</i> E. Morren	1,000	Favoreto et al. (2012)
	<i>A. bracteatus</i> (Lindley) Schultes f.	0,920	Arumuganathan e Earle (1991)

Continuação tabela 1

Gênero	Espécie	Valor 2C (pg)	Referência
<i>Canistropsis</i>	<i>A. comosus</i> (Linnaeus) Merrill	1,090	Arumuganathan e Earle (1991)
	<i>C. billbergioides</i> (Schultes f.) Leme	1,000	Favoreto et al. (2012)
<i>Hechtia</i>	<i>H. epigyna</i> Harms	0,960	Ebert e Till (1997)
	<i>H. matudae</i> L. B. Smith	0,940	Ebert e Till (1997)
<i>Tillandsia</i>	<i>T. stricta</i> Soleer	1,200	Favoreto et al. (2012)
	<i>T. cyanea</i> Linden ex K. Koch	2,200	Zonneveld et al. (2005)
	<i>T. usneoides</i> (Linnaeus) Linnaeus	2,500	Zonneveld et al. (2005)
	<i>T. loliacea</i> Martius ex Schultes f.	3,340	Favoreto et al. (2012)
<i>Vriesea</i>	<i>V. racinae</i> L. B. Smith	1,190	Favoreto et al. (2012)
	<i>V. scalaris</i> E. Morren	1,110	Favoreto et al. (2012)

Continuação tabela 1

Gênero	Espécie	Valor 2C (pg)	Referência
<i>Navia</i>			
	<i>N. splendens</i> L. B. Smith	1,420	
<i>Dyckia</i>			Ebert e Till (1997)
	<i>D. estevesii</i> Rauh	1,600	
	<i>D. floribunda</i> Grisebach	1,580	Ebert e Till (1997)
<i>Fosterella</i>			Ebert e Till (1997)
	<i>F. penduliflora</i> (C.H. Wright) L.B. Smith	1,860	Ebert e Till (1997)
	<i>F. villosula</i> (Harms) L. B. Smith	1,860	Ebert e Till (1997)
<i>Neoregelia</i>			
	<i>N. aff. Simulans</i> L. B. Smith	0,980	Favoreto et al. (2012)
<i>Encholirium</i>			
	<i>E. irwinii</i> L. B. Smith	1,740	Ebert e Till (1997)
	<i>Encholirium</i> sp.	1,740	Ebert e Till (1997)
	Média	1,180	

2.2. Citogenética na família Bromeliaceae

Os primeiros estudos citogenéticos realizados na família Bromeliaceae objetivaram estabelecer o número de cromossomos das espécies. Em 1904, Billings começava as análises cromossômicas na família, que se tornaram mais expressivas a partir de 1933, com estudos de Lindschau em 50 espécies de bromélias de diferentes gêneros. Posteriormente, a determinação do número de cromossomos de algumas espécies foi realizada por Marchant (1967), Sharma e Glosch (1971), Mc Williams (1974) e Varadarajan e Brown (1985). Esses autores observaram uma ampla diversidade de números cromossômicos entre as espécies (citados por PALMA-SILVA et al., 2004).

Lindschous (1933) propôs que Tillandsioideae possui um número básico de cromossomos equivalente a $x = 9$ e Weiss (1965) considerou $x = 8$, sendo que ambos relataram a ocorrência de espécies com diferentes níveis de ploidia. Marchant (1967) estudou 72 espécies de Bromeliaceae, as quais revelaram $2n = 48, 50, 56, 64, 72, 94, 96, 100$ e 126 cromossomos. Com base nesses resultados, o autor reportou que, salvo *Cryptanthus* ($x = 17$), Bromeliaceae apresenta um número básico de cromossomos $x = 25$ (citados por PALMA-SILVA et al., 2004).

Brown e Gilmartin (1989) sugeriram que o número $x = 25$ teria derivado de uma hibridação entre espécies paleo-diploides com $x = 8$ e 9 , seguido de duplicação cromossômica gerando um paleo-alotetraploide com $x = 17$. Posteriormente, uma hibridação entre o paleo-alotetraploide e o paleo-diploide, com $x = 8$, poderia ter resultado em um alo-hexaploide com $x = 25$, o então número cromossômico básico da família Bromeliaceae (Figura 1).

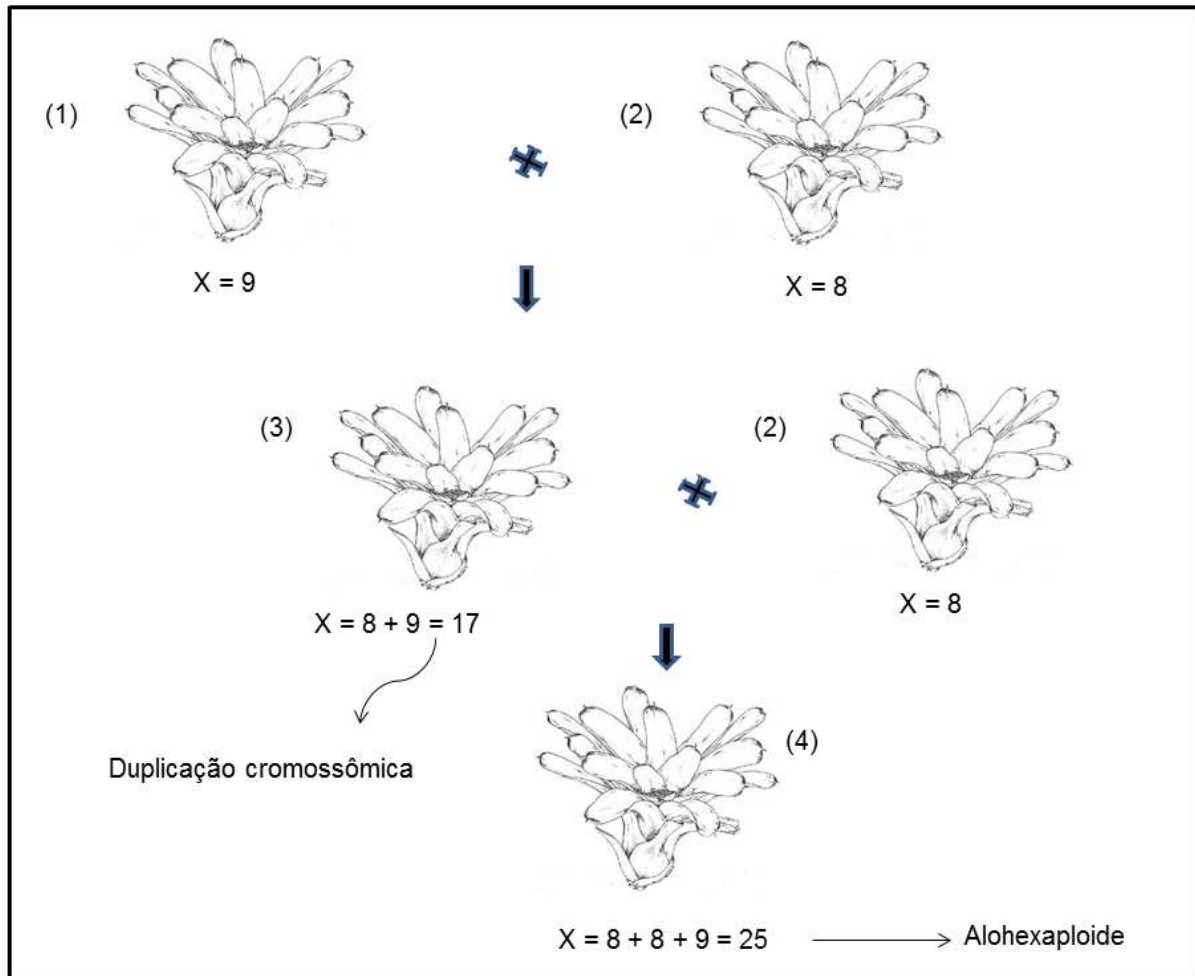


Figura 1 – Esquema representativo (adaptado de Ebert e Till (1997)) do processo evolutivo que culminou no número básico $x = 25$ cromossomos da família Bromeliaceae. Primeiramente, uma hibridação entre espécies paleo-diploides com $x = 9$ (1) e 8 (2), com duplicação cromossômica gerando um paleo-alotetraploide com $x = 17$ (3). Posteriormente, uma hibridação entre o paleo-alotetraploide (3) e o paleo-diploide (2), com $x = 8$, poderia ter resultado em um alo-hexaploide com $x = 25$ (4).

Numa segunda etapa dos estudos citogenéticos, os pesquisadores caracterizaram morfológicamente os cromossomos das bromeliáceas. Inicialmente Cotias-de-Oliveira et al. (2000) observaram que os cromossomos da maioria das espécies são relativamente pequenos ($0,23 - 1,08 \mu\text{m}$), fato que teria dificultado as análises. Esse autor determinou, também, o número cromossômico de 17 espécies de Bromeliaceae, sendo que a maioria apresentou $2n = 50$, com exceção de três espécies poliploides com $2n = 100$ (*Orthophytum burle-marxii* L. B. Smith & R. W. Read) e $2n = 150$ (*Bromelia laciniosa* Martius ex Schultes f. e *Orthophytum maracasense* L. B. Smith).

Do mesmo modo, Palma-Silva et al. (2004) relataram que as poucas informações acerca da morfologia do cariótipo das bromélias pode ser imputada ao pequeno tamanho dos cromossomos mitóticos. Dentro dessa realidade, os autores realizaram um estudo sobre o comportamento meiótico em células-mãe do grão de pólen e viabilidade polínica de 15 espécies de Bromeliaceae. Todos os taxa examinados exibiram emparelhamento bivalente e segregação regular dos cromossomos na meiose, e um número consistente de $n = 25$ cromossomos.

Dando continuidade aos estudos citogenéticos na família Bromeliaceae, Cotias-de-Oliveira et al. (2004) constataram que as 25 espécies analisadas apresentaram $2n = 50$ cromossomos, com exceção de duas (*Orthophytum albopictum* Philcox e *Neoglaziovia variegata* (Arruda da Camara) Mez com $2n = 100$, com tamanho cromossômico total oscilando entre $0,36 - 1,2 \mu\text{m}$.

Bellintani, Cotias-de-Oliveira e Assis (2005) observaram que $2n = 50$ prevaleceu nas espécies analisadas, com exceção de *Cryptanthus* ($2n = 34$). A partir desses resultados, os autores confirmaram a hipótese de um número básico $x = 25$ para a família Bromeliaceae e decrescente aneuploidia no gênero *Cryptanthus*.

Gitaí, Horres e Benko-Iseppon (2005), em uma análise das características cromossômicas e evolução cariotípica da família Bromeliaceae, reportaram informações citológicas e contagem de cromossomos para 19 taxa de 15 gêneros dessa família. O número básico $x = 25$ foi confirmado e a ocorrência de poliploidia foi detectada em duas espécies. A espécie *Deinacanthon urbanianum* (Mez) Mez apresentou $2n = 100$, enquanto para *Bromelia laciniosa* Martius ex Schultes f., evidenciou-se $2n = 160$. Além disso, cromossomos com tamanho total variando de $0,5$ a $2,72 \mu\text{m}$ foram observados nas diferentes espécies.

Ceita et al. (2008) estudaram o número cromossômico de 18 espécies de Bromeliaceae, tendo em sua maioria $2n = 50$, exceto para *Cryptanthus*, que confirmou o número $2n = 34$. Os cromossomos das espécies de *Cryptanthus* variaram de $0,71$ a $1,25 \mu\text{m}$ de comprimento, enquanto os das outras espécies, com $2n = 50$, variaram de $0,25$ a $1,5 \mu\text{m}$.

Segundo Cotias-de-Oliveira et al. (2000), e de acordo com a tabela 2, a uniformidade $2n = 50$ prevalece na família, no entanto os estudos citogenéticos

mostraram algumas variações em relação ao número cromossômico para espécies individuais e discrepâncias entre os dados encontrados por meio de análises mitóticas e meióticas. O elevado número e o pequeno tamanho dos cromossomos podem ter contribuído para contagens errôneas, as quais foram baseadas em prometáfases ou metáfases com cromossomos que se sobrepõem, ou também em virtude da presença de possíveis cromossomos B.

Como sumarizado na Tabela 2, os estudos citogenéticos são bastante restritivos for considerado o número de espécies que compõe a família. Em virtude desse fato, todos os autores concordam que outras metodologias devem ser empregadas para ampliar as informações acerca do cariótipo das espécies da família Bromeliaceae.

Tabela 2 – Número cromossômico 2n reportados na literatura referentes a diferentes espécies de Bromeliaceae

Gênero	Espécie	Nº cromossômico 2n	Referência
<i>Vriesea</i>			
	<i>V. carinata</i> Wawra	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. erythroactylon</i> (E. Morren) E. Morren ex. Mez	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. flammea</i> L. B. Smith	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. friburgensis</i> Mez	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. guttata</i> Linden e Ere	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. incurvata</i> Gaudchaud	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. platynema</i> Gaudchaud	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. platzmannii</i> E. Morren	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. psittacina</i> (Hooker) Lindley	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>V. fosteriana</i> L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>V. picta</i> (Mez et Wercklé) L. B. Smith et Pittendr.	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>V. saundersii</i> (Carrière) E. Morren ex Mez	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>V. botafogensis</i> Mez	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
<i>Aechmea</i>			
	<i>A. calyculata</i> (Morren) Baker	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>A. gamosepala</i> Wittmack	50	Palma Silva et al. (2004)
	<i>A. aquilega</i> (Salisbury) Grisebach	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>A. blanchetiana</i> (Baker) L. B. Smith Salvador	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>A. conifera</i> L. B. Smith Baixa Gree	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>A. fulgens</i> Brongniart	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>A. miniata</i> (Beer) hortus ex Baker b var. <i>discolor</i> (Beer) Beer	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)

Gênero	Espécie	Nº cromossômico 2n	Referência
	<i>A. bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	50	Gitaí et al. (2005)
	<i>A. comata</i> (Gaudichaud) Baker	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. caudata</i> Lindman	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. recurvata</i> (Klotzsch) L. B. Smith	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. correia-araujo</i> Pereira & Moutinho	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. pineliana</i> (Brongniart ex Planchon) Baker	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. marauensis</i> Leme	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. bicolor</i> L. B. Smith	50	Ceita et al. (2008)
<i>Encholirium</i>			
	<i>E. spectabile</i> Mart. ex Schult.f.	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
<i>Ananas</i>			
	<i>A. lucidus</i> Miller	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>A. nanus</i> (L. B. Smith) L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>A. comosus</i> Linnaeus Merrel	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Billbergia</i>			
	<i>B. chlorosticta</i> Saunders Hortus	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>B. morelii</i> Brongniart	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>B. euphemiae</i> E. Morren	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
<i>Bromelia</i>			
	<i>B. laciniosa</i> Mart. ex Schultes	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>B. plumieri</i> (E. Morren) L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
<i>Cryptanthus</i>			
	<i>C. bahianus</i> L. B. Smith	34	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>C. warren-loosei</i> Leme	34	Ceita et al. (2008)
	<i>C. maritimus</i> L. B. Smith	34	Ceita et al. (2008)
	<i>C. lyman-smith</i> Leme	34	Bellintani et al. (2005)

Continuação tabela 2

Gênero	Espécie	Nº cromossômico 2n	Referência
	<i>C. beuckeri</i> E. Morren	34	Bellintani et al. (2005)
	<i>C. vexatus</i> Leme	34	Bellintani et al. (2005)
	<i>C. acaulis</i> (Lindl.) Beer	34	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>C. schwackeanus</i> Mez	34	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>C. bromelioides</i> Otto e F. Dietr.	34	Sharma e Ghosh (1971)
	<i>C. praetextus</i> E. Morren ex Baker	34	Sharma e Ghosh (1971)
	<i>C. zonatus</i> (Visiani) Beer	36	Lindschau (1933)
<i>Hohenbergia</i>			
	<i>H. catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>H. littoralis</i> L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>H. stellata</i> Schultes Baixa Gree	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>H. aff. utriculosa</i> Ule	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>H. blanchetti</i> (Baker) E. Morren ex Mez	50	Ceita et al. (2008)
	<i>H. pennae</i> Pereira	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>H. castelanosii</i> L. B. Smith a Read	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>H. correia-araujoi</i> Pereira e Moutinho	50	Bellintani et al. (2005)
<i>Neoglaziovia</i>			
	<i>N. variegata</i> (Arruda Câmara) Mez	100	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
<i>Orthophytum</i>			
	<i>O. maracasense</i> L. B. Smith	150	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>O. burle-marxii</i> L. B. Smith & Rangel	100	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
	<i>O. albopictum</i> Philcox	100	Louzada et al. (2010)
	<i>O. amoenum</i> (Ule) L. B. Smith	100	Louzada et al. (2010)
	<i>O. disjunctum</i> L. B. Smith	50	Louzada et al. (2010)
	<i>O. saxicola</i> (Ule) L. B. Smith	50	Ramírez-Morillo e Brown (2001)
	<i>O. hatschbachii</i> Leme	50	Louzada et al. (2010)

Continuação tabela 2

Gênero	Espécie	Nº cromossômico 2n	Referência
	<i>O. mucugense</i> Wand.& A. A. Conc.	50	Louzada et al. (2010)
	<i>O. vagans</i> M. B. Foster	50	Louzada et al. (2010)
	<i>O. supthutii</i> E. Gross & Barthlott	50	Louzada et al. (2010)
	<i>O. ophiuroides</i> Louzada & We	50	Louzada et al. (2010)
<i>Dyckia</i>			
	<i>D. platyphylla</i> L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>D. saxatilis</i> Mez	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Neoregelia</i>			
	<i>N. carcharodon</i> (Baker) L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. hoehneana</i> L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. laevis</i> (Mez) L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. johannis</i> (Carrière) L. B. Smith	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. wilsoniana</i> M.B. Foster	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. rutilans</i> E. Morren	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. longiflorum</i> Ule	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>N. procerum</i> Lindman	50	Ceita et al. (2008)
	<i>N. tenebrosa</i> Leme	50	Ceita et al. (2008)
	<i>N. leucophoea</i> (Baker) L. B. Smith	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>N. longisepala</i> Pereira e Penna	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>N. cruenta</i> (R. Graham) L. B. Smith	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>N. carolinae</i> (Beer) L. B. Smith	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>N. bahiana</i> (Ule) L. B. Smith	50	Bellintani et al. (2005)
<i>Quesnelia</i>			
	<i>Q. arvenis</i> (Vellozo) Mez	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>Q. edmundoi</i> L. B. Smith		
	b var. <i>rubrobracteata</i> E. Pereira	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)

Continuação tabela 2

Gênero	Espécie	Nº cromossômico 2n	Referência
<i>Portea</i>			
	<i>P. silveirae</i> Mez	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
	<i>P. greiflora</i> Philcox	50	Cotias-de-Oliveira et al. (2004)
<i>Wittrockia</i>			
	<i>W. gigantea</i> (Baker) Leme	160	Gitaí et al. (2005)
	<i>W. spiralipetala</i> Leme	50	Bellintani et al. (2005)
<i>Deinacanthon</i>			
	<i>D. urbanianum</i> (Mez) Mez	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Fascicularia</i>			
	<i>F. bicolor</i> (Ruiz & Pavon) Mez ssp. <i>bicolor</i> E.C. Nelson & Zizka	50	Gitaí et al. (2005)
	<i>F. bicolor</i> (Ruiz & Pavon) Mez ssp. <i>canaliculata</i> E.C. Nelson & Zizka	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Greigia</i>			
	<i>G. spec. nov. (aff. G. mulfordii var. micrantha)</i>	50	Gitaí et al. (2005)
	<i>G. sphacelata</i> (Ruiz & Pavon) Regel	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Ochagavia</i>			
	<i>O. elegans</i> R. Philippi	50	Gitaí et al. (2005)
	<i>O. litoralis</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Ayensua</i>			
	<i>A. uaipanensis</i> (Maguire) L. B. Smith	50 e 100	Gitaí et al. (2005)
<i>Deuterocohnia</i>			
	<i>D. lorentziana</i> (Mez) Spencer & L. B. Smith	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Pitcairnia</i>			
	<i>P. atrorubens</i> (Beer) Baker	50	Gitaí et al. (2005)

Gênero	Espécie	Nº cromossômico 2n	Referência
<i>Puya</i>	<i>P. mirabilis</i> (Mez) L. B. Smith	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Catopsis</i>	<i>C. floribunda</i> L. B. Smith	50	Gitaí et al. (2005)
<i>Tillandsia</i>	<i>T. dodsonii</i> L. B. Smith	50	Ceita et al. (2008)
<i>Alcantarea</i>	<i>A. nahoumi</i> (Leme) R. Grant	50	Ceita et al. (2008)
	<i>A. imperialis</i> (Carrière) Harms	50	Ceita et al. (2008)
<i>Nidularium</i>	<i>N. lyman-smithii</i> Leme	50	Ceita et al. (2008)
	<i>N. scheremetiewii</i> Regel	50	Ceita et al. (2008)
	<i>N. innocentii</i> var. <i>innocentii</i> Lemaire	50	Ceita et al. (2008)
	<i>N. innocentii</i> x <i>Neoregelia johannis</i>	50	Ceita et al. (2008)
<i>Canistropsis</i>	<i>C. simulans</i> (Pereira e Leme) Leme	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>C. seidelii</i> (L. B. Smith A Reitz) Leme	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>C. microps</i> (E. Morren ex Mez) Leme	50	Bellintani et al. (2005)
	<i>C. bilbergioides</i> (Schul.)	50	Bellintani et al. (2005)
<i>Canistrum</i>	<i>C. fosterianum</i> L. B. Smith	50	Bellintani et al. (2005)

3 METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

Sementes de *Pitcairnia flammea* (Voucher no. 5,569, Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) foram coletadas em Burarama, Cachoeiro de Itapemirim (ES, Brasil) e germinadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo sais $\frac{1}{2}$ MS (Sigma[®]), 10 ml l⁻¹ de vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 3,0% (w/v) de sacarose, ágar 7 g l⁻¹ e pH ajustado para 5,7.

Sementes de *Solanum lycopersicum* Linnaeus 'Stupické' (padrão interno, 2C = 2,000 pg, PRAÇA-FONTES; CARVALHO; CLARINDO, 2011b, AT% = 64,5, GC% = 35,4, DOLEŽEL; SGORBATI; LUCRETTI, 1992; MEISTER; BAROW, 2007) foram gentilmente cedidas por Jaroslav Doležel (Instituto Experimental de Botânica, República Tcheca).

3.2. Citometria de fluxo

A extração dos núcleos de *P. flammea* (amostra) e *S. lycopersicum* 'Stupické' foi realizada simultaneamente (padrão interno) de acordo com Galbraith et al. (1983). Fragmentos foliares, de 2 cm², foram retalhados em placa de Petri contendo 0,5 mL do tampão de extração nuclear OTTO I (OTTO, 1990; DOLEŽEL; GÖHDE, 1995), a 4 °C, suplementado com 2 mM de ditiotreitol e 50 µg mL⁻¹ de RNase (Sigma[®]). A suspensão foi ajustada para 1 mL com o mesmo tampão, filtrada em malha de nylon (Partec[®]) de 30 µm, em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL⁻¹ (Eppendorf[®]), e então centrifugada (ALC[®] microCentrifugette[®] 4214) a 100 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso e incubado por 10 min em 100 µL do tampão de extração nuclear OTTO-I. A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução OTTO-I:OTTO-II (OTTO, 1990; DOLEŽEL; GÖHDE, 1995) na proporção de 1:2 (LOUREIRO et al., 2006) e, finalmente, filtrada em malha de nylon de 20 µm (Partec[®]).

Para determinação do tamanho do genoma nuclear, o tampão OTTO I:OTTO II (1:2) (LOUREIRO et al., 2006) foi suplementado com 2,0 mM de ditioneitol (Sigma[®]) e 75 μ M de iodeto de propídio (IP, excitação/emissão nos comprimentos de onda: 480-575/550-740 nm, SHAPIRO, 2003) e 50 μ g mL⁻¹ RNase (DOLEŽEL; SGORBATI; LUCRETTI, 1992; MEISTER, 2005). Para quantificação da composição de bases AT%, o tampão OTTO I:OTTO II (1:2) (LOUREIRO et al., 2006) foi suplementado com 1,5 μ M 4', 6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI).

As suspensões foram coradas durante 30 min no escuro. O tamanho do genoma e a composição de bases AT% de *P. flammea* foram estabelecidos relativamente ao pico de *S. lycopersicum* pela aplicação da proporção das intensidades relativas de fluorescência dos picos correspondentes aos núcleos na fase G₀/G₁. O valor do conteúdo de DNA 2C (pg) foi convertido para pares de base (bp), considerando que 1 pg de DNA corresponde a 0,978 x 10⁹ bp (DOLEŽEL et al., 2003).

As suspensões foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS[®] (Partec[®] GmbH, Munster, Germany), equipado com uma fonte de laser (488 nm) e luz UV (388 nm). O equipamento foi calibrado e alinhado usando microesferas e soluções padrão de acordo com as recomendações do fabricante (Partec[®]). O programa FlowMax[®] (Partec[®]) foi usado para a análise dos dados.

Seis repetições independentes, contabilizando mais de 10.000 núcleos analisados, foram realizadas. O coeficiente de variação (CV), denotado para a distribuição dos picos dos núcleos na fase G₀/G₁ do padrão *S. lycopersicum* e da amostra *P. flammea*, foi automaticamente calculado pelo programa FlowMax[®] (Partec[®]).

3.3. Citogenética

As sementes com raízes medindo entre 1,0 – 2,0 cm foram tratadas com o agente anti-tubulínico amiprofos-metil (Nihon Bayer Agrochem K. K.[®]) em concentrações finais de 3 μ M e 4 μ M por um período de 4 horas. Subsequentemente, as raízes foram lavadas em água destilada por 20 min e então,

fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) (Merck®). O fixador foi trocado três vezes e a amostra foi estocada a -20°C (CARVALHO; CLARINDO; ALMEIDA, 2007). Após permanecer, no mínimo, 24 horas, as raízes foram lavadas em água destilada e incubadas por períodos de 2 horas, 2 horas e 30 min, 2 horas e 45 min e 3 horas, a 34°C em solução de pectinase (Sigma®), em concentrações de 1:5, 1:8, 1:10, 1:12, 1:13, 1:14 e 1:15 (enzima:água). Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada por 10 min, fixadas novamente e armazenadas a -20°C (CLARINDO; CARVALHO, 2008).

As lâminas foram preparadas por meio da técnica de dissociação celular das raízes maceradas enzimaticamente, subsequentemente secas ao ar e colocadas numa placa aquecedora a 50°C (CARVALHO; SARAIVA, 1993, 1997). As lâminas foram coradas numa solução de Giemsa 5% (Merck®) em tampão fosfato (pH 6,8) por 20 min, lavadas duas vezes em água destilada e secas em placa aquecedora por 5 min. Posteriormente, as lâminas foram observadas em um microscópio Carl Zeiss MicroImaging, GmbH 37081, com objetiva de 40x. As metáfases foram capturadas utilizando o microscópio Olympus TM 2.3 BX-60 (Olympus, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera CCD Photometrics CoolSNAP Procf (Roper Scientific, 1 Tucson, AZ, USA), monocromática de 12-bits.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Citometria de fluxo

O pico de fluorescência dos núcleos em G_0/G_1 de *P. flammea* e *S. lycopersicum* apresentaram CV abaixo de 5%. Este valor tem sido considerado adequado para procedimentos de CF em plantas (PRAÇA-FONTES et al., 2011a). De acordo com Praça-Fontes et al. (2011a), uma preparação adequada das suspensões nucleares é imperativo para fornecer núcleos estequiometricamente corados e, conseqüentemente, baixos valores de CV, como obtido no presente trabalho.

S. lycopersicum 'Stupické' foi escolhido como padrão primário para determinação do valor 2C. Empregando a CF, Praça-Fontes et al. (2011a) reavaliaram o valor 2C de conteúdo de DNA de oito espécies utilizadas frequentemente como padrão primário. Por meio das análises, de *Arabidopsis thaliana* Linnaeus Heynh a *Allium cepa* L., os autores demonstraram que *S. lycopersicum* 'Stupické' é um padrão primário de referência ideal para mensuramento via CF.

Outros padrões internos de referência têm sido usados por alguns autores para determinação do conteúdo de DNA nuclear de bromeliáceas. Arumuganathan e Earle (1991) e Sgorbati et al. (2004) utilizaram eritrócitos de galinha, no entanto esse padrões tem sido apontados como inadequados para análises de CF em plantas (JOHNSTON et al., 1999; DOLEŽEL; BARTOŠ, 2005). Johnston et al. (1999) afirmaram que a quantificação do DNA de genomas animais tem apresentado variação entre diferentes amostras. Além disso, padrões de origem animal apresentam inconstância dos picos de fluorescência durante diferentes preparações com a mesma amostra, além de serem considerados padrões pseudo-internos, já que não podem ser preparados juntamente com a amostra vegetal (GALBRAITH et al., 1983). Em virtude desses problemas, sugere-se que em análises de CF e genomas vegetais sejam adotados padrões vegetais (DOLEŽEL; SGORBATI; LUCRETTI, 1992).

De acordo com o pico G_0/G_1 de fluorescência do padrão *S. lycopersicum* ($2C = 2,000$ pg; PRAÇA-FONTES; CARVALHO; CLARINDO, 2011b), calculou-se o valor médio de conteúdo de DNA de *P. flammea*, que foi equivalente a $2C = 1,440$ pg. Assim como o valor 2C, a composição de bases AT%/ GC% foi determinada para *P. flammea*, apresentando AT = 64,28% e GC = 35,72% (Figura 2).

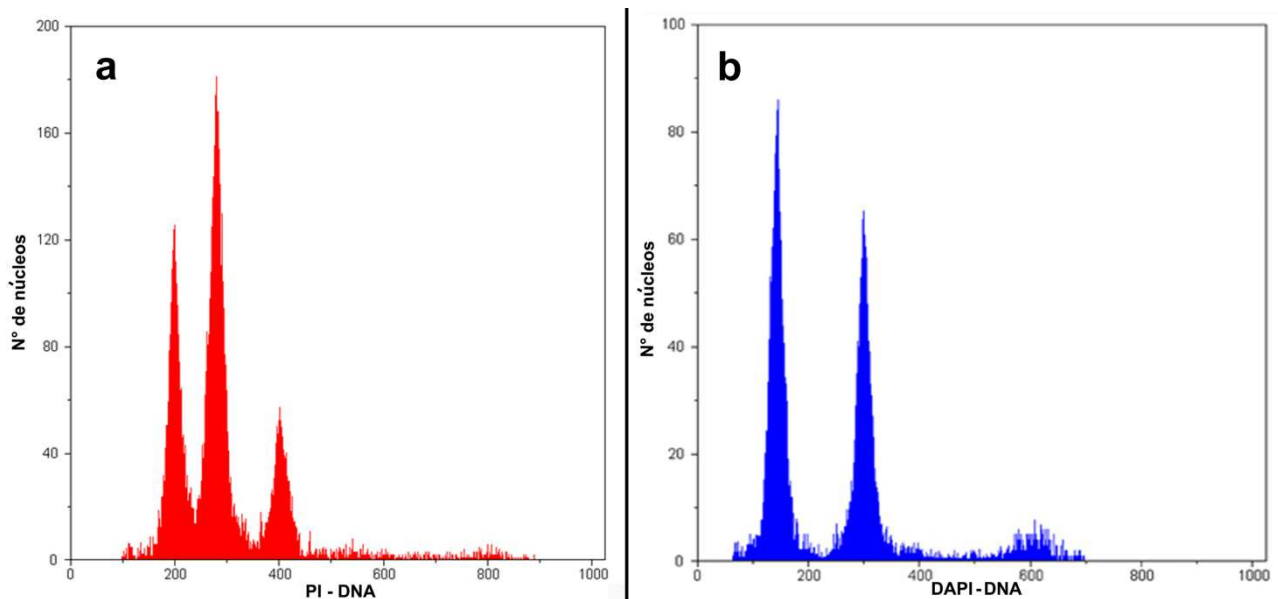


Figura 2 – Histogramas apresentando os picos referentes aos núcleos G_0/G_1 , com coeficiente de variação menor que 5%, obtidos por meio das suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo (a) e DAPI (b). (a) O pico posicionado no canal 200 refere-se aos núcleos G_0/G_1 de *P. flammea* e no canal 277,8 ao padrão interno *S. lycopersicum*. (b) O pico posicionado no canal 168 refere-se aos núcleos em G_0/G_1 de *P. flammea*, e no canal 300 ao padrão interno *S. lycopersicum*.

Ebert e Till (1997) quantificaram o tamanho do genoma nuclear 1C de 47 espécies de 10 gêneros na subfamília Pitcairnioideae. Os valores encontrados variaram de $1C = 0,300$ pg para *Pitcairnia* a $1C = 0,930$ pg referente à *Fosterella* L. B. Smith Em um trabalho de revisão, Bennett e Leitch (2011) reportaram o conteúdo de DNA de *P. flammea* equivalente a 1,280 pg utilizando-se *Raphanus sativus* L. como padrão interno da CF. O valor 2C nuclear referente à *P. flammea* encontrado no presente estudo, $2C = 1,440$ pg, difere do citado acima, assim como o padrão de referência utilizado. Dessa forma, a diferença de conteúdo de DNA pode ter sido ocasionada pelo uso de padrões internos diferentes. Segundo Praça-Fontes et al. (2011a), o padrão *R. sativus* apresentou a maior variação de conteúdo de DNA, sendo considerado menos apropriado para análises de CF.

O conteúdo de DNA nuclear de *P. flammea* (1,440 pg) pode ser considerado relativamente pequeno se comparado ao valor 2C nuclear da maioria das Angiospermas. De acordo com Bennett e Leitch (2011), o conteúdo de DNA nuclear das angiospermas varia desde um valor mínimo equivalente a $2C = 0,1296$ pg para,

Genlisea margaretae Hutch, valores médios em torno de $2C = 80$ pg e um valor máximo de $2C = 304,46$ pg referente à *Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch. Diferentes trabalhos tem reportado o conteúdo de DNA nuclear referentes a diversas espécies da família Bromeliaceae (Tabela 2). Da mesma forma que *P. flammea*, esses valores $2C$ nuclear são considerados relativamente pequenos, caracterizando uma constante no grupo. Dessa forma, considerando uma possível reconstrução no genoma nuclear do ancestral do grupo das monocotiledôneas ($2C = 3,700$ pg), um expressivo decréscimo no conteúdo de DNA das bromeliáceas pode ser observado ao longo da evolução de seu genoma (FAVORETO et al., 2012).

Além disso, os resultados evidenciaram que o valor $2C$ de *P. flammea* (1,440 pg) se aproxima da média das bromeliáceas ($2C = 1,180$ pg) e da média das espécies do gênero *Pitcairnia* (1,170 pg) (Tabelas 1, 3). Além do conteúdo de DNA, a composição de bases também foi determinada. Os valores médios $AT = 64,28\%$ e $GC = 35,72\%$ são típicos de algumas eudicotiledôneas e monocotiledôneas em relação ao baixo valor $GC\%$ (FAVORETO et al., 2012). Da mesma forma, a composição de bases ($AT = 64,28\%$ e $GC = 35,72\%$) de *P. flammea* se aproxima da média das bromeliáceas ($AT = 62,30\%$ e $GC = 37,70\%$) (FAVORETO et al., 2012).

Ao analisar a Tabela 3, observa-se que as espécies do gênero *Pitcairnia* relatadas e a espécie *P. flammea* (1,440 pg), apesar de pertencerem ao mesmo gênero, diferem em seus valores de conteúdo de DNA. Considerando que a maioria das espécies de Bromeliaceae possuem $2n = 50$ cromossomos, com algumas exceções (Tabela 2), os diferentes valores de conteúdo de DNA nuclear podem estar relacionados a distintos rearranjos cromossômicos estruturais.

Tabela 3 – Valores de conteúdo de DNA nuclear referentes às espécies do gênero *Pitcairnia*

Espécies do gênero <i>Pitcairnia</i>	Valor 2C nuclear (pg)
<i>P. flammea</i> (L. B. Smith) L. B. Smith	1,44
<i>P. feliciana</i> (A. Chevalier) Harms & Mildbraed	0,60
<i>P. heterophylla</i> (Lindley) Beer	0,88
<i>P. prolifera</i> Rauh	0,84
<i>P. cardenasii</i> L. B. Smith	1,02
<i>P. rectiflora</i> Rauh	1,20
<i>P. scepstrigera</i> Mez	1,20
<i>P. piepenbringii</i> Rauh & E. Gross	1,20
<i>P. poeppigiana</i> Mez	1,20
<i>P. atrorubens</i> (Beer) Baker	1,20
<i>P. macrochlamys</i> Mez	1,20
<i>P. heerdeae</i> E. Gross & Rauh	1,18
<i>P. palmoides</i> Mez & Sodiro	1,18
<i>P. chiapensis</i> Mirea	1,22
<i>P. spicata</i> (Lamarck) Mez	1,22
<i>P. apheleriflora</i> L. B. Smith	1,24
<i>P. pomacochae</i> Rauh	1,24
<i>P. aureobrunnea</i> Rauh	1,12
<i>P. yaupi-bajaensis</i> Rauh	1,12
<i>P. riparia</i> Mez	1,14
<i>P. halophila</i> L. B. Smith	1,08
<i>P. micotrinensis</i> R. W. Read	1,10
<i>P. tabuliformis</i> Linden	1,10
<i>P. angustifolia</i> Soleer in Aiton	1,06
<i>P. albomarginata</i> L. B. Smith	1,28
<i>P. villetaensis</i> Rauh	1,26
<i>P. andreana</i> Linden	1,30
<i>P. paraguayensis</i> L. B. Smith	1,36
<i>P. venezuelana</i> L. B. Smith & Steyermark	1,36
<i>P. schultzei</i> Harms	1,32
<i>P. grafii</i> Rauh	1,34
Média	1,17

Ebert e Till (1997)

4.2. Citogenética

As raízes de *P. flammea*, tratadas com amiprofos-metil (APM) 4 μ M, a 25 C° por 4 horas e maceradas a 34°C com solução de pectinase 1:10 (enzima:água) por 2 horas e 30 min, exibiram cromossomos em diferentes níveis de compactação da cromatina (Figura 3, 4). Dessa forma, foi possível montar e caracterizar o primeiro kariograma de uma Bromeliaceae (Figura 4). O kariograma de *P. flammea* apresentou $2n = 50$ cromossomos, sendo todos submetacêntricos com tamanho total variando de 1,65 (cromossomo 1) a 0,60 μ m (cromossomos 24–25) (Tabela 4; Figura 4).

Em etapas iniciais do presente estudo, a obtenção de cromossomos profásicos e prometáfásicos de *P. flammea*, aliado ao tamanho relativamente pequeno e elevado número de cromossomos, dificultou a análise adequada do kariótipo dessa espécie (Figura 3). Diferentes trabalhos (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; RAMÍREZ- MORILLO; BROWN, 2001; COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2004; BELLINTANI; COTIAS-DE-OLIVEIRA; ASSIS, 2005; GITAÍ; HORRES; BENKO- ISEPPON, 2005; CEITA et al., 2008) têm reportado contagens cromossômicas na família Bromeliaceae baseadas em cromossomos com esse nível de compactação da cromatina e, ou, núcleos interfásicos apresentando blocos de heterocromatina. Este tipo de organização da cromatina, observada antes da prometáfase, resulta em cromossomos alongados morfologicamente inadequados para mensuramento morfométrico e montagem do kariograma.

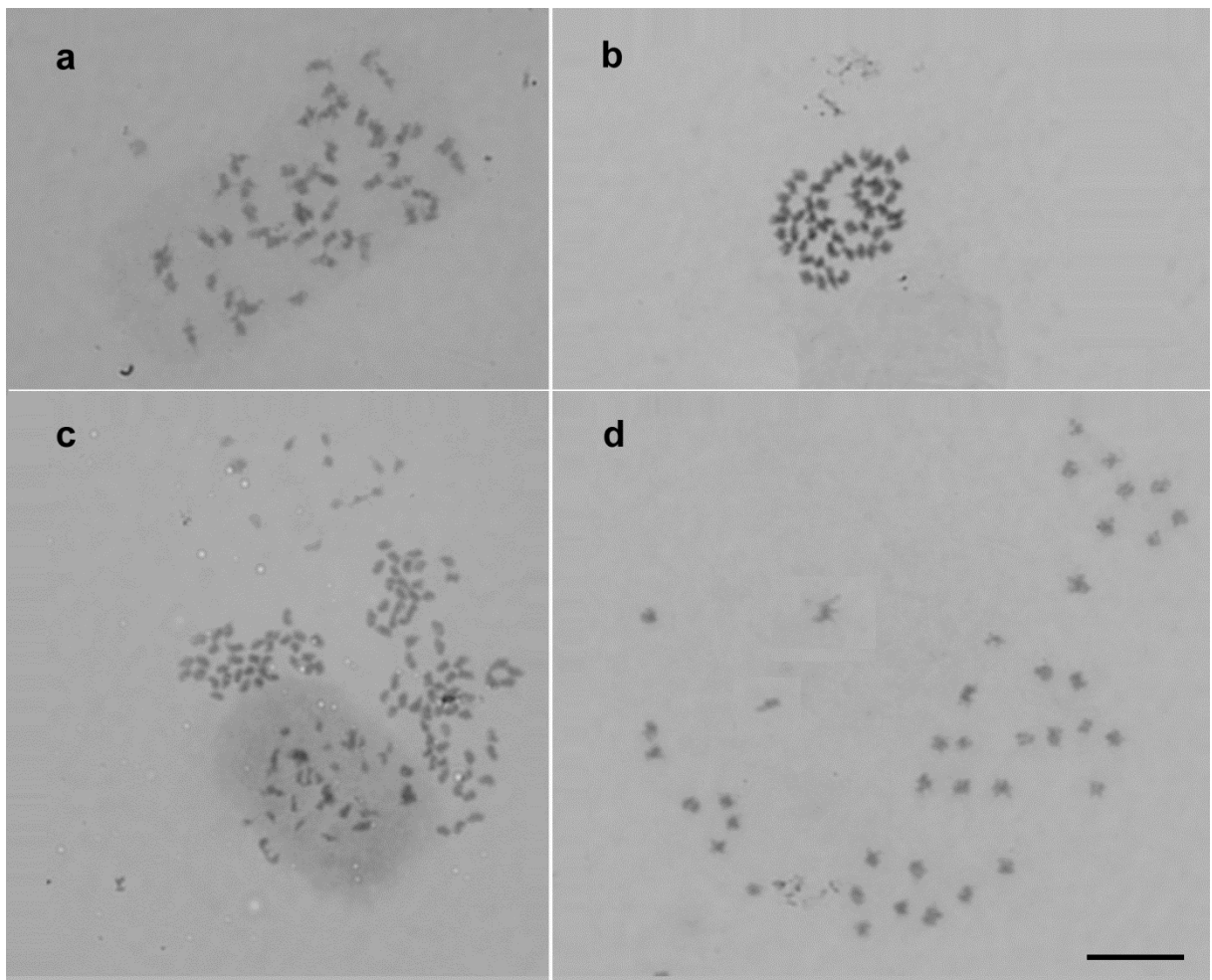


Figura 3 – Preparações citogenéticas de *P. flammea* com cromossomos em diferentes níveis de compactação da cromatina. (a) Prófase. (b) Prometáfase inicial (c) Cromossomos profásicos e prometafásicos sobrepostos. (d) Prófase evidenciando o elevado número e tamanho relativamente pequeno dos cromossomos de *P. flammea*

A ocorrência de cromossomos relativamente pequenos tem sido considerada um obstáculo para uma caracterização citogenética acurada para a maioria das espécies vegetais (CARVALHO et al., 2008). Em particular, a discriminação dos cromossomos da família Bromeliaceae é laboriosa, em virtude de serem relativamente pequenos e por apresentarem diferenças morfológicas sutis (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; PALMA-SILVA et al., 2004; GITAÍ; HORRES; BENKO-ISEPPON, 2005; CEITA et al., 2008).

Com o objetivo de caracterizar morfometricamente os cromossomos metafásicos de espécies da família Bromeliaceae, diversos autores (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; RAMÍREZ-MORILLO; BROWN, 2001; COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2004; BELLINTANI; COTIAS-DE-OLIVEIRA; ASSIS, 2005; GITAÍ; HORRES; BENKO-ISEPPON, 2005; CEITA et al., 2008) tem utilizado o agente inibidor de microtúbulos 8-hydroxyquinolina, em associação com a técnica de esmagamento de raízes. No entanto, de acordo com Carvalho, Clarindo e Almeida (2007), a técnica de esmagamento tem sido considerada imprópria para prover cromossomos metafásicos com morfologia adequada, no mesmo plano focal, sem sobreposições, vestígios citoplasmáticos ou deformações estruturais da cromatina.

O procedimento de secagem das lâminas ao ar, associado à dissociação dos meristemas macerados enzimaticamente, proveu cromossomos com constrições primárias bem definidas, sem sobreposições, deformações da cromatina ou fragmentos citoplasmáticos (Figura 4). Esse resultado foi considerado primordial para realização das análises morfométricas e, conseqüentemente, o pareamento dos cromossomos homólogos e elaboração do primeiro cariógrama mitótico de uma Bromeliaceae (Figura 4a). Essa técnica de preparo de lâmina também foi considerada importante para montagem do cariógrama de outras espécies com cromossomos relativamente pequenos, a citar: *Glycine max* Linnaeus (CLARINDO; CARVALHO; ALVES, 2007), *Paullinia cupana* Kunth. (FREITAS et al., 2007), *Jatropha curcas* L. (CARVALHO et al., 2008) e *Coffea arabica* L. (CLARINDO; CARVALHO, 2008).

A vídeo-câmera foi uma ferramenta fundamental para captura das imagens de metáfases e prometáfases com qualidade adequada para discriminação dos cromossomos. A análise digital das imagens foi primordial para as análises morfométricas, caracterização individual dos cromossomos, possibilitando a identificação dos pares de cromossomos homólogos e montagem do cariógrama (Tabela 4; Figura 4a).

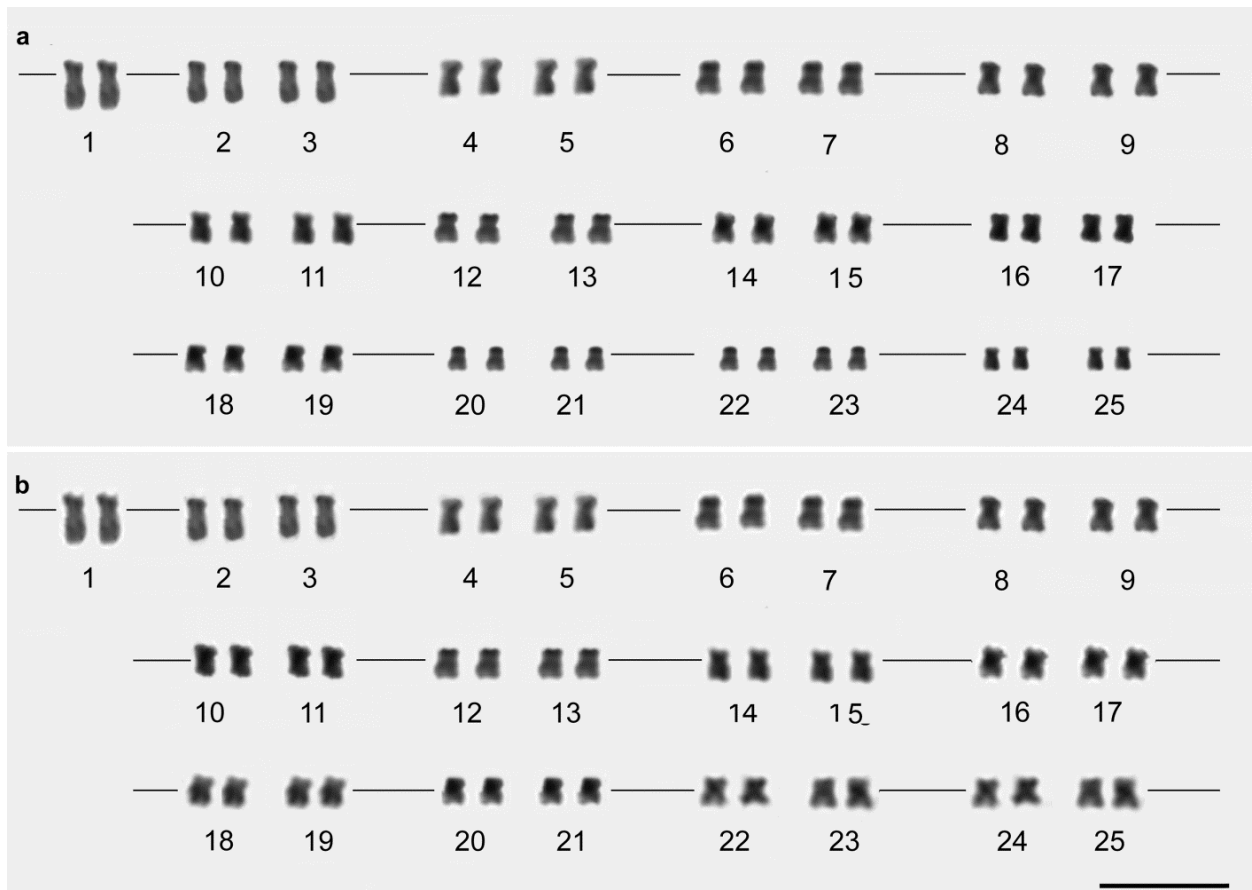


Figura 4 – Dois kariogramas de *P. flammea* distintos com relação ao nível de compactação da cromatina dos cromossomos (a) Cariograma composto por cromossomos com grau máximo de compactação da cromatina, dispendo de $2n = 50$ cromossomos, sendo todos submetacêntricos. As análises morfométricas evidenciaram um cromossomo (1) distinto morfometricamente dos demais e grupos e pares de cromossomos citogeneticamente idênticos (2–3, 4–5, 6–9, 10–17, 18–19, 20–23 e 24–25) em relação ao tamanho total, dos braços curto e longo e classe. Os cromossomos metafásicos exibiram tamanho total variando de 1,65 (cromossomo 1) a 0,60 μm (cromossomos 24–25). (b) Cariograma composto por cromossomos metafásicos em estágio inicial de compactação da cromatina, dispendo de $2n = 50$ cromossomos. Barra 5 μm

A espécie *P. flammea* ($x = 25$) teve seu número básico cromossômico reportado pela primeira vez na literatura. Dessa forma, este dado corrobora com contagens de cromossomos realizadas para a maioria das espécies de bromeliáceas (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000, 2004; RAMÍREZ-MORILLO; BROWN, 2001; COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2004; GITAÍ; HORRES; BENKO-ISEPPON, 2005; CEITA et al., 2008; LOUZADA et al., 2010). As análises morfológicas evidenciaram

grupos e pares de cromossomos citogeneticamente idênticos (2–3, 4–5, 6–9, 10–17, 18–19, 20–23 e 24–25), em relação ao tamanho total, dos braços curto e longo, e classe. Este resultado sugere uma origem poliploide para o genoma de *P. flammaea*. Baseado em observações similares, *G. max* (CLARINDO; CARVALHO; ALVES, 2007), *P. cupana* (FREITAS et al., 2007), *J. curcas* (CARVALHO et al., 2008) e *C. arabica* (CLARINDO; CARVALHO, 2008) também foram apontadas por terem uma possível origem poliploide do genoma.

Tabela 4 – Caracterização morfométrica dos cromossomos de *P. flammaea*

Cromossomo	Tamanho total (µm) ± dp	Tamanho do braço curto (µm) ± dp	Tamanho do braço longo (µm)	Classe*
1	1,65 ± 0,04	0,47 ± 0,06	1,18	SM
2 – 3	1,42 ± 0,13	0,45 ± 0,03	0,97	SM
4 – 5	1,25 ± 0,19	0,45 ± 0,05	0,80	SM
6 – 9	1,15 ± 0,05	0,41 ± 0,04	0,74	SM
10 – 17	0,98 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,65	SM
18 – 19	0,80 ± 0,08	0,30 ± 0,01	0,50	SM
20 – 23	0,74 ± 0,11	0,23 ± 0,02	0,51	SM
24 – 25	0,60 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,37	SM

dp – desvio padrão, SM submetacêntrico.

*A classe foi determinada pelo índice centromérico e a razão entre os braços (braço curto/braço longo).

No cariógrama de *P. flammaea* (Figura 4), grupos de dois (2–3, 4–5, 18–19 e 24–25), quatro (6–9 e 20–23) e oito (10–17) cromossomos sugerem uma origem poliploide para o genoma dessa espécie. A poliploidia é um fenômeno comum na evolução das plantas, sendo considerada um mecanismo importante para especiação, em escalas temporais, do antigo ao contemporâneo e com profundos efeitos na ecologia e biologia molecular (ADAMS; WENDEL, 2005; MADLUNG; WENDEL, 2013). Além disso, estima-se que cerca de 80% das espécies de angiospermas podem ter passado por um episódio de poliploidização durante a evolução (MASTERSON, 1994). De acordo com Soltis et al. (2009), embora as duplicações no genoma sejam fenômenos frequentes em angiospermas, o número exato e a colocação filogenética da maioria destes acontecimentos continuam incerto.

A presença do cromossomo 1 diferente morfometricamente de todos os outros no cariótipo de *P. flammaea* indica uma possível origem alopoliploide para o genoma dessa espécie, uma vez que esse cromossomo não é citogeneticamente idêntico a nenhum outro. Brown e Gilmartin (1989) sugeriram um modelo de evolução do genoma das espécies da família Bromeliaceae baseado no número cromossômico $2n = 50$. Esses autores propuseram que o número básico da família Bromeliaceae, $x = 25$ cromossomos, teria derivado de uma hibridação entre espécies paleo-diploides com $x = 8$ e $x = 9$, seguido de duplicação cromossômica (poliploidização) gerando um paleo-alotetraploide com $x = 17$. Posteriormente, uma hibridação entre o paleo-alotetraploide e o paleo-diploide, com $x = 8$, poderia ter resultado em um paleo-alohexaploide com $x = 8 + 8 + 9 = 25$, o então número base da família Bromeliaceae (Figura 1).

Considerando a presença de grupos de pares de cromossomos citogeneticamente idênticos no cariótipo de *P. flammaea*, pode-se inferir que o número básico da família Bromeliaceae não é $x = 25$ cromossomos. Além disso, a presença do cromossomo 1 isolado sugere uma origem alopoliploide para o genoma dessa espécie.

5 Conclusões

A metodologia aplicada na CF foi adequada, uma vez que gerou núcleos estequiometricamente corados e intactos para análise, resultando em CV inferiores a 5%. Assim, determinou-se, pela primeira vez na literatura, o conteúdo de DNA nuclear de *P. flammaea*. Além disso, constatou-se que o genoma dessa espécie é relativamente pequeno se comparado com a maioria das Angiospermas e que seu valor 2C nuclear, assim como a composição de bases AT e GC, se aproximam da média das bromeliáceas e do gênero *Pitcairnia*.

Apesar do tamanho relativamente pequeno dos cromossomos, a metodologia citogenética adotada, possibilitou o estabelecimento do primeiro cariograma de uma

Bromeliaceae. As análises morfométricas do cariótipo de *P. flammea*, possibilitaram identificar grupos de dois, quatro e oito cromossomos citogeneticamente idênticos e um cromossomo diferente morfometricamente de todos os outros. A partir desses dados, sugeriu-se uma origem aloploidioide para o genoma de *P. flammea*.

Dessa forma, foi possível ampliar as informações acerca da evolução do de *P. flammea* e do número cromossômico básico do grupo, revelando citogeneticamente, evidências de um processo de poliploidização na família Bromeliaceae.

6 Referências

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. n. 8, p. 135–141, 2005.

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.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 9, p. 208–218, 1991.

BARFUSS, M. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily tillesioideae (bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**. v. 92, n. 2, p. 337–351, 2005.

BELLINTANI, M. C; COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P.; ASSIS, J. G. A. Chromosomal Evolution of Bromeliaceae. **Cytologia**. n. 70, p. 129-133, 2005.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**. n. 107, p. 467-590, 2011.

BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**. n. 76, p. 657–665, 1989.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin being pattern revealed by modified HKG being technique for maize chromosomes. **Heredity**. n. 70, p. 515-519, 1993.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA L. S. High-resolution HKG-being in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**. n. 110, p. 417-420, 1997.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; ALMEIDA, P. M. Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. **The Nucleus**. n. 50, p. 453-462, 2007.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**. n. 174, p. 613-617, 2008.

CEITA, G. O.; ASSIS, J. G. A.; GUEDES, M. L. S.; COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. C. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. n. 158, p. 189-193, 2008.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. **Plant Systematics and Evolution**. n. 274, p. 237-241, 2008.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO C. R.; ALVES, B. M. G. Mitotic evidence for the tetraploid nature of *Glycine max* provided by high quality karyograms. **Plant Systematics and Evolution**. v. 265, p. 101-107, 2007.

COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P.; ASSIS, J. G. A.; BELLINTANI, M. C.; ERADE, J. C. S.; GUEDES, M. L. S. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**. n. 23, p. 173-177, 2000.

COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P.; ASSIS, J. G. A.; CEITA, O.; PALMEIRA, A. C. L.; GUEDES, M. L. S. Chromosome number for Bromeliaceae species occurring in Brazil. **Cytologia**. n. 69, p. 161-166, 2004.

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S.: Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Plant Physiology**. n. 85, p. 625-631, 1992.

DOLEŽEL, J.; GOHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melium album* and *M. rubum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**. v. 19, p.103-106, 1995.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA and genome size of trout and human. **Cytometry**. n. 51, p. 127-128, 2003.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99–110, 2005.

EBERT, I.; TILL, W. Nuclear genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus *Pitcairnia*. Abstracts, Angiosperm Genome Size Discussion Meeting. p. 15. **Royal Botanical Gardens, Kew**. p. 11–12, 1997.

FAVORETO, F. C.; CARVALHO, C. R.; LIMA, A. B. P.; FERREIRA, A.; CLARINDO, W. R. Genome size and base composition of Bromeliaceae species assessed by flow cytometry. **Plant Systematics and Evolution**., 2012.

FREITAS, D. V.; CARVALHO, C. R.; FILHO, F. J. N.; ASTOLFI-FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* 'Sorbilis'). **Journal of Plant Research**. v.120, p. 399-404, 2007.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**. n. 220, p. 1049-1051, 1983.

GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. **Plant Systematics and Evolution**. n. 253, p. 65-80, 2005.

GIVNISH, T. J.; MILLAN, K. C.; BERRY, P. E.; STYSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**. n. 23, p. 3-26, 2007.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B. V.; RIINA, R.; SCHULTE K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W. ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**. v. 5, n. 98, p. 000–000, 2011.

JOHNSTON, J. S.; BENNETT, M. D.; RAYBURN, A. L.; GALBRAITH, D. W.; PRICE, H. J. Reference standard for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**., v. 86, p. 609-613, 1999.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**. n. 98, p. 679:689 2006.

LOUZADA, R. B.; PALMA-SILVA, C.; CORRÊA, A. M.; KALTCHUK-SANTOS, E.; WEERLEY, M. G. L. Chromosome number of *Orthophytum* species (Bromeliaceae). **Kew Bulletin**. v. 65, p. 53-58, 2010.

MADLUNG, A.; WENDEL, J. F. Genetic and Epigenetic Aspects of Polyploid Evolution in Plants. **Cytogenetic and Genome Research** v. 1, p. 1-16, 2013.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**. n. 264, p. 421–423, 1994.

MEISTER, A. Calculation of binding length of base-specific DNA dyes by comparison of sequence and flow cytometric data. Application to *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Theoretical Biology**. n. 232, p. 93-97, 2005.

MEISTER, A; BAROW, M. DNA base composition of plant genomes. In: Doležel, J. Greilhuber, J., Suda, J. (ed.): Flow cytometry with Plant Cells. p. 177–215, Wiley - VCH2 – Weinheim, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant.** n. 15, p. 473–497, 1962.

OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In *Methods in cell biology*, vol. 33. Edited by Z. Darzynkiewicz, H.A. Crissman and J.P. Robinson. San Diego: **Academic Press**, pp. 105-110, 1990.

PALMA-SILVA, C.; SANTOS, D. G.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Botany.** n. 91, p. 804-807, 2004.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; CRUZ, C. D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. **Plant Cell Reports.** n. 30, p. 1183-1191, 2011a.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. **Plant Cell Reports.** n. 30, p. 2303–2312, 2011b.

RAMÍREZ-MORILLO, I. M.; BROWN, G. K. The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). **Systematic Botany.** n. 26, p. 722-726, 2001.

SGORBATI, S.; LABRA, M.; GRUGNI, E.; BARCACCIA, G.; GALASSO, G.; BONI, U.; MUCCIARELLI, M.; CITTERIO, S.; IRAMÁTEGUI, A. B.; GONZALES, L. V.; SCANNERINI, S. A. Survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. **Plant Biology.** n. 6, p. 222-230, 2004.

SHAPIRO, H. M. Practical Flow Cytometry nuclear isolation buffers for plant DNA. **Annals of Botany.** n. 98, p. 679-689, 2003.

SOLTIS, D. E.; ALBERT, V. A.; MACK, J. L.; BELL, C. D.; PATERSON, A. H.; SANKOFF, C.; PAMPHILIS, C. W.; WALL, P. K.; SOLTIS, P. S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany.** v. 96, n. 1, p. 336–348, 2009.

VERSIEUX, L. M. Sistemática, Filogenia e Morfologia de Alcantarea (Bromeliaceae). Tese (Doutor em Botânica). Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2009.

ZONNEVELD, B. J. M.; LEITCH, I. J.; BENNET, D. First nuclear DNA amounts in more than 300 Angiosperms. **Annals of Botany**. v. 96, p. 229–244, 2005.