

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**LUCAS ALEXANDRE DE SOUZA COSTA**

**PRIMEIRA LISTA DE PLANTAS TROPICAIS PROPOSTAS COMO PADRÕES  
DE REFERÊNCIA PARA ESTIMATIVA DE TAMANHO DO GENOMA POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

Recife  
2018

**LUCAS ALEXANDRE DE SOUZA COSTA**

**PRIMEIRA LISTA DE PLANTAS TROPICAIS PROPOSTAS COMO PADRÕES  
DE REFERÊNCIA PARA ESTIMATIVA DE TAMANHO DO GENOMA POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal

**Área de Concentração:** Sistemática e Evolução

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza (Depto. de Botânica, UFPE)

Recife  
2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Costa, Lucas Alexandre de Souza

Primeira lista de plantas tropicais propostas como padrões de referência para estimativa de tamanho do genoma por citometria de fluxo / Lucas Alexandre de Souza Costa - 2019.

84 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Gustavo Rodrigues Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Plantas tropicais 2. Citometria de fluxo 3. Estabilidade cariotípica  
I. Souza, Luiz Gustavo Rodrigues (orient.) II. Título

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-048

LUCAS ALEXANDRE DE SOUZA COSTA

**PRIMEIRA LISTA DE PLANTAS TROPICAIS PROPOSTAS COMO PADRÕES  
DE REFERÊNCIA PARA ESTIMATIVA DE TAMANHO DO GENOMA POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Sistemática e Evolução, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em: 27/02/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Ana Paula de Moraes (Examinadora Externa)  
Universidade Federal do ABC

---

Profa. Dra. Andrea Pedrosa Harand (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

***Dedico mais esta vitória aos melhores  
pais do mundo, Maria e Alexandre,  
e ao meu Padrinho Belo, o maior  
guerreiro que já passou por esta terra!***

## AGRADECIMENTOS

Um cientista precisa ser curioso, foi o que sempre me disseram. E, curiosamente (rs), curiosidade é o que me faz ir ao laboratório todos os dias e buscar dar o melhor de mim, independente de quão ruim esteja o dia. Mas claro, a curiosidade apenas não seria suficiente para me manter nessa jornada. Para isso, eu tive todos vocês a quem queria agradecer nesse momento.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco pelas oportunidades e especialmente a todos os funcionários e professores do PPGBV pela sua disposição e profissionalismo.

Ao Gustavo por, de alguma forma, ter visto algo em mim na graduação quando nem eu mesmo conseguia entender o que eu queria da vida. Obrigado por tentar tirar o melhor de mim sempre e acreditar no meu potencial. Você é um ORIENTADOR em letras garrafais e em todos os sentidos da palavra!

Aos outros professores do laboratório, Marcelo Guerra e Andrea Pedrosa-Harand, sem sombra de dúvidas as pessoas mais inteligentes que eu conheço. Além de ter aprendido muito sobre ciência, conversar sobre cinema com Marcelo e sobre política com Andrea é sempre um prazer. Tem sido uma honra e um grande aprendizado compartilhar esta jornada com vocês, muito obrigado.

A todos os parceiros na pesquisa que tornaram este trabalho possível, especialmente ao Nataniel pela sua disponibilidade e prontidão.

Às minhas queridas “lazarentas” por compartilhar cada momento do mestrado comigo: Amanda, com sua doçura cavalgar, a pessoa mais direta e sem frescura que conheço; Amália, por ser, da forma mais esquisita e engraçada, praticamente uma irmã pra mim (irmã que não posso dar cascudos, infelizmente) e Brena, minha “miga”, pelos seus guinchados e carinho, e por ser provavelmente uma das pessoas que melhor me entende e me atura neste laboratório. Amo vocês demais!

A todos os outros colegas do laboratório por me ajudarem e trazerem alegria pra minha vida todos os dias: Mari, Mariela e Pablo, os argentinos que me fizeram amar a argentina! Tiago Espósito, o hidrogênio da tabela periódica, pelas conversas cabeça e superengraçadas; Duda, André, Ribeirão e Sandra, por compartilharem sua experiência no lab (não estou chamando de velhos ein, talvez só Sandra). Paulo, Ana, Gean e Helbert, desafio qualquer um a achar um grupo de ICs mais

inteligentes, interessados e legais! Desculpa a todos que esqueci, todo mundo que passou nesse laboratório foi importante pra mim!

Aos meus amigos pra vida, Klaiton e Antonio. Vocês são parte disso, obrigado pelo apoio, pelas discussões filosóficas e pelo monte de besteira que a gente conversou nesses 10 anos de amizade!

Queria agradecer a minha vó Celina, meu padrinho Belo e a todos os meus tios e tias que acreditaram em mim e sempre insistiram em me chamar de “Dr. Lucas” antes mesmo de eu me formar na graduação. Um dia chego lá!

Aos meus sogros, Alberto e Etiene. O casal mais apaixonado em linha reta do mundo! Em outros idiomas, é comum chamar os sogros de “pai” e “mãe”. É isso que vocês são para mim! Amo muito vocês.

Aos meus avós adotivos, dona Ilza e Seu Cordeiro. Desde o primeiro dia que Yhanndra me levou pra conhecer essas figuras, meu amor por eles só cresce, e sei que é recíproco!

Meu tio Nando, um dos meus maiores exemplos de vida. Obrigado por tudo que o senhor fez por mim, eu com certeza não estaria aqui hoje sem sua ajuda e seus conselhos.

Minha irmã Érica, por todo carinho e amor, e por ter literalmente pago pela minha educação quando eu era criança. Sem você, nada disso seria possível!

Meu irmão Evaldo, por acreditar tanto em mim e muitas vezes ficar tão feliz quanto eu por minhas conquistas!

Aos meus pais, Maria e Alexandre. Tudo que eu sei hoje sobre ciência é pouco comparado ao que vocês me ensinaram. Vocês me ensinaram como viver, me ensinaram como eu posso mudar a vida das pessoas ao meu redor e deixar alegria por onde passar. Eu me sinto o filho mais amado do mundo todos os dias quando penso nos sacrifícios que vocês fizeram por mim. Eu amo vocês mais do que tudo nessa vida! Isso aqui é para vocês.

Por último, mas não menos importante... Achou que eu ia esquecer de você? Achou errado, LINDA! Para o meu amor, a mulher que me acompanha à seis anos e meio, entre trancos e barrancos, sempre me amando e cuidando de mim. Yhanndra, essa é mais uma conquista que conseguimos JUNTOS! Mais uma de muitas que já conseguimos e que ainda conseguiremos. Eu te amo, eu amo tudo em você e tudo que você é! *You are the sunshine of my life!*

## RESUMO

A citometria de fluxo é o método mais utilizado para quantificação do tamanho do genoma em plantas. O protocolo é baseado na comparação entre a fluorescência média de núcleos corados de uma espécie alvo e um padrão interno com tamanho do genoma conhecido. Os padrões internos tradicionalmente utilizados, propostos principalmente por laboratórios europeus, são cultivares de plantas adaptadas ao clima temperado (por ex., *Raphanus sativus* L. cv. 'Saxa', *Glycine max* L. cv. 'Polanka'). A aquisição, propagação e desenvolvimento destas cultivares em laboratórios localizados em regiões tropicais ainda é um desafio para o desenvolvimento da citometria de fluxo em uma escala global. Neste estudo, é apresentada uma lista de padrões internos composta por cultivares brasileiros de plantas comerciais. Estas plantas tiveram seu tamanho do genoma estimado por citometria de fluxo utilizando três diferentes tampões: *LB01*, *Marie* e *WPB*. Foram checadas estatisticamente a qualidade dos histogramas, variação entre medições e repetitividade dos valores estimados. Também foram realizadas análises citogenéticas para avaliar a estabilidade cariotípica das cultivares selecionadas. Por fim, nós recomendamos como uma nova lista de padrões internos para citometria de fluxo: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai cv. Crimson Sweet ( $2C = 0,87$  pg), *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. BRS Pujante ( $2C = 1,36$  pg), *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. IPA-6 ( $2C = 2,05$  pg), *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss cv. Graúda ( $2C = 4,15$  pg), *Allium cepa* L. cv. IPA-11 ( $2C = 35,22$  pg), e *Nothoscordum pulchellum* Kunth ( $2C = 49,09$  pg). Este último não é uma planta cultivada, mas pode ser importante como padrão para análise de genomas gigantes (ex: Amaryllidaceae, Loranthaceae etc.). Como as regiões tropicais detém a maior biodiversidade vegetal, esta lista é uma ferramenta útil para o aumento no número de espécies com conteúdo de DNA quantificado em biomas tropicais.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Plantas tropicais. Padrões internos. Tamanho do genoma. Estabilidade cariotípica.

## ABSTRACT

Flow cytometry is the most widely used method for genome size quantification in plants. The protocol is based on the comparison between the mean fluorescence of stained nuclei of a target specie and an internal standard with known genome size. The traditionally used internal standards, proposed mainly by European Labs, are cultivars of temperate plants (for ex., *Raphanus sativus* L. cv. 'Saxa', *Glycine max* L. cv. 'Polanka'). The acquisition, propagation and development of these cultivars in laboratories based on tropical regions is still a challenge for the development of flow cytometry on a global scale. In this study, we present a list of internal standards composed by Brazilian cultivar of crop plants. These plants had their genome size estimated by flow cytometry using three different buffers: *LB01*, *Marie* and *WPB*. We checked the quality of the histograms, variation between measurements, and repeatability of the values estimated by a statistical approach. We also undertake cytogenetic analysis in order to evaluate karyotype stability of the selected cultivars. In the end, we recommend as a new set of internal standards for flow cytometry: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai cv. Crimson Sweet (2C = 0,87 pg), *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. BRS Pujante (2C = 1,36 pg), *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. IPA-6 (2C = 2,05 pg), *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss cv. Graúda (2C = 4,15 pg), *Allium cepa* L. cv. IPA-11 (2C = 35,22 pg), and *Nothoscordum pulchellum* Kunth (2C = 49,09 pg). The last one is not a cultivated plant, but may be an important standard for analysis of giant genomes (ex: Amaryllidaceae, Loranthaceae etc.). As the tropical region holds the greatest vegetal biodiversity, this list is a useful tool and can increase the number of species with the estimated DNA content in tropical biomes.

Keywords: Flow cytometry. Tropical plants. Internal standards. Genome size. Karyotype stability.

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                       |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                               | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                    | <b>13</b> |
| 2.1      | TAMANHO DO GENOMA .....                                                                                               | 13        |
| 2.1.1    | Histórico e terminologia.....                                                                                         | 13        |
| 2.1.2    | O enigma do valor-C.....                                                                                              | 14        |
| 2.2      | CITOMETRIA DE FLUXO.....                                                                                              | 15        |
| 2.2.1    | Histórico e Aplicações .....                                                                                          | 15        |
| 2.2.2    | Tampões.....                                                                                                          | 18        |
| 2.2.3    | Fluorocromos .....                                                                                                    | 19        |
| 2.2.4    | Padrões internos para citometria de fluxo .....                                                                       | 20        |
| 2.2.4.1  | Requisitos para padrões internos .....                                                                                | 21        |
| 2.2.4.2  | Listas de padrões internos.....                                                                                       | 23        |
| 2.3      | VARIABILIDADE DO TAMANHO DO GENOMA EM PLANTAS .....                                                                   | 25        |
| 2.3.1    | Poliploidia .....                                                                                                     | 26        |
| 2.3.2    | DNA repetitivo.....                                                                                                   | 26        |
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                | <b>28</b> |
| 3.1      | FIRST SET OF TROPICAL PLANTS PROPOSED AS REFERENCE<br>STANDARDS FOR GENOME SIZE ESTIMATION BY FLOW CYTOMETRY<br>..... | 28        |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                               | <b>78</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                               | <b>79</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O tamanho do genoma, termo utilizado para denominar a quantidade de DNA presente no núcleo, é um aspecto que vem intrigando pesquisadores mesmo antes destes possuírem um maior entendimento sobre a molécula de DNA (SWIFT, 1950). A constância inicialmente observada para este caráter dentro de uma mesma espécie levou à criação do termo ‘valor-C’ para se referir ao tamanho do genoma (revisado por Pellicer e Leitch, 2014). Tal constância foi imediatamente contrastada com a alta variabilidade de tamanhos do genoma entre diferentes grupos de organismos (KULLMAN; TAMM; KULLMAN, 2005; BENNETT; LEITCH, 2012; GREGORY, 2018). Somado à esta variabilidade estava o fato de que a quantidade de DNA não apresentava correlação direta com a complexidade do organismo (THOMAS, 1971). Este “paradoxo do valor-C”, como ficou conhecido, foi uma das principais forças motoras para os primeiros estudos de evolução do tamanho do genoma (GREGORY, 2005). A descoberta de que grande parte do genoma dos eucariotos é composto por DNA repetitivo (em sua maioria não codificante) de certa forma respondeu o paradoxo do valor-C, mas as questões relacionadas à origem e razão desta variabilidade ainda persistem (ELLIOTT; GREGORY, 2015).

As primeiras quantificações de DNA em plantas já demonstravam uma alta variabilidade para esse caráter, com gêneros apresentando variações marcantes de até 80 vezes entre cariótipos semelhantes (ROTHFELS et al., 1966). Atualmente, Embryophyta se destaca por ser o grupo com a maior variabilidade relatada de tamanhos de genoma, diferindo em aprox. 2000 vezes entre o menor (*Genlisea margaretae*, 1C = 0,06 pg) (GREILHUBER et al., 2006) e maior genoma reportado (*Paris japonica*, 1C = 152,23 pg) (PELLICER; FAY; LEITCH, 2010). Desta forma, a necessidade de estudos sobre o papel da variabilidade do tamanho do genoma no sucesso evolutivo e plasticidade ecológica das plantas vêm crescendo, e com ela cresce a demanda por melhorias metodológicas nas técnicas de quantificação do DNA (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010).

Procedimentos químicos complexos e reações de reassociação cinética foram as primeiras metodologias empregadas na quantificação de DNA, mas por serem laboriosos e imprecisos esses métodos restringiram os primeiros estudos sobre tamanho do genoma (BOIVIN; VENDRELY; VENDRELY, 1948; VENDRELY; VENDRELY, 1948). Os avanços na microscopia ajudaram a popularizar a análise

de imagens por microdensitometria Feulgen como uma metodologia confiável para a quantificação de DNA (DEELEY, 1955). Anos mais tardes, o advento da citometria de fluxo permitiu a análise de milhares de núcleos em poucos minutos, trazendo praticidade aos estudos sobre tamanho do genoma (EISERT; OSTERTAG; NIEMANN, 1975). A citometria de fluxo se baseia na análise de partículas coradas que são submetidas à um laser ao passarem por um fluxo hidrodinâmico, gerando leituras de fluorescência analisadas por um software de computador (SHAPIRO, 2003). Em plantas, a citometria só começou a ser utilizada para medições do genoma após Galbraith et al. (1983) desenvolverem um revolucionário procedimento de isolamento de núcleos. O protocolo baseia-se no corte (*chopping*) de material vegetal (de preferência folhas jovens) imerso em um tampão de isolamento de núcleos e a posterior filtragem e coloração da amostra com um fluorocromo intercalante ao DNA (revisado por Pellicer e Leitch, 2014). Esta amostra é posteriormente levada ao citômetro de fluxo, que gera histogramas baseados na fluorescência emitida pelos núcleos corados. Estes valores de fluorescência relativa só podem ser interpretados como quantidade de DNA mediante comparação com uma espécie com tamanho do genoma conhecido, chamada padrão interno (DOLEŽEL; SGOBATTI; LUCRETTI, 1992). Estes padrões internos devem seguir algumas recomendações importantes, como propagação por sementes de fácil aquisição, serem cultivares bem estabelecidas no mercado e adequadas ao protocolo de citometria de fluxo, entre outros (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). Além disso, é importante que estas espécies apresentem baixa ou nenhuma variabilidade intraespecífica e um cariótipo bem caracterizado, sem a presença de cromossomos B, endopoliploidia ou outras anomalias que possam gerar valores controversos de quantidade de DNA (SUDA; LEITCH, 2010).

Devido à erros de linearidade, o tamanho do genoma de um padrão interno utilizado não deve diferir mais do que três vezes do tamanho da espécie alvo (PELLICER; LEITCH, 2014). Por conta disso, listas de espécies foram propostas como padrões internos cobrindo uma ampla faixa de tamanhos do genoma (BENNETT; SMITH, 1991; DOLEŽEL et al., 1998; JOHNSTON et al., 1999). Estas listas são em sua maioria compostas por cultivares europeias adaptadas a regiões de clima temperado. Já que grande parte da biodiversidade vegetal está concentrada nas regiões tropicais, avanços nos estudos sobre tamanho do genoma realizados nestas regiões pode levar a um aumento no total de espécies de plantas

com genoma quantificado (BENNETT; LEITCH, 2011). Sendo assim, o estabelecimento de novos padrões melhor adaptados a regiões tropicais facilitará a obtenção de novas aquisições, pelo menos do ponto de vista metodológico. Desta forma, este trabalho tem como objetivo a elaboração de uma lista de padrões internos para quantificação do genoma por citometria de fluxo baseada em espécies cultivadas em regiões tropicais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TAMANHO DO GENOMA

#### 2.1.1 Histórico e terminologia

Antes mesmo do revolucionário estudo de Watson, Crick e Rosalind sobre a estrutura da molécula de DNA (WATSON; CRICK, 1953), pesquisadores já mostravam interesse pela quantidade de material genético presente nos genomas das espécies (SWIFT, 1950). Os primeiros estudos envolvendo quantificação de DNA aconteceram no final da década de 1940, envolvendo diferentes tecidos bovinos (BOIVIN; VENDRELY; VENDRELY, 1948; VENDRELY; VENDRELY, 1948), sendo que em plantas, a primeira espécie a ter seu conteúdo de DNA quantificado foi *Lilium longiflorum* Thunb. (OGUR et al., 1951). Apesar disso, o termo “tamanho do genoma” foi usado pela primeira vez apenas na década de 1970, no título do trabalho de Hinegardner (1976), sendo substituído por “conteúdo de DNA” ao longo do texto. Tradicionalmente, o genoma pode ser medido em picogramas (pg,  $1 \times 10^{-12}$ g) ou em pares de base (1 pg = 978 Mpb) (DOLEŽEL; BARTOS, 2005).

A primeira definição para o termo “genoma” fazia menção apenas ao conteúdo de DNA presente no conjunto cromossômico monoplóide não-replicado (WINKLER, 1920). Esta definição, por sua vez, implicaria que organismos poliploides (indivíduos que tenham passado por uma ou mais duplicação do conjunto cromossômico) teriam mais de um genoma, causando debate quanto a utilização do termo “tamanho do genoma” (GREILHUBER, 2005). Por exemplo, em diferentes situações a expressão “tamanho do genoma” foi usada tanto para se referir ao conteúdo de DNA presente no conjunto cromossômico monoplóide ( $x$ ) de uma espécie (BENNETT, 1998) quanto ao conteúdo total de DNA do complemento cromossômico holoplóide não-replicado encontrado em um único núcleo ( $n$ ) (GREGORY; HEBERT, 1999). Tendo em vista este problema, Greilhuber (2005) sugeriu que “tamanho do genoma” pode ser utilizado de uma forma mais geral, sendo necessária especificidade no texto, principalmente ao se tratar de organismos poliploides.

O termo “valor-C”, por sua vez, foi usado primeiramente por Swift (1950), referindo-se às diferentes “classes” de conteúdo de DNA observadas em diferentes

tecidos de plantas. Desde então, o termo foi popularizado como uma forma não-ambígua de se referir ao conteúdo de DNA do genoma presente no conjunto cromossômico  $n$ . Junto ao valor-C, surgiram outros termos populares, tais como: 2C, ou conteúdo de DNA em um núcleo diploide não replicado com número cromossômico  $2n$ ; 1C, ou conteúdo de DNA em um núcleo haploide com número cromossômico  $n$  e 1Cx, ou conteúdo de DNA esperado em apenas um complemento cromossômico de um poliplóide (GREILHUBER, 2005). Segundo o próprio Swift [comunicação pessoal com Bennett e Smith (1976)], a letra 'C' em valor-C faz referência a constância observada no conteúdo de DNA entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Esta constância, inicialmente observada por Vendrely e Vendrely (1948) teve grande importância como suporte às primeiras hipóteses sobre o papel hereditário do DNA. Porém, ao passo que novas espécies tinham seu conteúdo de DNA estimado, tal estabilidade não se refletia a nível interespecífico (EDDY, 2012).

### 2.1.2 O enigma do valor-C

Mesmo nos estudos pioneiros sobre tamanho do genoma entre as décadas de 1940 à 1960, a variabilidade marcante entre conteúdo de DNA de diferentes grupos de organismos já intrigava pesquisadores (EDDY, 2012). Mirsky (1951) já relatava uma variação de até 1.500 vezes entre genomas de invertebrados. Em plantas, uma variação de 80 vezes foi observada em espécies com cariótipos semelhantes ( $n = 7, 8$  e  $9$ ) dentro de um mesmo gênero de Ranunculaceae (ROTHFELS et al., 1966). A maior questão oriunda desta variação era a ausência de uma correlação entre conteúdo de DNA e complexidade dos organismos, questão a qual Thomas (1971) nomeou como “paradoxo do valor-C” em revisão sobre o tema.

Nos primeiros esforços para a resolução deste paradoxo, pesquisadores tentavam encontrar uma razão adaptativa para o acúmulo de DNA. A principal teoria dizia que apenas uma fração do DNA era responsável pela codificação de genes, enquanto que o acúmulo de DNA “extra” serviria à outras funções adaptativas, como estrutura nuclear (GREGORY, 2005). Esta teoria apresentava um problema ao se observar que organismos próximos podiam apresentar diferenças substanciais no conteúdo de DNA (EDDY, 2012). Isso levou à popularização do termo “DNA lixo”, que seria um DNA sem valor adaptativo acumulado em diferentes quantidades nos

diferentes organismos (OHNO, 1972).

Com os constantes avanços na genômica, foi possível elucidar parte do paradoxo do valor-C, graças à compreensão de que boa parte do DNA é formado por sequências repetitivas não-codificantes (BRITTEN; KOHNE, 1968). Desta forma, o que era conhecido como paradoxo passou a ser chamado de “enigma do valor-C”, já que inúmeras questões acerca da variabilidade do tamanho do genoma ainda persistem (GREGORY, 2001). Apesar de tanto a solução do paradoxo quanto as questões presentes por este enigma serem universais à todos os genomas eucariotos, diferentes grupos de organismos apresentam particularidades quanto à variabilidade do tamanho do genoma (GREGORY, 2005).

## 2.2 CITOMETRIA DE FLUXO

### 2.2.1 Histórico e Aplicações

As primeiras quantificações de DNA focavam no isolamento químico de componentes nucleares de grandes quantidades de tecido animal/vegetal (BOIVIN; VENDRELY; VENDRELY, 1948; SCHMIDT; THANNHAUSER, 1945). Anos mais tarde, um maior entendimento sobre a estrutura do DNA proporcionou a estimativa de seu conteúdo mediante a observação da reassociação entre fitas de DNA marcadas radioativamente (BRITTEN; KOHNE, 1968). A principal problemática dos procedimentos químicos se dava pelo fato de que os tecidos utilizados apresentavam células em diferentes estágios do ciclo celular, com diferentes quantidades de DNA nuclear. No caso da reassociação, a presença de DNA repetitivo dificultava a interpretação dos resultados. Desta forma, os valores médios obtidos por estes métodos não eram representativos do real valor-C destas espécies (DOLEŽEL; BARTOS, 2005).

Os avanços na microscopia e análise de imagens levaram a criação dos primeiros microdensitômetros, aparelhos capazes de integrar e interpretar informações sobre a luz barrada por células analisadas em um microscópio de campo claro (DEELEY, 1955). Para a determinação do conteúdo nuclear, estas células eram coradas pelo método Feulgen, que utiliza um corante específico para DNA conhecido como reagente de Schiff ou fucsina ácida (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924). Por muitos anos, a microdensitometria por Feulgen foi

considerado o método mais acurado para a determinação de conteúdo de DNA, já que, diferente dos métodos químicos e de reassociação, permitia identificar células com diferentes “classes” de conteúdo de DNA (SWIFT, 1950). Nas primeiras grandes listas de valor-C para espécies de plantas, a microdensitometria por Feulgen sempre aparecia como o método mais utilizado (BENNETT; SMITH, 1976, 1991). Apesar de sua acurácia quando comparada aos métodos químicos, diferenças metodológicas relacionadas ao fixador utilizado e tempo de lavagem pós-hidrólise podem levar a diferenças substanciais nas estimativas de conteúdo de DNA (GREILHUBER, 2005). Além disso, a aquisição de dados por microdensitometria é relativamente lento (MICHAELSON et al., 1991). Com a crescente demanda por estudos sobre tamanho do genoma, crescia também a necessidade de uma metodologia mais rápida e mais acurada que a microdensitometria.

A citometria de fluxo surgiu durante a segunda guerra mundial, como forma de detectar micropartículas potencialmente nocivas em aerossóis, bem como para testar a eficiência de máscaras de gás (GUCKER; O'KONSKI, 1947). A citometria de fluxo baseia-se na análise da fluorescência emitida por partículas (geralmente células, protoplasmas ou núcleos) submetidas à um sistema de fluxo por fluidos. Essa fluorescência gera sinais eletrônicos que são convertidos em sinais digitais e exibidos na forma de gráficos, sejam histogramas ou *dotplots* (SHAPIRO, 2003). Antes dos primeiros protocolos para planta serem desenvolvidos, o conteúdo de DNA de animais já era quantificado por esta técnica (EISERT; OSTERTAG; NIEMANN, 1975). O protocolo usado em animais não gerava bons resultados em plantas, visto que células vegetais não reagem bem aos procedimentos químicos usados para romper a membrana celular (SHAPIRO, 2003). Além disso, a célula vegetal possui componentes autofluorescentes que não estão presentes nas células animais, tornando a análise de protoplastos vegetais problemática (DOLEŽEL, 2005).

Galbraith et al. (1983) foram os primeiros a superar a dificuldade do isolamento do núcleo da célula vegetal para a quantificação por citometria de fluxo. Neste trabalho foi apresentado um método inovador, porém bastante simples que envolvia o corte (*chopping*) de uma pequena quantidade de tecido foliar (geralmente 10-20 mg) em um tampão, de forma a facilitar a quebra da parede celular e o isolamento dos núcleos. Após essa etapa, a solução resultante é filtrada e corada com um

fluorocromo intercalante à molécula de DNA, para que assim a fluorescência emitida por estes núcleos seja diretamente proporcional ao seu conteúdo de DNA (PELLICER; LEITCH, 2014). O citômetro fornece então histogramas de fluorescência relativa, onde o valor-C da espécie analisada só pode ser interpretado mediante comparação com uma espécie com valor-C previamente definido, conhecida como padrão interno (JOHNSTON et al., 1999).

A praticidade da citometria de fluxo para determinar tamanho de genoma em plantas levou à uma crescente preferência por este método nas listas mais recentes de estimativas de valor-C para o grupo (BENNETT; LEITCH, 2005, 2011). Estudos comparativos demonstram alta concordância entre valores-C obtidos por microdensitometria Feulgen e citometria de fluxo, facilitando a transição entre as metodologias (DOLEŽEL et al., 1998; MICHAELSON et al., 1991). Além deste uso, a citometria de fluxo em plantas também é uma ferramenta bastante convencional para análises de nível de ploidia, por permitir a rápida análise de alto número de indivíduos (PELLICER; LEITCH, 2014). Os níveis de ploidia podem ser interpretados por meio da comparação com os picos do parental diplóide fornecidos pela análise. Além de macroanálises evolutivas sobre tamanho do genoma e ploidia, a citometria tem sido empregada em estudos populacionais, sendo possível a detecção de diferenças de até 3-4% entre o conteúdo de DNA de diferentes indivíduos (LOUREIRO et al., 2010). A possibilidade de perceber pequenas variações de DNA também permitiu a detecção de alterações no número cromossômico, como aneuploidia e mixoploidia, apesar destas precisarem de confirmação por análises citogenéticas (PELLICER; LEITCH, 2014). Da mesma forma, a citometria é uma técnica confiável para a identificação de híbridos interespecíficos e/ou suas espécies parentais (JĘDRZEJUK; MEYER; SEREK, 2017). Os constantes avanços na citometria de fluxo em plantas também têm permitido novas abordagens, como a separação de cromossomos específicos por meio de *flow sorting* para elaboração de bibliotecas genômicas de um ou pouco cromossomos (VRÁNA et al., 2016).

Devido à complexidade biológica das plantas, vários problemas podem ser encontrados em uma análise por citometria de fluxo (PELLICER; LEITCH, 2014). Mesmo sendo um método rápido e fácil, o protocolo proposto por Galbraith et al. (1983) foi submetido à diversas modificações ao longo dos anos. Apesar do protocolo tradicional exigir o uso de material foliar fresco, nem sempre é possível

atender essas especificações. Devido à diversidade morfológica das plantas, o uso de folhas pode ser substituído em casos pontuais por outros tecidos, tais como pétalas, raízes, grãos de pólen e sementes (PELLICER; LEITCH, 2014). A necessidade de material fresco, embora mais crítica, também não é sempre possível, já que em alguns casos pode haver uma diferença de dias entre a coleta e análise do material. Material armazenado em sílica ou exemplares de herbários pode ser utilizado para determinação do nível de ploidia, porém a baixa qualidade dos gráficos quando comparados com material fresco torna inviável a medição do genoma nestes casos (BAINARD et al., 2011; SUDA; TRÁVNÍČEK, 2006).

Todavia, o problema mais preocupante na quantificação de DNA por citometria de fluxo está relacionado à detecção de variabilidade intraespecífica causada por erros técnicos (GREILHUBER, 2005). Estes erros muitas vezes estão relacionados à identificação taxonômica errônea, presença de metabólitos secundários que se ligam aos núcleos gerando valores alterados de fluorescência e erros na escolha do padrão interno (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010). Devido a isto, várias melhorias metodológicas vêm sendo propostas ao longo dos anos em diferentes aspectos da citometria de fluxo.

### **2.2.2 Tampões**

Na citometria de fluxo, o tampão é responsável por fornecer um ambiente estável para o isolamento dos núcleos, eliminando resíduos celulares e compostos metabólicos que podem interferir na acessibilidade do fluorocromo aos núcleos isolados (LOUREIRO et al., 2006a). Estes compostos, quando não eliminados, se ligam aos núcleos em suspensão, gerando um aumento no coeficiente de variação (CV) dos picos apresentados no histograma (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). O CV é um importante indicador da qualidade da medição, sendo CVs abaixo de 3% considerados ótimos para medições, enquanto que CVs acima de 5% não são recomendados, podendo gerar variações indesejáveis nos valores obtidos (GALBRAITH et al., 2001). Noirot (2000) mostrou que variações causadas por excesso de compostos secundários podem chegar à 20% do tamanho do genoma de uma espécie.

As angiospermas apresentam uma alta variabilidade de classes de metabólitos secundários, responsáveis por diferentes funções. Dentre estes, compostos

fenólicos e taninos estão entre os principais responsáveis por alterações na citometria de fluxo (LOUREIRO et al., 2006b; NOIROT, 2003). Para contornar este problema, vários tampões compostos por diferentes reagentes foram propostos ao longo dos anos (PELLICER; LEITCH, 2014). Segundo Doležal e Bartos (2005), os tampões mais utilizados são: *Galbraith buffer* (GALBRAITH et al., 1983), *Lysis buffer 01* (DOLEŽEL; BINAROVÁ; LCRETI, 1989), *Marie buffer* (MARIE; BROWN, 1993), *Otto buffer I e II* (DOLEŽEL; GÖHDE, 1995; OTTO; WHITTON, 2000) e Tris-MgCl<sub>2</sub> (PFOSSER et al., 1995). Devido aos diversos tipos de metabólitos encontrados nas plantas, medições de uma mesma espécie com diferentes tampões podem gerar gráficos com qualidades variáveis (LOUREIRO et al., 2006c). Desta forma, a escolha de um tampão adequado é uma etapa crítica para a manutenção da qualidade e confiabilidade das medições.

Modificações na composição de tampões existentes são comuns, seja a adição de detergentes ou substituição de compostos como  $\beta$ -mercaptoetanol, responsável por impedir a interferência de compostos fenólicos sobre a amostra (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). Apesar das diferenças na constituição, a maioria dos tampões não demanda alterações no protocolo clássico de Galbraith et al. (1983). No entanto, alguns tampões como Otto I e II (DOLEŽEL; GÖHDE, 1995; OTTO; WHITTON, 2000) seguem um protocolo em duas etapas (*two-step protocol*), com a adição de centrifugação para auxiliar no isolamento dos núcleos. A quantidade de tampão utilizado para a preparação de amostras pode variar de 1 a 2 mL dependendo da quantidade de tecido analisado, sendo que certos materiais como polínia fornecem bons histogramas mesmo com menores volumes (PELLICER; LEITCH, 2014).

### 2.2.3 Fluorocromos

Após a ação do tampão sobre a amostra e a filtragem da mesma, é esperado que a solução esteja pronta para a ação do fluorocromo. Nas primeiras análises de citometria em plantas, fluorocromos intercalantes eram utilizados sem uma preocupação acerca da forma como estes se ligavam a molécula de DNA (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). O cálculo para tamanho do genoma por citometria se baseia na suposição de que a fluorescência emitida pelos núcleos seja diretamente proporcional ao conteúdo de DNA presente nestes (PELLICER; LEITCH, 2014).

Apesar disso, fluorocromos com ligação preferencial à pares de base específicos como mitramicina, cromomicina (bases GC) e DAPI (bases AT) eram comumente utilizados (DOLEŽEL; SGORBATI; LUCRETTI, 1992).

Em um estudo comparativo, Doležel et al. (1992) mostraram uma diferença de até 100% entre medições realizadas com DAPI (preferência por bases AT) e fluorocromos intercalantes sem preferência de base, como iodeto de propídio e brometo de etídio. Em outro estudo, medições realizadas com iodeto de propídio em diferentes laboratórios mostraram menor variação que medições realizadas com DAPI nas mesmas condições (DOLEŽEL et al., 1998). Apesar de ser um fluorocromo intercalante sem preferência por base, o brometo de etídeo tende a apresentar maior variação entre medições quando comparado ao iodeto de propídeo (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). Desta forma, o iodeto de propídeo é o fluorocromo mais recomendado para citometria de fluxo em plantas (PELLICER; LEITCH, 2014). Vale ressaltar que fluorocromos como o DAPI ainda são utilizados em citometria em certos estudos que visam estimar a proporção de pares de base em grupos de planta

#### **2.2.4 Padrões internos para citometria de fluxo**

O uso de espécies padrões para a quantificação do tamanho do genoma é provavelmente um dos aspectos mais discutidos na citometria de fluxo em plantas. Como o citômetro fornece valores relativos de fluorescência emitida pelos núcleos corados, é essencial a comparação com uma espécie com valor-C conhecido (DOLEŽEL et al., 1998). Células sanguíneas de galinha (CRBC, *Chicken Red Blood Cells*) e leucócitos humanos foram por muito tempo os principais padrões utilizados nas medições de genomas animais (DOLEŽEL; BINAROVÁ; LCRETTI, 1989). Esta popularidade levou ao uso de CRBCs como padrão na elaboração do primeiro protocolo para citometria em plantas (GALBRAITH et al., 1983). Apesar da popularidade inicial, o uso de padrões animais para medições de genomas vegetais foi criticado devido às diferenças inerentes à organização e composição celular destes grupos (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010). De qualquer forma, acredita-se que a comparação entre padrões vegetais e animais pode ser proveitosa para evitar discrepância de dados entre os dois grupos (BENNETT, 2003).

Outro aspecto bastante discutido acerca de padrões para a citometria diz

respeito a forma como estes são integrados à análise. No procedimento conhecido como padronização externa, amostras da espécie alvo e espécie padrão são medidas separadamente em um mesmo aparelho sob as mesmas condições (RAYBURN; AUGER, 1990). Contudo, pequenas mudanças aleatórias no aparelho podem acontecer entre as medições, gerando erros de difícil detecção (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). Além disso, visto que a composição bioquímica das células da espécie alvo e espécie padrão podem variar bastante, amostras separadas estariam sujeitas à condições diferentes para ação do tampão e do fluorocromo (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010). Para resolver estes problemas, foi sugerido que o tecido de ambas espécie alvo e padrão sejam preparados ao mesmo tempo em uma única amostra (DOLEŽEL, 1991). Este método, conhecido como padronização interna permite a comparação imediata entre as médias de fluorescência da espécie alvo e do padrão interno. Desta forma, o tamanho do genoma de uma determinada espécie alvo é estimado multiplicando a razão entre as fluorescências médias da espécie alvo e espécie padrão pelo tamanho do genoma da espécie padrão (DOLEŽEL; BARTOS, 2005).

Idealmente, um padrão interno universal para todas as estimativas de valor-C em plantas diminuiria substancialmente a probabilidade de erros técnicos (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010). No entanto, a variabilidade tanto de tamanhos do genoma como de complexidade bioquímica celular das plantas demanda a escolha de diversos padrões internos que atendam diferentes condições (BENNETT; SMITH, 1991). Apesar disso, é importante um consenso acerca dos padrões usados em diferentes medições. Por conta disto, várias recomendações foram propostas ao longo dos anos para a determinação de espécies apropriadas para esta função.

#### 2.2.4.1 Requisitos para padrões internos

As Reuniões e *Workshops* do Tamanho do Genoma realizados pelo Royal Botanic Garden (RBG) (<http://data.kew.org/cvalues/conference.html#keyrecs>) propuseram diversas discussões no tema, incluindo novas recomendações relacionadas aos padrões utilizados na citometria. Doležel e Bartos (2005) revisaram os critérios mais importantes, tais como: 1) uma espécie padrão deve ter seu conteúdo nuclear conhecido com suficiente precisão; 2) utilização de cultivares

(dada a estabilidade e padronização que se espera destes); 3) espécies que sejam autogâmicas, evitando ao máximo interferências externas no conteúdo nuclear; 4) espécies de fácil aquisição e distribuição, de preferência propagadas por semente.

Dentre estas recomendações, a precisão do conteúdo nuclear é crítica, visto que em mais de uma ocasião foi demonstrado um alto índice de erros relacionados à variabilidade intraespecífica ou determinação errônea de valor-C em padrões internos (DOLEŽEL et al., 1998; PRAÇA-FONTES et al., 2011). Para diminuir a possibilidade destes erros, é recomendado que novos padrões tenham seu conteúdo estimado por comparação direta ou indireta com genomas suficientemente conhecidos, como os leucócitos humanos ( $2C = 7,00$  pg) (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010). Além disso, como já foi demonstrado que uma mesma espécie pode apresentar diferentes valores-C dependendo do tampão utilizado (LOUREIRO et al., 2006c), é importante que candidatos a padrões internos mantenham valores constantes mesmo quando submetidos à diferentes metodologias (DOLEŽEL et al., 1998). É importante enfatizar o uso de cultivares bem estabelecidos, já que apesar do cuidado exigido ao se deparar com variabilidade intraespecífica em plantas, cultivares diferentes de uma mesma espécie podem apresentar variação nos valores-C (BENNETT; LEITCH, 2005).

Análises citogenéticas clássicas são essenciais na investigação de possíveis variações intraespecíficas observadas por citometria de fluxo (PELLICER; LEITCH, 2014). Variações numéricas como a presença de cromossomos B ou estruturais como cromossomos sexuais heteromórficos podem gerar alterações nos valores de fluorescência média em diferentes indivíduos de uma mesma espécie (DOLEŽEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). Casos de endopoliploidia (organismos com vários níveis de ploidia em um único tecido) também podem ser problemáticos para a citometria, já que aumentam a probabilidade de sobreposição dos picos e também podem levar a interpretações errôneas sobre a posição do pico G1 usado na medição (DOLEŽEL; SGORBATI; LUCRETTI, 1992). Ainda do ponto de vista citogenético, a organização da cromatina nuclear pode interferir na acessibilidade do fluorocromo, sendo importante que os núcleos interfásicos do padrão interno e espécie alvo sejam semelhantes nesse aspecto (PELLICER; LEITCH, 2014). Sendo assim, é recomendado que novos padrões internos passem por uma caracterização citogenética abrangente antes de serem estabelecidos (DOLEŽEL; BARTOS, 2005).

Dois aspectos técnicos relacionados aos histogramas fornecidos pelo citômetro são bastante importantes na escolha de padrões internos. Como a maioria dos tecidos foliares utilizados para a citometria terão células na fase G1 e G2 do ciclo celular, é comum que o histograma apresente dois picos (um com conteúdo nuclear 2C e o outro com 4C) referentes a núcleos pertencentes à estas fases (PELLICER; LEITCH, 2014). Desta forma, é importante que os picos gerados pelos padrões escolhidos não apresentem sobreposição com os picos 2C e 4C da espécie alvo (JOHNSTON et al., 1999). No entanto, também não é recomendado que os picos das duas espécies estejam muito distantes um do outro, devido a possibilidade de erros de linearidade do aparelho (VINDELØV et al., 1983). As recomendações mais recentes sugerem que padrão interno e espécie alvo não podem exceder três vezes de diferença entre seus valores-C (PELLICER; LEITCH, 2014). Esta recomendação levou a criação de listas de padrões internos que contemplem as diferentes faixas de tamanho do genoma das angiospermas.

#### 2.2.4.2 Listas de padrões internos

Ao longo dos anos, diversas espécies animais e vegetais foram utilizadas como padrão interno em quantificações do genoma por citometria de fluxo (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). A falta de conformidade entre os padrões internos utilizados em diferentes estudos acabou por gerar inúmeros casos de variabilidade intraespecífica artificial, colocando em dúvida várias publicações iniciais para valores-C em plantas (GREILHUBER, 2005). Mesmo antes da publicação do primeiro protocolo para citometria em plantas, Bennett e Smith (1976) apresentaram uma lista de padrões para microdensitometria por Feulgen, de forma a uniformizar os estudos sobre tamanho do genoma. Esta lista foi revisada em mais de uma ocasião, com a atualização de alguns valores-C, adição de novas espécies e comparações entre valores obtidos por microdensitometria e citometria (BENNETT; SMITH, 1991; BENNETT; LEITCH, 1995; JOHNSTON et al., 1999; BENNETT; LEITCH, 2005).

Em um estudo comparativo sobre diferentes fluorocromos usados na citometria de fluxo, (DOLEŽEL; SGORBATI; LUCRETTI, 1992) sugeriram o uso de seis cultivares como padrões internos. Mais tarde foram adicionadas mais três espécies à lista, cobrindo uma faixa de  $2C = 1,01$  pg (*Raphanus sativus* cv. Saxa)

até 2C = 34,89 pg (*Allium cepa* cv. Ailsa Craig) (DOLEŽEL et al., 1998). O quadro 1 lista os principais padrões internos pertencentes às duas listas discutidas.

Quadro 1 - Lista de padrões mais utilizados na citometria de fluxo em plantas

| Cultivar                                    | Conteúdo de DNA 2C (picogramas) | Referência            |
|---------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Oryza sativa</i> cv. IR36                | 1,01                            | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Vigna radiata</i> cv. Berken             | 1,06                            | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Raphanus sativus</i> cv. Saxa            | 1,11                            | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Stupicke | 1,96                            | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Glycine max</i> cv. Polanka              | 2,50                            | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Senecio vulgaris</i> cv. PBI population  | 3,17                            | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Zea mays</i> cv. CE-777                  | 5,43                            | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Zea mays</i> cv. W64A                    | 5,47                            | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Pisum sativum</i> cv. Ctirad             | 9,09                            | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Pisum sativum</i> cv. Minerva Maple      | 9,73                            | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Hordeum vulgare</i> cv. Sultan           | 11,12                           | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Secale cereal</i> cv. Dankovske          | 16,19                           | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Secale cereal</i> cv. Petkus Spring      | 16,57                           | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Anemone virginiana</i> cv. AV 200        | 17,84                           | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Vicia faba</i> cv. PBI                   | 26,66                           | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Vicia faba</i> cv. Inovec                | 26,90                           | DOLEŽEL et al., 1998  |
| <i>Allium cepa</i> cv. Ailsa Craig          | 33,50                           | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Triticuma estivum</i> cv. Chinese Spring | 34,64                           | BENNETT; LEITCH, 2005 |
| <i>Allium cepa</i> cv. Alice                | 34,89                           | DOLEŽEL et al., 1998  |

Fonte: O autor (2018)

Ao passo que as tecnologias de sequenciamento avançam, é esperado que um genoma de referência seja precisamente quantificado para ser usado como referência para a calibração de novos padrões. Por enquanto, o genoma humano (2C = 7,00 pg) é ainda considerado a melhor referência em termos de tamanho do genoma precisamente conhecido (DOLEŽEL; GREILHUBER, 2010). Devido ao fato dos padrões propostos por Doležel et al. (1998) terem sido medidos em comparação com leucócitos humanos (2C = 7,00 pg), esta permanece sendo a lista mais indicada para medições em plantas e para a determinação de novos padrões internos.

### 2.3 VARIABILIDADE DO TAMANHO DO GENOMA EM PLANTAS

Graças ao constante aprimoramento das técnicas de quantificação de conteúdo nuclear, atualmente existem dados para aproximadamente 15.000 espécies de eucariotos (GARCIA et al., 2014). A análise destes dados mostra uma diferença de até 60.000 vezes entre o menor e maior genoma reportados, denotando uma extraordinária variabilidade interespecífica para este caráter (ELLIOTT; GREGORY, 2015). As plantas se destacam dentre os eucariotos por apresentarem uma diferença de aproximadamente 2.400 vezes entre o menor (*Genlisea margaretae*, 1C = 0.06 pg, GREILHUBER et al., 2006) e maior genoma reportado (*Paris japonica*, 1C = 152.23 pg, PELLICER; FAY; LEITCH, 2010). Essa variabilidade se torna ainda mais interessante pelo fato de que, até o presente momento, pouco menos de 5% do total estimado de espécies de plantas tiveram seu genoma quantificado (GARCIA et al., 2014).

A versão mais recente da *Plant DNA C-value Database* (<http://data.kew.org/cvalues>, BENNETT; LEITCH, 2012) destaca as angiospermas como o grupo de plantas com maior número de espécies com genoma quantificado (7.542) e também com maior variabilidade (visto que ambos o menor e maior genoma das plantas estão presentes neste grupo) (GARCIA et al., 2014). Esta variabilidade somada à plasticidade ecológica apresentada pelas angiospermas gerou uma série de especulações acerca do valor adaptativo do tamanho do genoma. Apesar da grande gama de valores-C dentre as angiospermas, os valores modal (1C = 0,65 pg) e médio (1C = 5,83 pg) para o grupo indicam a predominância de genomas menores (DODSWORTH; LEITCH; LEITCH, 2015). Mesmo com este predomínio, os fatores evolutivos relacionados às mudanças do genoma não parecem alterar o valor-C de uma forma unidirecional (CONANT; BIRCHLER; PIRES, 2014). A plasticidade ecológica das angiospermas não aparenta estar relacionada com genomas menores ou maiores, mas sim com a marcante habilidade destas de perseverar após mudanças no tamanho do genoma (PUTTICK; CLARK; DONOGHUE, 2015). Dentre estas mudanças, as angiospermas se destacam pela alta incidência de poliploidia e variabilidade no DNA repetitivo (DODSWORTH; LEITCH; LEITCH, 2015).

### 2.3.1 Poliploidia

O papel da poliploidia (duplicação do complemento cromossômico) na evolução das plantas terrestres vem sido debatido vigorosamente pela comunidade científica ao longo dos anos STEPHENS, 1951; (OTTO; WHITTON, 2000; SOLTIS et al., 2015). As angiospermas mais uma vez se destacam, com frequências de poliplóides estimadas em até 70% do total estudado de espécies (MASTERSON, 1994). Além disso, dados de sequenciamento mostram centenas de eventos ancestrais de poliploidia foram descobertos ao longo da evolução das angiospermas (JIAO et al., 2011). Hoje sabe-se que até mesmo o surgimento das flores no ancestral das angiospermas foi resultado direto de eventos de duplicação do genoma (DODSWORTH; CHASE; LEITCH, 2016).

Teoricamente, é esperado que poliplóides apresentem valores-C maiores, proporcionais com seu nível de ploidia, enquanto que o tamanho do genoma monoplóide permanece inalterado (LEITCH; BENNETT, 2004). Levando em conta essa consideração, a tendência à genomas pequenos nas angiospermas (valor-C médio = 5.81 pg) é imediatamente contrastante aos inúmeros eventos de poliploidia ao longo da evolução do grupo (LEITCH; LEITCH, 2012). Não obstante, o impacto da poliploidia no tamanho do genoma vai muito além da duplicação no conteúdo de DNA, mas também tem relação com os eventos subsequentes a tal duplicação. Foi constatado que, na maioria dos casos, o valor-C de espécies poliplóides não apresentava o aumento proporcional esperado, e que o valor monoplóide (1Cx) diminuía em relação aos parentais diplóides (LEITCH; BENNETT, 2004). Estudos recentes mostram que essa perda de DNA, conhecida como diploidização, age prioritariamente sobre a fração repetitiva do genoma, evidenciando a importância desta nas dinâmicas relacionadas à variabilidade do valor- C (DODSWORTH; CHASE; LEITCH, 2016).

### 2.3.2 DNA repetitivo

Os avanços nas técnicas de sequenciamento mostraram que, em detrimento da pequena variação no número de genes, espécies relacionadas mostravam alta variabilidade na abundância de elementos repetitivos (ELLIOTT; GREGORY, 2015). Este DNA repetitivo é comumente dividido em dois grandes grupos: DNA repetitivo

em tandem (DNAs ribossomais, DNAs satélite) e DNA repetitivo disperso (elementos móveis como os retrotransposons) (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2015). O DNA repetitivo foi por muito tempo descartado apenas como “DNA-lixo”, mas a crescente facilidade para a caracterização da fração repetitiva por sequenciamento de baixa cobertura tem impulsionado estudos na área (DODSWORTH; LEITCH; LEITCH, 2015).

As angiospermas são o grupo mais propício para o estudo do DNA repetitivo, visto que este pode compor até 70% do genoma de certas espécies (ELLIOTT; GREGORY, 2015). Apesar de algumas espécies apresentarem cerca de 10-20% de DNA repetitivo em tandem em sua composição, os elementos móveis, especialmente retrotransposons do tipo LTR (*Long Terminal Repeat*), são os principais responsáveis pela grande variabilidade de tamanhos do genoma nas angiospermas (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2015). Técnicas de caracterização cada vez mais precisas têm ajudado a ligar linhagens específicas à variação do tamanho do genoma, como foi o caso com a linhagem *Ogre* da família de LTRs *Ty3/Gypsy* (MACAS et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a amplificação e desamplificação destes elementos pode influenciar o espaço gênico, efetivamente modificando/silenciando certos genes (DODSWORTH; LEITCH; LEITCH, 2015). A recente descoberta do sinal filogenético da abundância de diferentes classes de elementos repetitivos abre novos panoramas para o possível significado evolutivo da variação no tamanho do genoma das angiospermas (DODSWORTH et al., 2015). Com as técnicas genômicas ficando cada vez mais sofisticadas, a demanda por dados de tamanho do genoma também cresce, seja para auxiliar nas estratégias de sequenciamento ou para impulsionar estudos comparativos (GARCIA et al., 2014). A busca por melhorias metodológicas nas técnicas de quantificação do genoma é essencial para manter o fluxo de dados confiáveis necessários à manutenção destes estudos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 FIRST SET OF TROPICAL PLANTS PROPOSED AS REFERENCE STANDARDS FOR GENOME SIZE ESTIMATION BY FLOW CYTOMETRY

Lucas Costa<sup>1</sup>, Pablo Rodriguez<sup>1</sup>, Ana Paula de Moraes<sup>2</sup>, Joerg Fuchs<sup>3</sup>, Natoniel Franklin de Melo<sup>4</sup>, Gustavo Souza<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE*

<sup>2</sup>*Laboratório de estudos em Evolução de plantas Neotropicais, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo-SP*

<sup>3</sup>*Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Stadt Seeland, Germany*

<sup>4</sup>*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Petrolina-PE*

\*Corresponding author: lgrsouza@hotmail.com

#### ABSTRACT

Flow cytometry is the most widely used method for genome size quantification in plants. The protocol is based on the comparison of the mean fluorescence of stained nuclei of a target species with that of a reference standard with known genome size. The traditionally used reference standards, proposed mainly by European Labs, are cultivars adapted to temperate climate (for ex., *Raphanus sativus* L. cv. 'Saxa', *Zea mays* L. cv. 'CE-777' or *Glycine max* L. cv. 'Polanka'). Although the tropical region holds the largest plant biodiversity, it comprises the lowest number of analyzed species with respect to the genome size. The difficulties to cultivate and propagate these flow cytometry reference standards might have prevented a broader use of flow cytometric analysis in tropical regions. To overcome this problem, here we present a list of reference standards composed by Brazilian cultivars. The genome sizes of these plants were estimated by flow cytometry using five different nuclei isolations buffers: *LB01*, *Marie*, *WPB*, *Galbraith* and *Sysmex*. We checked the quality of the histograms, the variation between measurements, and the reproducibility of the obtained values by a statistical approach. We also performed cytogenetic analysis to confirm the

chromosome stability of the selected cultivars. In the end, we recommend as a new set of reference standards adapted to the tropical/subtropical regions: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai cv. Crimson Sweet (2C = 0.87 pg), *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. BRS Pujante (2C = 1.36 pg), *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. IPA-6 (2C = 2.05 pg), *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss cv. Graúda (2C = 4.14 pg), *Allium cepa* L. cv. IPA-11 (2C = 35.22 pg), and *Nothoscordum pulchellum* Kunth (2C = 49.09 pg). Although the last one is not a cultivated species, it might be an important reference standard especially for the analysis of giant genomes (ex: Amaryllidaceae, Loranthaceae etc.). Considering the struggling plant diversity found in the tropics, this list will be a useful tool to explore tropical plants with respect to their genome sizes. Keywords: Flow cytometry, tropical plants, reference standards, genome size, chromosome number

## INTRODUCTION

Land plants represent a remarkable genome size variability, with a difference of approx. 2,000× between the smallest and largest genomes reported (Gregory 2005). This high variation makes the genome size in plants an interesting character for studies in breeding, biodiversity or comparative cytogenetics (Puttick et al. 2015). Due to the speed and practicality of the protocol (Galbraith et al. 1983), flow cytometry is currently the most frequently used method for the determination of the nuclear DNA content in plants. The protocol involves chopping of leaf tissue immersed in a nuclear isolation buffer, followed by filtering and staining of the nuclei suspension with a DNA-binding fluorochrome, such as propidium iodide (Doležal et al. 2007, Pellicer and Leitch 2014). Because the flow cytometer provides only relative fluorescence values emitted by the stained nuclei, the genome size of a species can only be estimated by comparison with a reference species with known DNA content (Doležal et al. 1992). These species are commonly used as internal references, as they are chopped simultaneously together with the target species to avoid technical errors (Noirot 2000). To avoid possible non-linearity errors in the interpretation of the histograms provided by the cytometer, it is recommended that the difference in genome size between reference and target species should not be more than three times (Pellicer and Leitch 2014). Along with this recommendation, the high variability of nuclear DNA content in plants leads to the need

of a list of reference standards that covers most of the exceptionally broad range (Doležel and Bartos 2005).

For the selection of suitable reference standards for genome size estimations, a few recommendations were proposed (rev. by Suda and Leitch 2010). Among these, it is emphasized that the reference standards must be seed propagated, well-established cultivars and suitable for flow cytometry analysis (Doležel and Bartos 2005). Reference standards also must have been cytogenetically characterized in order to avoid technical errors generated by numeric changes like endopolyploidy or B chromosomes (Suda and Leitch 2010). Furthermore, it is important to choose an internal reference standard with a similar chromatin organization to that of the target-species, as this can interfere with fluorochrome accessibility (Doležel and Greilhuber 2010).

Currently, there are few lists of cultivars that attend the different requisites for reference standards, but such lists are exclusively composed of cultivars developed in temperate climate (Bennett and Smith 1991; Doležel et al. 1998; Johnston et al. 1999). In addition to the logistic and legal difficulties inherent in international seeds shipping, their adaptation to temperate climates makes their cultivation and propagation problematic in tropical regions. Moreover, the latest update on the Plant C-value Database shows that over 60% of the reported genome sizes are provided by research groups of Europe and North America (Bennett and Leitch 2011). The low percentage of plants with known genome size (4% of the total, Bennett and Leitch 2011) accentuates the need for optimization of flow cytometry studies in hotspots of biodiversity, which are mainly localized at tropical regions (Marchese 2015).

In this work, we propose a list of Brazilian cultivars as an alternative set of reference standards for flow cytometry, aiming to support and improve genome size studies in tropical countries. For this, we estimated the genome size of six species using six different nuclei isolation buffers, evaluated the quality of the obtained histograms and the variation between measurements, and checked statistically the differences between linear and logarithmic scales in flow cytometry analysis. We also performed cytogenetic analysis to evaluate the chromosome number of the selected cultivars.

## **MATERIALS AND METHODS**

## Plant material

Seeds of *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Stupicke polni tyckove rane' (2C = 1.96 pg), *Glycine max* (L.) Merr. cv. Polanka (2C = 2.50 pg) and *Vicia faba* L. cv. 'Inovec' (2C = 26.90 pg) were cordially supplied by Dr. Jaroslav Doležel (Experimental Institute of Botany, Czech Republic). These cultivars are part of a set of reference standards established by Doležel et al. (1998) and were used in this work to measure the new reference standards.

The species proposed as new reference standards (target species) are disposed at Table 1 (ANEXO A). Individuals of *Nothoscordum pulchellum* were retrieved from a population kept at the experimental garden of the Laboratory of Plants Cytogenetics and Evolution of the Federal University of Pernambuco (UFPE, Recife-PE, Brazil). Seeds of the remaining species were obtained from the collection of the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Semi- Árido (Petrópolis-PE, Brazil). Both, the target species and the reference standards were grown at the same experimental garden mentioned above. Additionally, the proposed new standards were also grown together with the corresponding reference standards in the greenhouses of the IPK (Gatersleben, Germany) and of the Federal University of ABC (UFABC, São Bernardo do Campo-SP, Brazil).

## Flow Cytometry

For genome size estimation young leaves of at least three individuals per species were used. For each of the different buffers at least six measurements were performed. In order to simplify the treatments, we focused on buffers that follow the one- step protocol (rev. by Pellicer and Leitch 2014), including *Lysis Buffer 01* (LB01, Doležel et al. 1998), *Marie* (Marie and Brown 1993), *Woody Plant Buffer* (WPB, Loureiro et al. 2007) and *Galbraith* (Galbraith et al. 1983). For comparison we included also one commercially available *Sysmex Buffer* (CyStain® PI Absolute P, SYSMEX, Norderstedt, Germany), which requires a two-step protocol (Doležel et al. 2007). Sample preparation was done according to Doležel et al. (2007) with small modifications. Approximately 25-50 mg of fresh leaf tissue from the target-species were co-chopped simultaneously with the chosen reference standard in a Petri dish (kept on ice) containing 2 mL of buffer. The sample was then filtered through a 30 µm

disposable mesh filter (CellTrics, SYSMEX, Norderstedt, Germany) with following addition of 50 µg/mL propidium iodide (from a stock of 1 mg/mL; Sigma-Aldrich) and 50 µg/mL RNase. Samples were measured at two different laboratories both using a CyFlow Space flow cytometer (SYSMEX, Norderstedt, Germany) equipped with a green laser (532 nm). In laboratory 1 (Recife, Brazil), samples prepared with the buffers *Marie*, *LB01* and *WPB* and in laboratory 2 (Gatersleben, Germany), samples prepared with *Galbraith* and *Sysmex* were analyzed. For the determination of the mean fluorescence channels of the corresponding peaks usually histograms with linear scale were used. For logistic reasons, we were unable to send *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss cv. Graúda seeds to laboratory 2 and seeds of *Allium cepa* L. cv. IPA-11 were not viable upon arrival on Germany. These two species ended up having only measurements with three different buffers.

In order to compare results obtained with different fluorescence scales, we performed additional measurements for cultivars of *C. lanatus*, *V. unguiculata* and *S. lycopersicon*, using the log-amplified scale. These measurements were undertaken under the same methodology, buffers and equipments cited above.

The histograms of relative fluorescence were obtained using the software Flomax v.2.3.0. (SYSMEX, Norderstedt, Germany) or FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The DNA content of the target species was calculated using the equation “2C target (pg) = (G1 target/G1 standard) x 2C standard (pg)”. “G1” refers to the mean fluorescence value emitted by nuclei in the G1 stage of interphase and “2C standard” refers to the absolute DNA content of the reference standard used in the measurement.

## Literature survey

To complement geographic representative data for genome size studies provided by Bennett and Leitch (2011), we used data from the Scopus database (www.scopus.com) on January, 2018. For this, we first search for genome size studies employing flow cytometry since 2012 using the following search string: “( TITLE-ABS-KEY ( "Flow Cytometry" ) ) AND ( ( TITLE-ABS-KEY ( "Genome Size" ) OR TITLE-ABS-KEY ( c-value ) ) ) AND ( ( TITLE-ABS-KEY ( "Angiosperms" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "Flowering Plants" ) OR TITLE-ABS-KEY ( plants ) ) ) AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2017 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR,

2016 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2015 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2014 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2013 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2012 ) )". This search yielded 292 results. From these, nine papers were removed for not having 2C estimates of plant species. We then filtered the results, limiting the search to papers provided by research groups based on tropical countries with the following addition to the previous string: "AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2017 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2016 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2015 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2014 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2013 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR, 2012 ) ) AND ( LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Brazil" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "India" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Mexico" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Ecuador" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Tanzania" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Thailand" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Burkina Faso" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Cote d'Ivoire" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Ethiopia" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Kenya" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Myanmar" ) OR LIMIT-TO ( AFFILCOUNTRY, "Singapore" ) )". This yielded 51 results (Appendix 1).

We also added "AND ALL (histogram)" to the first search string (without the geographical limits) in order to investigate the use of different scales in plant genome size studies since 2012. This resulted in 40 papers, from which 27 had information about the scale used, either in the materials and methods section or in figures. We added four papers to the results after personal communication with the authors (ANEXO C, 1Supplementary Table 1).

## Statistical analysis

For the statistical analysis, we used built-in functions of the FloMax software and the packages "*stats*" and "*graphics*" implemented in R Studio v.3.3.1 (R Core Development 2011). To evaluate the quality of the individual peaks, the coefficient of variation of the peaks (CV) was assessed with the function "Fit Gauss Peaks" implemented in FloMax. The CV is used as an indicator for the sample quality and can be altered by the presence of secondary metabolites that bind to the nuclei, generating unreliable mean fluorescence values (Doležel et al. 1992). Peaks with CV below 5% are considered acceptable for genome size estimates (Galbraith et al. 2001), but are not good indicators of stability between repetitions (Doležel and Bartos 2005). For this,

we calculated the SD, in this case a percentage representation of the standard deviation between all measurements. Variations of less than 3% are commonly attributed to technical factors and should not be mistaken for intraspecific variation in genome size studies (Pellicer and Leitch 2014).

To check if there was significant difference between measurements with different buffers for each target species, we performed an Analysis of Variance (ANOVA) using RStudio. In case of non-normality or non-homocedasticity of the ANOVA residuals, we used the non-parametric test of Kruskal-Wallis. To check for differences between measurements in different scales using the same buffers, we employed a paired T-test. In case of non-normality or non-homocedasticity of the measurement data, we used the non-parametric test of Wilcoxon/Mann-Wiley.

## **Cytogenetic characterization**

To evaluate chromosome number, ploidy variation, B chromosome presence and type of interphasic nuclei of the target species, we perform a cytogenetic analysis. Root tips were pre-treated with Colchicine 0.02% (for *N. pulchellum* and *A. cepa*) or 8-hydroxyquinoline 0.002 M (for the remaining species) for 24 hours at 12 °C and then washed with distilled water and digested in a solution of cellulase (Onozuka) 2% - pectinase (Sigma) 20% at 37 °C for 30 to 90 minutes. The meristems were macerated and squashed in a drop of acetic acid 45% and cover slips were removed after freezing in liquid nitrogen. The slides were stained and mounted simultaneously with 10 µL of glycerol/McIlvaine buffer (pH 7.0, 1:1) supplemented with DAPI (1 µg/mL) and stored for three days in the dark before being analyzed (adapted from Barros e Silva and Guerra 2010). The slides were examined using a Leica DMLB epifluorescence microscope and images were captured with a Cohu CCD video camera using Leica QFISH software, and edited using Adobe Photoshop CC v. 2015.0.0.

## **RESULTS**

### **Genome size measurements**

The six species presented in Table 1 (ANEXO A) showed satisfactory results for all repetitions, with CVs generally below 5% and standard deviation (SD) between

measurements below 3%. The mean estimated genome sizes ranged from  $2C = 0.88 \pm 0.02$  pg in *Citrullus lanatus* cv. Crimson Sweet to  $2C = 49.09 \pm 1.20$  pg in *Nothoscordum pulchellum*. The CV ranged from 1.80 to 4.88% (mean CV = 3.80%) and the histograms showed low incidence of cellular background (ANEXO B, Figure 1). The lowest mean CV for *C. lanatus*, *Vigna unguiculata* cv. BRS Pujante, *Lycopersicon esculentum* cv. IPA-6 and *N. pulchellum* were obtained with the Sysmex Buffer (respectively 3.15%, 3.19%, 2.46 and 3.10%). For *C. sativum*, the lowest CV was obtained with LB01 (3.42%) and for *A. cepa* with the Marie buffer (CV = 3.87%).

To check variation between different samples, we calculated the SD, which ranged from 0.72% in *V. unguiculata* using Galbraith to 2.26% in *N. pulchellum* using Marie. Although there was a small variability between the results obtained with different buffers in most species (ANEXO A, Table 1), the ANOVA showed that this variability was not significant between buffers used in the same laboratories ( $p > 0.05$  for all species). The residuals from the ANOVA with the *C. lanatus* measurements did not present homoscedasticity, therefore it was necessary to employ the non-parametric Kruskal-Wallis test, which confirmed that the differences were not significant for this species. Differences between laboratories, although significant, were all under the observed standard deviations. In addition, combining the results from both laboratories to calculate the overall mean did not produce standard deviations greater than 3% (ANEXO A, Table 1). Considering the overall mean, the largest variation was found in *N. pulchellum* (SD = 2.44%), while in *V. unguiculata* only 1.51% variation between all repetitions could be detected.

In order to evaluate the difference between measurements using linear and logarithmic scale, we conducted a second round of measurements for three selected cultivars: *C. lanatus*, *V. unguiculata* and *L. esculentum*, using the logarithmic scale and three of the buffers (LB01, Marie and WPB) (ANEXO B, Figure 2A). We compared the values obtained with the different scales for each species and buffer separately using Students T test (ANEXO B, Figure 2B). In *L. esculentum*, there was no significant difference between the values obtained from either of the two scales for none of the buffers ( $p = 0.59$  with LB01, 0.90 with Marie and 0.06 with WPB). In *V. unguiculata*, the difference between the values obtained from the two scales was significant for the measurements using Marie and WPB ( $p < 0.05$ ), but not for LB01 ( $p = 0.14$ ). For *C. lanatus*, log and linear measurements were statistically different when using LB01 ( $p = 0.04$ ) but not in the case of Marie and WPB ( $p = 0.17$  and 0.20 respectively). When

comparing all measurements independently of the buffers used, the ANOVA showed significant difference between scales for *V. unguiculata* ( $p < 0.05$ ), but not for *L. esculentum* ( $p = 0.12$ ) and *C. lanatus* (0.98).

## Cytogenetic characterization

Metaphasis of at least three individuals of the plants with satisfactory results in the genome size measurements were analyzed. The cultivars of *C. lanatus*, *V. unguiculata* and *P. crispum* presented  $2n = 22$  (ANEXO B, Figure 3A, 3B and 3D), *L. esculentum* showed  $2n = 24$  (ANEXO B, Figure 3C), *A. cepa* presented  $2n = 16$  (ANEXO B, Figure 3E) and *N. pulchellum* showed  $2n = 10$  (ANEXO B, Figure 3F). None of these standards showed any evidence for the occurrence of B chromosomes or polyploidy on any of the analyzed individuals.

The interphase nuclei of these species were characterized according to the classification proposed by Delay (1949). In case of *C. lanatus*, *V. unguiculata* and *L. esculentum* they were characterized by several chromocenters strongly stained with DAPI, and were therefore considered as areticulate. In *P. crispum*, interphase nuclei did not reveal evident chromocenters, and the chromatin showed an irregular condensation, being considered as semi-reticulate. The nuclei of *A. cepa* and *N. pulchellum* showed a clear reticule structure, with no visible chromocenters, and were therefore considered as eureticulate.

## DISCUSSION

### Quality of measurements

Being aware of the fact that genome size estimations may vary to a certain degree depending on the used nuclear isolation buffer utilized (Loureiro et al. 2006) and also between cytometers and laboratories (Doležal et al. 1998), we compared the values obtained under different conditions in a statistical framework. The *Sysmex buffer* samples showed the lowest CVs in the species in which it was used. For *A. cepa* the lowest CV values were obtained with the Marie buffer. Although the commercial buffer had the overall best performance, it has been stressed that a single buffer will hardly work best for all species, which should be considered for choosing an

appropriate buffer for each specific situation (Loureiro et al. 2007; Pellicer and Leitch 2014). Mean estimates between laboratories varied under the observed standard deviations, denoting low variability even in different conditions. Doležal et al. (1998) already showed variation up to 9.6% between measurements with different equipments/laboratories, but in our study, the largest variation between laboratories was of 3.37% observed for *C. lanatus*. It is important to note that as the different laboratories in this study used different buffers, it is hard to know decisively whether the difference is related to buffer, equipment or laboratory. In the end, considering all repetitions independently of the buffer or laboratory, the SD was below 3% for all species, indicating low overall variability. Due to this, we recommend the use of the general mean (between all repetitions) as the reference 2C value for the new standards (ANEXO A, Table 1).

### Genome size of new reference standards

We compared the results obtained for all cultivars to those reported in the literature for the same species. For *Citrullus lanatus* cv. Crimson Sweet we estimated  $2C = 0.87$  pg, which is consistent with the results of Arumuganathan and Earle (1991) who investigated two different cultivars ( $2C = 0.88$  and  $2C = 0.90$ , respectively). The value of *Vigna unguiculata* cv. BRS Pujante ( $2C = 1.36$  pg), although in the same magnitude differed significantly from a previous report of Arumuganathan and Earle (1991, of  $2C = 1.27$  pg). Since no information on the cultivar is given and in addition chicken red blood cells were used as standard in this study a direct comparison of the values is difficult. *Lycopersicon esculentum* cv. IPA-6 showed  $2C = 2.05$  pg and differs from the traditional value reported by Doležal et al. (1998) for the cultivar “Stupicke” ( $2C = 1.96$  pg). For the cultivar ‘IPA-5’ an even higher value ( $2C = 2.14$  pg) was reported (Feitoza et al. 2017). Although there is a possibility that these results are product of methodological differences (eg. staining time, plant tissue condition), there are reports of small differences of genome size between cultivated varieties adapted to different climates (Greilhuber 2005; Ali et al. 2017; Bilinski et al. 2017). A similar difference between cultivars was observed when we compared our results of *Petroselinum crispum* cv. Graúda ( $2C = 4.15$  pg) with values previous reported on the literature. The value reported here was slightly higher than the one reported by Arumuganathan and Earle (1991) of  $2C = 3.96$  pg (unknown cultivar), but smaller than

the one obtained by Yokoya et al. (2000) of  $2C = 4+46$  pg. Das (1991) found the highest reported genome size for *P. crispum* cv. Sutton 1810 ( $2C = 8.60$  pg) using Feulgen microdensitometry. Although this value is almost doubled compared to ours different ploidy levels could be excluded since in both cases  $2n = 22$  chromosomes were counted. In general there is a quite good concordance between estimates obtained with flow cytometry and microdensitometry (Michaelson et al. 1991; Doležel et al. 1998), at least if the methods are applied properly. Greilhuber and Ebert (1994) and Greilhuber (2005) have indicated various critical steps by using Feulgen microdensitometry that are prone to result in erroneous values, such as hydrolysis temperature and slide ageing. The DNA content of *Allium cepa* cv. IPA-11 was estimated to be  $2C = 35.22$  pg. The first DNA quantification for *A. cepa*, obtained by chemical means for the cultivar “Ailsa Craig”, showed  $2C = 33.5$  pg (Hof J van’t 1965). This value was corroborated by Feulgen microdensitometry and used as the reference value for this species (Bennett and Smith 1991). However, using human leucocytes as internal standard, Doležel and Greilhuber (2010) noted that the genome size for *A. cepa* might be slightly higher ( $2C = 34.89$  pg) than previously estimated. In any case, the variability in *A. cepa* seems to be very low and can be attributed to either technical factors or slight differences between the cultivars. For *Nothoscordum pulchellum*,  $2C = 49.09$  pg was determined, which is very close to previous results obtained by Feitoza et al. (2017) ( $2C = 49.94$  pg) for the same population. Although *N. pulchellum* is not an established cultivar, it fulfills all of the other recommendations for being a suitable reference standard, such as karyotypic stability, autogamic reproduction and suitability for flow cytometric measurements, as confirmed by good quality of the resulting histograms and a low  $2C$  variability between the repetitions. In addition, its high  $2C$  value makes *N. pulchellum* a reliable reference standard for the determination of “giant genomes”, so far poorly represented in plants (Bennett and Leitch 2005). A stable and well characterized population of *N. pulchellum* is kept at the Laboratory of Plant Cytogenetics and Evolution of the UFPE (Recife-PE, Brazil) and bulbs can be obtained free of charge by contacting the authors of this work. For the remaining reference standards (ANEXO A, Table 1), seeds are stored at the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Semi- Árido (Petrolina-PE, Brazil) and will be made available for researches through communication with the authors of this work.

### **Chromosome number stability of new reference standards**

The chromosome numbers observed for the cultivars of *C. lanatus* ( $2n = 22$ ), *V. unguiculata* ( $2n = 22$ ), *L. esculentum* ( $2n = 24$ ), *C. sativum* ( $2n = 22$ ), *A. cepa* ( $2n = 16$ ) and *N. pulchellum* ( $2n = 10$ ) were not different from recent revisions reported for these species at the Chromosome Count Database (<http://ccdb.tau.ac.il/>) (Strelnikova 1999; Guerra and Félix 2000; Zhao et al. 2000; Yang et al. 2003; Gabriellan and Zohary 2004; Masuzaki et al. 2006). This, in addition to the absence of B chromosomes and pronounced endopolyploidy, confirms that the used cultivars are characterized by a high karyotypic stability and therewith suitable reference standards for flow cytometry (Suda and Leitch 2010).

### **Linear x Logarithmic scale**

Most modern flow cytometers provide acquisition of fluorescence values in both linear and logarithmic scales (Shapiro and Wiley 2005). We surveyed genome size studies that indicated the scale used since 2012 and found that approximately 24% of these employed logarithmic fluorescence scale (ANEXO B, Figure 2C). This is problematic, as the log-scale, preferably used for ploidy determination as it covers a longer range than the linear scale (see Brown et al. 2017), is not recommended for genome size estimates. Although most of flow cytometers permit the direct conversion of log to linear scales, rounding effects can still affect interpretation of mean fluorescence values (Flomax Manual, Partec 2001). It is important to notice that only a small fraction of the studies surveyed presented information (in figure or text form) about the scale used, which can be problematic in the quest for best practices in flow cytometry (ANEXO B, Figure 2C).

Recently, (Camillo et al. 2014) used both scales to assess the genome size of species of the genus *Elaeis* (Arecaceae) and found no difference in the results. However, our results show that measurements with different scales can generate significantly different results even under identical conditions (ANEXO B, Figure 2B). This reinforces that the use of logarithmic scale may generate erroneous results depending on the methodologies employed. Therefore, our results corroborate experimentally the recommendation to not use logarithmic scales for genome size measurements, as it can yield significant different values from those obtained with linear scale.

## New list of reference standards for tropical regions

As well as the list of reference standards proposed by Doležel et al. (1998), the present list of species (ANEXO A, Table 1) comprises a reasonable number of species with relatively small 2C values (< 5 pg, Bennett and Leitch 2005). This allows minimizing problems caused by overlapping of peaks in this range and provides good coverage for species with 2C values of up to approx. 13 pg, following the recommended distance between standard and target species (Pellicer and Leitch 2014). In addition, the modal (0.65 pg) and mean (5.83 pg) values for genome size in angiosperms indicate that most of the representatives of this group occupy the range of small genomes (Dodsworth et al. 2015).

Other lists of reference standards (Bennett and Smith 1991; Johnston et al. 1999) encompass a variety of species with medium to large genomes such as *Hordeum vulgare* L. cv. Sultan (2C = 11.12 pg) and *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring (2C = 34.64 pg). *Allium cepa* has been extensively used as a reference standard since its first DNA quantification by chemical means (Hof J van't 1965) and is included in all of the traditional lists (Bennett and Smith 1991; Doležel et al. 1998; Johnston et al. 1999). Also the proposed list of tropical reference standards includes the cultivar “IPA- 11” of *A. cepa*.

Since *A. cepa* cv. Alice (2C = 34.89 pg) is in the currently existing lists the reference standard with the largest genome, the determination of genome size of species with “giant genomes” can be problematic or only be overcome by performing several steps of cross-calibrations, as it was the case with *Paris japonica* (2C = 304.46 pg) (Pellicer et al. 2010). Although *N. pulchellum* does not attend every recommendation for being an ideal reference standard, its addition to the list of tropical reference standards, increases the coverage up to species with 2C value of ~150 pg. As our tests with *N. pulchellum* produced good results, its inclusion on the list may optimize future studies, decreasing the number of steps required for the quantification of giant genomes.

The most recent update of the Plant C-Value Database shows that only 4% of the estimated angiosperms species have genome size reports (Bennett and Leitch 2011). The same study shows that 77% of the known plant genome sizes have been provided by research studies based on North America and Europe, approx. five times

more than those provided by tropical labs (15.7% incl. South and Meso-America and India). Based on our survey of genome size studies published since 2012 this trend continues. From 259 results, only 44 studies were made by research groups located in tropical regions (approx. 17% of the total). We believe that our list of tropical reference standards can help to accelerate genome size studies in these regions, contributing to the ever-growing knowledge of plant genomes.

## CONCLUSION

We conclude by recommending the following species as reference standards for quantification of DNA by flow cytometry: *C. lanatus* cv. Crimson Sweet (2C = 0.86 pg), *V. unguiculata* cv. BRS Pujante (2C = 1.37 pg), *L. esculentum* cv. IPA-6 (2C = 2.04 pg), *P. crispum* cv. Graúda (2C = 4.15 pg), *A. cepa* cv. IPA-11 (2C = 35.22 pg) and *N. pulchellum* (2C = 48.57 pg). Future efforts for the amplification of this list should focus on potential reference standards that cover the 10 to 20 pg range, such as species of the genus *Capsicum* (mean 2C = 8.22 pg, <http://data.kew.org/cvalues/>, Bennett & Leitch 2011), widely cultivated in tropical regions.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE-APQ-2008-2.02/12) for financial support and a grant to LC by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

LC drafted the work, analyzed and interpreted data for the work and wrote the manuscript. PR, JF and APM analyzed and interpreted data for the work. NFM provided the plant material analyzed in this work. GS was involved in conception and design of the work, analysis and interpretation of data for work, and writing the manuscript.

## REFERENCES

- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Report* 9:208–218 . doi: 10.1007/BF02672069
- Barros e Silva A, Guerra M (2010) The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem* 85:115–125. doi: 10.3109/10520290903149596
- Bennett MD, Leitch IJ (2011) Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Ann Bot* 107:467–590 . doi: 10.1093/aob/mcq258
- Bennett MD, Leitch IJ (2005) Plant Genome Size Research: A Field In Focus. *Ann Bot* 95:1– 6 . doi: 10.1093/aob/mci001
- Bennett MD, Smith JB (1991) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 334:309–345 . doi: 10.1098/rstb.1991.0120
- Bilinski P, Albert PS, Berg JJ, et al (2017) Parallel Altitudinal Clines Reveal Adaptive Evolution Of Genome Size In *Zea mays*. . doi: 10.1101/134528
- Brown SC, Bourge M, Maunoury N, et al (2017) DNA Remodeling by Strict Partial Endoreplication in Orchids, an Original Process in the Plant Kingdom. *Genome Biol Evol* 9:1051–1071 . doi: 10.1093/gbe/evx063
- Camillo J, Leão AP, Alves AA, et al (2014) Reassessment of the Genome Size in *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifera*, and Its Interspecific Hybrid. *Genomics Insights* 7:GEI.S15522 . doi: 10.4137/GEI.S15522
- Das AB (1991) Genome analysis and variation of 4C DNA content in the subtribe Carinae. *Cytologia* 56:627–632 . doi: 10.1508/cytologia.56.627
- Delay, C (1949). Recherches sur la structure des noyaux quiescents chez les phanérogames. *Ver. Cytol. Cytophysiol. Veg.* 10: 103-228
- Dodsworth S, Leitch AR, Leitch IJ (2015) Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Curr Opin Genet Dev* 35:73–78 . doi: 10.1016/j.gde.2015.10.006

- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* 2:2233-44. doi: 10.1038/nprot.2007.310
- Doležel J, Bartos J (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Ann Bot* 95:99–110 . doi: 10.1093/aob/mci005
- Doležel J, Greilhuber J (2010) Nuclear genome size: are we getting closer? *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 77:635–642 . doi: 10.1002/cyto.a.20915
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, et al (1998) Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Ann Bot* 82:17–26 . doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a010312
- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol Plant* 85:625–631 . doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x
- Feitoza L, Costa L, Guerra M (2017) Condensation patterns of prophase/prometaphase chromosome are correlated with H4K5 histone acetylation and genomic DNA contents in plants. *PLOS ONE* 12:e0183341 . doi: 10.1371/journal.pone.0183341
- Gabrielan E, Zohary D (2004) Wild relatives of food crops native to Armenian and Nakhichevan. *Fl Medit* 14:5–80
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, et al (1983) Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science* 220:1049–1051. doi: 10.1126/science.220.4601.1049
- Galbraith DW, Lambert GM, Macas J, Dolezel J (2001) Analysis of Nuclear DNA Content and Ploidy in Higher Plants. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J, et al. (eds) *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
- Gregory, TR (2005) Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nature Reviews Genetics* 6, 700
- Greilhuber J (2005) Intraspecific Variation in Genome Size in Angiosperms: Identifying its Existence. *Ann Bot* 95:91–98. doi: 10.1093/aob/mci004

- Greilhuber J, Ebert I (1994) Genome size variation in *Pisum*. *Genome* 37:646-655. doi: 10.1139/g94-092
- Guerra M, Félix LP (2000) O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae), com ênfase na heterocromatina e nos sítios de DNAr. (The karyotype of *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae), with emphasis on the heterochromatin and rDNA sites. *Bol Soc Argent Bot* 35:283–289
- Hof J van't null (1965) Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants. *Exp Cell Res* 39:48–58
- Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, et al (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* 86:609–613
- Kelly LJ, Renny-Byfield S, Pellicer J, et al (2015) Analysis of the giant genomes of *Fritillaria* (Liliaceae) indicates that a lack of DNA removal characterizes extreme expansions in genome size. *New Phytol* 208:596–607 . doi: 10.1111/nph.13471
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Ann Bot* 100:875–888 . doi: 10.1093/aob/mcm152
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležal J, Santos C (2006) Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry. *Ann Bot* 98:679–689 . doi: 10.1093/aob/mcl141
- Marie D, Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* 78:41–51
- Masuzaki S, Shigyo M, Yamauchi N (2006) Complete assignment of structural genes involved in flavonoid biosynthesis influencing bulb color to individual chromosomes of the shallot (*Allium cepa* L.). *Genes Genet Syst* 81:255–263
- Michaelson MJ, Price HJ, Ellison JR, Johnston JS (1991) Comparison of Plant DNA Contents Determined by Feulgen Microspectrophotometry and Laser Flow Cytometry. *Am J Bot* 78:183 . doi: 10.2307/2445241
- Marchese C (2015) Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation* 3:297–309. doi: 10.1016/j.gecco.2014.12.008

Noirot M (2000) Nucleus–Cytosol Interactions—A Source of Stoichiometric Error in Flow Cytometric Estimation of Nuclear DNA Content in Plants. *Ann Bot* 86:309–316 . doi: 10.1006/anbo.2000.1187

Partec (2001) Flomax Operating Manual - Data Analysis. Münster, Germany; Author

Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ (2010) The largest eukaryotic genome of them all?: THE LARGEST EUKARYOTIC GENOME? *Bot J Linn Soc* 164:10–15 . doi: 10.1111/j.1095-8339.2010.01072.x

Pellicer J, Leitch IJ (2014) The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. In: Besse P (ed) *Molecular Plant Taxonomy*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 279–307

Puttick MN, Clark J, Donoghue PCJ (2015) Size is not everything: rates of genome size evolution, not C -value, correlate with speciation in angiosperms. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20152289 . doi: 10.1098/rspb.2015.2289

R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing, version 3.0.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna

Shapiro HM, Wiley InterScience (Service en ligne) (2005) *Practical flow cytometry*. Wiley- Liss, Hoboken, N.J.

Strelnikova SP (1999) Karyological study of tomatoes. *Citologija* 41:1084–1085

Suda J, Leitch IJ (2010) The quest for suitable reference standards in genome size research. *Cytometry A* 77A:717–720 . doi: 10.1002/cyto.a.20907

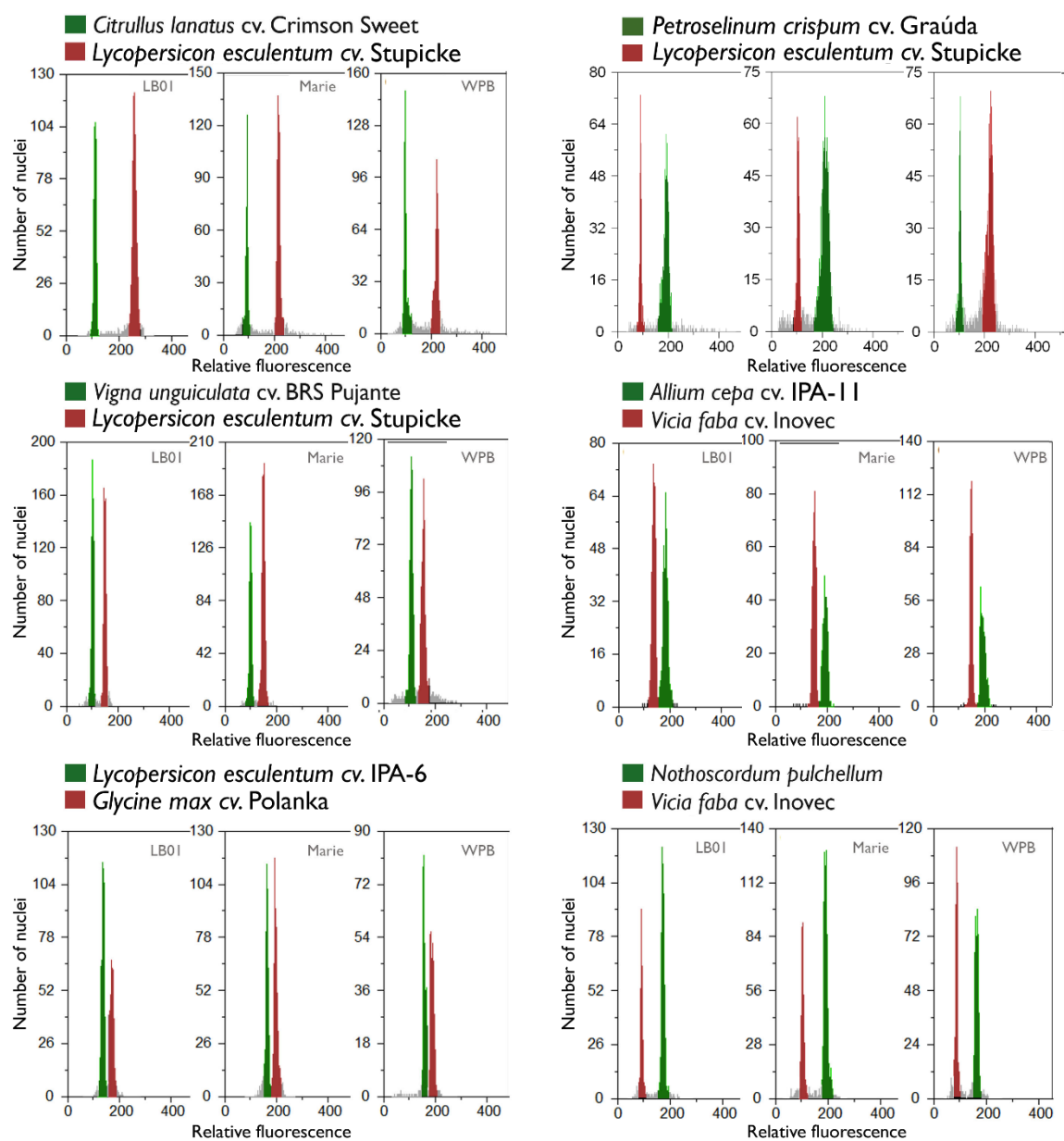
Yang X, Ying G, Shen M (2003) Comparative analysis of chromosomal karyotype for three species of *Vigna* savi plant. *J Tianjin Norm Univ Sci Ed* 23:23–26

Yokoya K, Roberts AV, Mottley J, Lewis R, Brandham PE (2000) Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany* 85: 557- 562

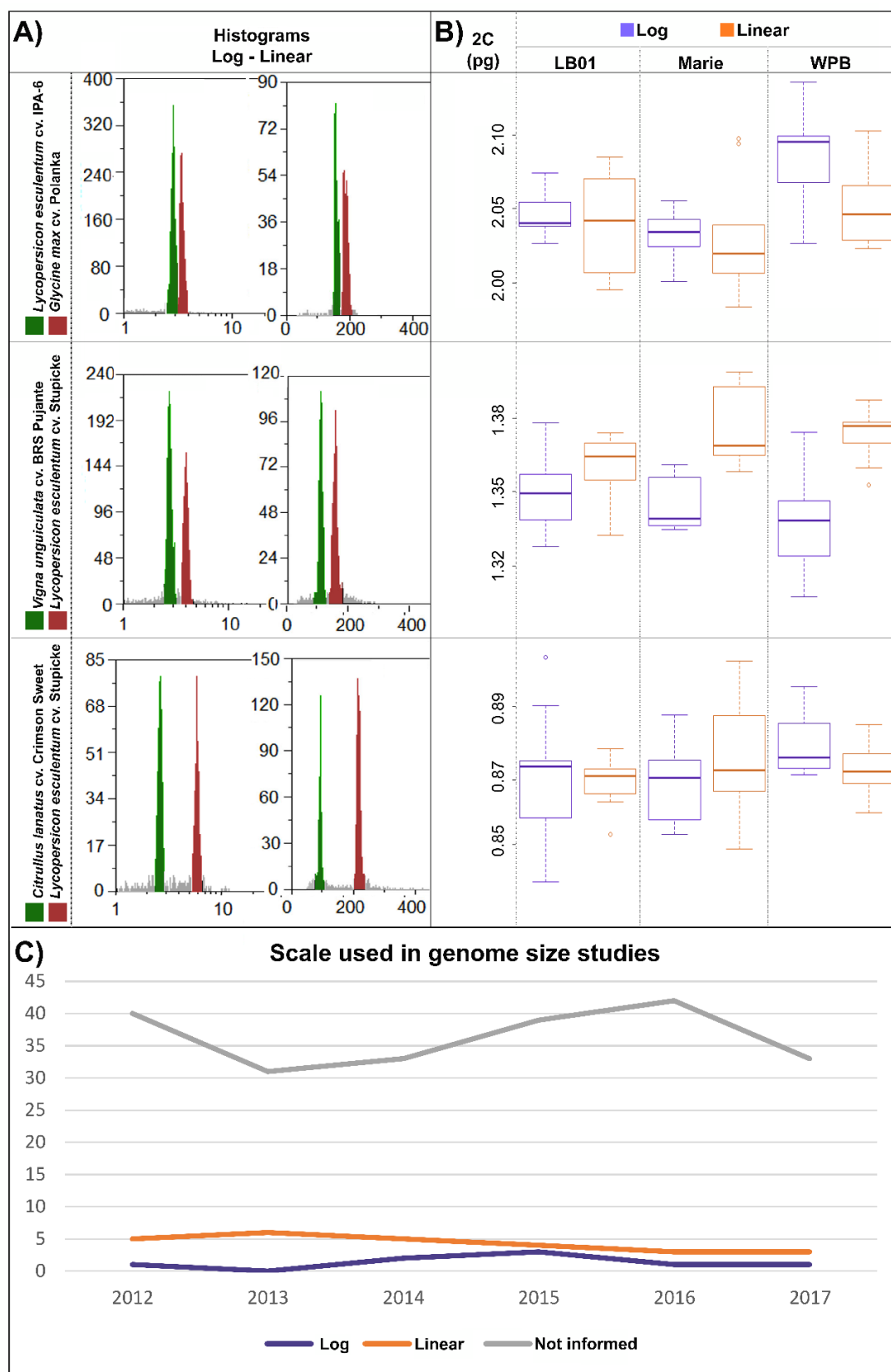
Zhao HJ, Yue JH, Li HX, Wei LJ (2000) Studies on karyotype of *Citrullus lanatus* and genetic relationships among varieties. *North Hortic* 22–23

**Table 1**–Genome size (2C) estimated for the target species using different buffers. CVs, Coefficient of variation between samples; sd, standard deviation

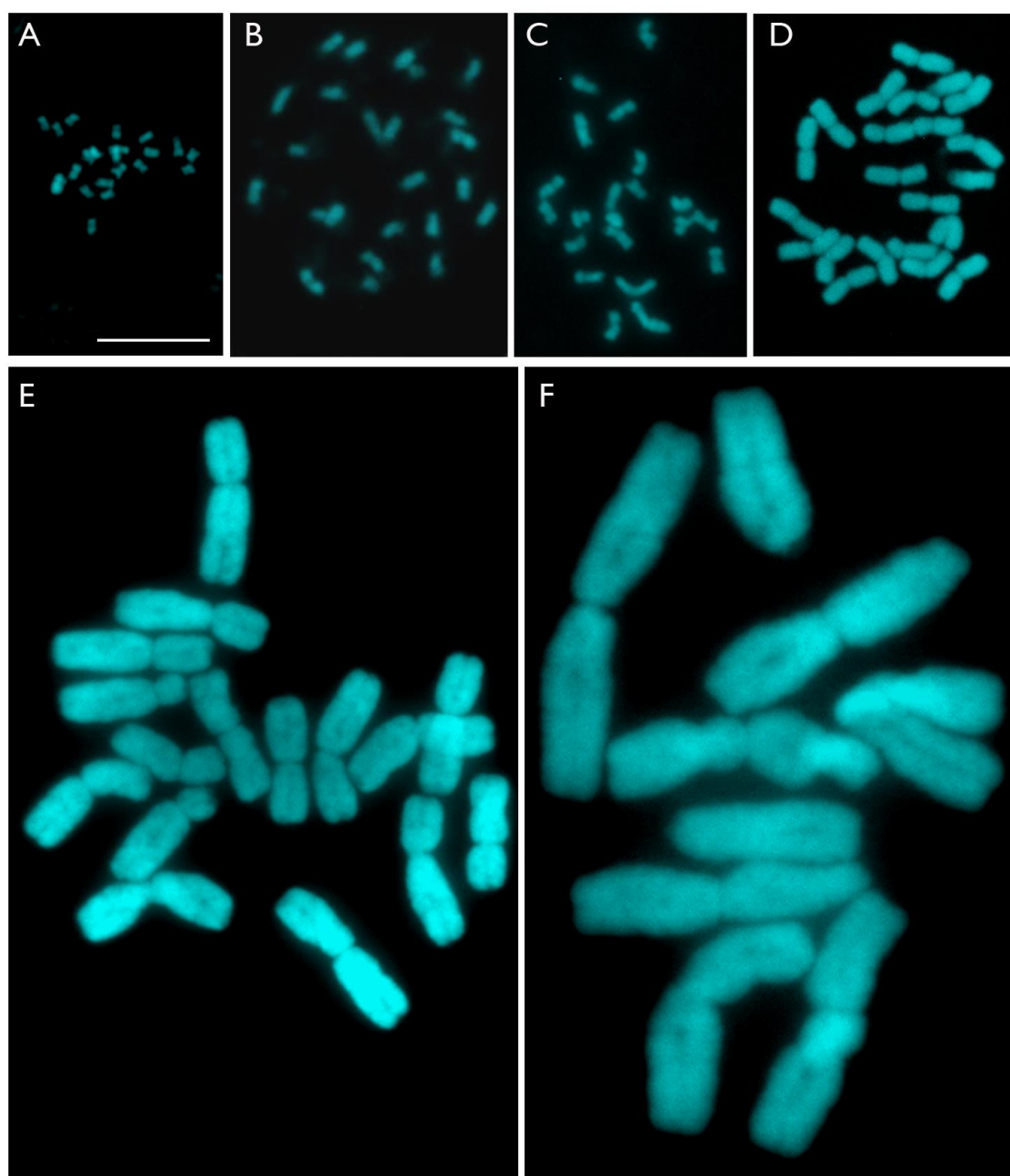
| Species                                                                   | Buffers         |       |                 |          |                 |      |                 |      |                 |      |                 |      | Reference<br>standard used                    |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|-----------------|----------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------------------------------------|
|                                                                           | LB01            |       | Marie           |          | WPB             |      | Galbraith       |      | Sysmex          |      | Mean            |      |                                               |
|                                                                           | 2C ±<br>sd      | SD(%) | 2C ±<br>sd      | SD       | 2C ± sd         | SD   | 2C ±<br>sd      | SD   | 2C ±<br>sd      | SD   | 2C ±<br>sd      | SD   |                                               |
| <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)<br>Matsum. & Nakai cv.<br>Crimson Sweet | 0.87 ±<br>0.01  | 0.89  | 0.88 ±<br>0.02  | 2.1<br>8 | 0.87 ±<br>0.01  | 1.02 | 0.88 ±<br>0.01  | 0.89 | 0.90 ±<br>0.01  | 0.93 | 0.88 ±<br>0.02  | 1.81 | <i>L. esculentum</i><br>Mill.cv.<br>Stupicke  |
| <i>Vigna unguiculata</i><br>L. cv. BRS Pujante                            | 1.36 ±<br>0.01  | 0.98  | 1.38 ±<br>0.02  | 1.2<br>1 | 1.37 ±<br>0.01  | 0.80 | 1.33 ±<br>0.01  | 0.72 | 1.36 ±<br>0.02  | 1.70 | 1.36 ±<br>0.02  | 1.51 | <i>L. esculentum</i><br>Mill. cv.<br>Stupicke |
| <i>Lycopersicon</i><br><i>esculentum</i> Mill. cv. IPA-<br>6              | 2.04 ±<br>0.03  | 1.65  | 2.03 ±<br>0.04  | 2.0<br>3 | 2.05 ±<br>0.03  | 1.39 | 2.06 ±<br>0.03  | 1.57 | 2.09 ±<br>0.02  | 1.07 | 2.05 ±<br>0.04  | 1.78 | <i>Glycine max</i><br>L.cv.<br>Polanka        |
| <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.)<br>Fuss cv. Graúda                    | 4.18 ±<br>0.07  | 1.60  | 4.13 ±<br>0.06  | 1.4<br>0 | 4.15 ±<br>0.09  | 2.16 | -               | -    | -               | -    | 4.15 ±<br>0.07  | 1.78 | <i>L. esculentum</i><br>Mill.cv.<br>Stupicke  |
| <i>Allium cepa</i> L. cv. IPA-11                                          | 35.38 ±<br>0.45 | 1.28  | 35.03 ±<br>0.70 | 2.0<br>1 | 35.24 ±<br>0.54 | 1.54 | -               | -    | -               | -    | 35.22 ±<br>0.57 | 1.62 | <i>Vicia faba</i> L.<br>cv. Inovec            |
| <i>Nothoscordum pulchellum</i><br>Kunth                                   | 48.46 ±<br>1.02 | 2.10  | 48.98 ±<br>1.11 | 2.2<br>6 | 48.26 ±<br>1.07 | 2.22 | 50.18 ±<br>0.28 | 0.55 | 50.34 ±<br>0.40 | 0.80 | 49.09 ±<br>1.19 | 2.44 | <i>V. faba</i> cv.<br>Inovec                  |



**Figure 1-** Histograms of relative fluorescence for samples prepared with different buffers for target specie (green) x internal standard (red).



**Figure 2** – A) Histograms of relative fluorescence for cultivars measured on log (left) and linear scale (right); B) Corresponding boxplots showing variation between measurements undertaken in log (purple) and linear (orange) for each buffer; C) Graphic showing the use of different scales in plant genome size studies since 2012 .



**Figure 3** – Metaphasic cells stained with DAPI of the species suggested as new internal standards: A) *Citrullus lanatus* cv. Crimson Sweet ( $2n = 22$ ), B) *Vigna unguiculata* cv. BRS Pujante ( $2n = 22$ ), C) *Lycopersicon esculentum* cv. IPA-6 ( $2n = 24$ ), D) *Petroselinum crispum* cv. Graúda ( $2n = 22$ ), E) *Allium cepa* cv. IPA-11 ( $2n = 16$ ) F) *Nothoscordum pulchellum* ( $2n = 10$ ). Bar in (A) represents 10  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Table 1** – List of plant genome size studies since 2012 according to the Scopus database. “Region” refers to geographical location of the research group (regions of temperate or tropical climates) and “Scale used” refers to the relative fluorescence scale used in the flow cytometry methodology.

| Publication                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Region    | Scale Used |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|
| Ågren JA, Greiner S, Johnson MTJ, Wright SI (2015) No evidence that sex and transposable elements drive genome size variation in evening primroses. <i>Evolution</i> 69:1053–1062 . doi: 10.1111/evo.12627                                                                                    | Temperate | N.I.       |
| Ahmadian M, Babaei A, Ahmadi N, Rasoli O (2017) Genome size diversity of some species of <i>Cephalanthera</i> from Iran. <i>Caryologia</i> 70:206–210 . doi: 10.1080/00087114.2017.1321310                                                                                                    | Temperate | N.I.       |
| Akiyama Y, Kimura K, Kubota A, et al (2015) Comparison of genome size in reed canarygrass ( <i>Phalaris arundinacea</i> L.) Exotic and putative native Japanese genotypes by flow cytometry. <i>Japan Agricultural Research Quarterly</i> 49:345–350 . doi: 10.6090/jarq.49.345               | Temperate | N.I.       |
| Ali M, Mujib A, Tonk D, Zafar N (2017) Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of <i>Coriandrum sativum</i> L. <i>Protoplasma</i> 254:343–352 . doi: 10.1007/s00709-016- 0954-2                                                                             | Tropical  | N.I.       |
| Aliyu OM (2012) Development of the flow cytometric protocol for ploidy analysis and determination of relative nuclear DNA content in cashew ( <i>Anacardium occidentale</i> Linn.). <i>American Journal of Biochemistry and Molecular Biology</i> 2:200–215 . doi: 10.3923/ajbmb.2012.200.215 | Temperate | N.I.       |
| Almeida E, Wanderley AM, Nollé F, et al (2016) A New Species of <i>Ameroglossum</i> (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. <i>Systematic Botany</i> 41:423–429 . doi: 10.1600/036364416X691740                                                                      | Tropical  | Log.*      |
| Angulo MB, Dematteis M (2013) Nuclear DNA content in some species of <i>Lessingianthus</i> (Vernonieae, Asteraceae) by flow cytometry. <i>Journal of Plant Research</i> 126:461–468 . doi: 10.1007/s10265-012-0539-x                                                                          | Temperate | N.I.       |
| Anjali N, Ganga KM, Nadiya F, et al (2016) Intraspecific variations in cardamom ( <i>Elettaria cardamomum</i> Maton): assessment of genomic diversity by flow cytometry, cytological studies and ISSR analysis. <i>SpringerPlus</i> 5: . doi: 10.1186/s40064-016-3226-x                       | Tropical  | N.I.       |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| Bai C, Alverson WS, Follansbee A, Waller DM (2012) New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. <i>Annals of Botany</i> 110:1623–1629 . doi: 10.1093/aob/mcs222                                                                                          | Temperate | N.I. |
| Bai C, Cao B, Li G, Mao M (2014) Ecological effects on phenotypic, cytological and biochemical diversity of <i>Cornus officinalis</i> germplasm resources in China and USA. <i>Biochemical Systematics and Ecology</i> 55:241–248 . doi: 10.1016/j.bse.2014.03.019                                 | Temperate | N.I. |
| Bainard JD, Bainard LD, Henry TA, et al (2012) A multivariate analysis of variation in genome size and endoreduplication in angiosperms reveals strong phylogenetic signal and association with phenotypic traits. <i>New Phytologist</i> 196:1240–1250 . doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04370.x    | Temperate | N.I. |
| Bainard JD, Forrest LL, Goffinet B, Newmaster SG (2013a) Nuclear DNA content variation and evolution in liverworts. <i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i> 68:619–627 . doi: 10.1016/j.ympev.2013.04.008                                                                                     | Temperate | N.I. |
| Bainard JD, Villarreal JC, Gregory R (2013b) Genome size increases in recently diverged hornwort clades1. <i>Genome</i> 56:431–435 . doi: 10.1139/gen-2013-0041                                                                                                                                    | Temperate | N.I. |
| Baniaga AE, Arrigo N, Barker MS (2016) The Small Nuclear Genomes of <i>Selaginella</i> Are Associated with a Low Rate of Genome Size Evolution. <i>Genome biology and evolution</i> 8:1516–1525 . doi: 10.1093/gbe/evw091                                                                          | Temperate | N.I. |
| Basak S, Kesari V, Ramesh AM, et al (2017) Assessment of genetic variation among nineteen turmeric cultivars of Northeast India: nuclear DNA content and molecular marker approach. <i>Acta Physiologiae Plantarum</i> 39: . doi: 10.1007/s11738-016-2341-1                                        | Tropical  | N.I. |
| Bationo-Kando P, Zongo J-D, Siljak-Yakovlev S (2016) First genome size assessment, heterochromatin and rDNA chromosome mapping in the genus <i>Sclerocarya</i> (Anacardiaceae): Insight into the new basic chromosome number. <i>Botany Letters</i> 163:11–17 . doi: 10.1080/12538078.2015.1132008 | Tropical  | N.I. |
| Baziz K, Benamara-Bellagha M, Pustahija F, et al (2014) First karyotype analysis, physical rDNA mapping, and genome size assessment in 4 North African <i>Astragalus</i> taxa (Fabaceae). <i>Turkish Journal of Botany</i> 38:1248–1258 . doi: 10.3906/bot-1405-40                                 | Temperate | N.I. |
| Bhowmick BK, Jha S (2015) Differential heterochromatin distribution, flow cytometric genome size and                                                                                                                                                                                               | Tropical  | N.I. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| meiotic behavior of chromosomes in three Cucurbitaceae species. Scientia Horticulturae 193:322–329 . doi: 10.1016/j.scienta.2015.07.006                                                                                                                                                                                                 |           |        |
| Bhowmick BK, Yamamoto M, Jha S (2016) Chromosomal localization of 45S rDNA, sex-specific C values, and heterochromatin distribution in <i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt. Protoplasma 253:201–209 . doi: 10.1007/s00709-015-0797-2                                                                                                     | Tropical  | N.I.   |
| Bose B, Kumaria S, Choudhury H, Tandon P (2016) Assessment of genetic homogeneity and analysis of phytomedicinal potential in micropropagated plants of <i>Nardostachys jatamansi</i> , a critically endangered, medicinal plant of alpine Himalayas. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 124:331–349 . doi: 10.1007/s11240-015-0897-x | Tropical  | N.I.   |
| Bou Dagher-Kharrat M, Abdel-Samad N, Douaihy B, et al (2013) Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. Plant Biosystems 147:1228–1237 . doi: 10.1080/11263504.2013.861530                                                                                                                            | Temperate | N.I.   |
| Burgess MB, Cushman KR, Doucette ET, et al (2014) Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in <i>Amelanchier</i> (Rosaceae). American Journal of Botany 101:1375–1387 . doi: 10.3732/ajb.1400113                                                                                               | Temperate | N.I.   |
| Cabezas JA, Morcillo M, Vélez MD, et al (2016) Haploids in conifer species: Characterization and chromosomal integrity of a maritime pine cell line. Forests 7: . doi: 10.3390/f7110274                                                                                                                                                 | Temperate | N.I.   |
| Cannarozzi G, Plaza-Wüthrich S, Esfeld K, et al (2014) Genome and transcriptome sequencing identifies breeding targets in the orphan crop tef ( <i>Eragrostis tef</i> ). BMC Genomics 15: . doi: 10.1186/1471-2164-15-581                                                                                                               | Tropical  | N.I.   |
| Carvalho GMA, Carvalho CR, Barreto RW, Evans HC (2014) Coffee rust genome measured using flow cytometry: Does size matter? Plant Pathology 63:1022–1026 . doi: 10.1111/ppa.12175                                                                                                                                                        | Tropical  | N.I.   |
| Carvalho GMA, Carvalho CR, Soares FAF (2017) Flow cytometry and cytogenetic tools in eucalypts: genome size variation × karyotype stability. Tree Genetics and Genomes 13: . doi: 10.1007/s11295-017-1186-0                                                                                                                             | Tropical  | Linear |

|                                                                                                                                                                                                                                                   |           |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Castelli M, Miller CH, Schmidt-Lebuhn AN (2017) Polyploidization and genome size evolution in Australian billy buttons ( <i>Craspedia</i> , Asteraceae: Gnaphalieae). International Journal of Plant Sciences 178:352–361 . doi: 10.1086/691460   | Temperate | N.I.   |
| Castillo A, Rebuffo M, Dalla Rizza M, et al (2012) Generation and characterization of interspecific hybrids of <i>Lotus uliginosus</i> × <i>Lotus corniculatus</i> . Crop Science 52:1572–1582 . doi: 10.2135/cropsci2011.07.0374                 | Temperate | N.I.   |
| Castro S, Romeiras MM, Castro M, et al (2013) Hidden diversity in wild <i>Beta</i> taxa from Portugal: Insights from genome size and ploidy level estimations using flow cytometry. Plant Science 207:72–78 . doi: 10.1016/j.plantsci.2013.02.012 | Temperate | Linear |
| Catalán P, Müller J, Hasterok R, et al (2012) Evolution and taxonomic split of the model grass <i>Brachypodium distachyon</i> . Annals of Botany 109:385–405 . doi: 10.1093/aob/mcr294                                                            | Temperate | N.I.   |
| Čertner M, Fenclova E, Kúr P, et al (2017) Evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations in an annual herb: Dispersal, local persistence and recurrent origins of polyploids. Annals of Botany 120:303– 315 . doi: 10.1093/aob/mcx032         | Temperate | N.I.   |
| Chalup L, Grabiele M, Neffa VS, Seijo G (2014) DNA content in South American endemic species of <i>Lathyrus</i> . Journal of Plant Research 127:469–480 . doi: 10.1007/s10265-014-0637-z                                                          | Temperate | N.I.   |
| Chen J, Liu X, Zhu L, Wang Y (2013a) Nuclear genome size estimation and karyotype analysis of <i>Lycium</i> species (Solanaceae). Scientia Horticulturae 151:46–50 . doi: 10.1016/j.scienta.2012.12.004                                           | Temperate | N.I.   |
| Chen S-C, Cannon CH, Kua C-S, et al (2014) Genome size variation in the Fagaceae and its implications for trees. Tree Genetics and Genomes 10:977–988 . doi: 10.1007/s11295-014-0736-y                                                            | Temperate | N.I.   |
| Chen W, Hasegawa DK, Arumuganathan K, et al (2015) Estimation of the whitefly <i>bemisia tabaci</i> genome size based on k-mer and flow cytometric analyses. Insects 6:704–715 . doi: 10.3390/insects6030704                                      | Temperate | N.I.   |
| Chen WH, Kao YL, Tang CY, et al (2013b) Estimating nuclear DNA content within 50 species of the genus <i>Phalaenopsis</i> Blume                                                                                                                   | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------|
| (Orchidaceae). <i>Scientia Horticulturae</i> 161:70–75 . doi: 10.1016/j.scienta.2013.06.045                                                                                                                                                                                                        |           |         |
| Choudhury RR, Basak S, Ramesh AM, Rangan L (2014) Nuclear DNA content of <i>Pongamia pinnata</i> L. and genome size stability of in vitro-regenerated plantlets. <i>Protoplasma</i> 251:703–709 . doi: 10.1007/s00709-013-0545-4                                                                   | Tropical  | N.I.    |
| Christin P-A, Wallace MJ, Clayton H, et al (2012) Multiple photosynthetic transitions, polyploidy, and lateral gene transfer in the grass subtribe Neurachninae. <i>Journal of Experimental Botany</i> 63:6297–6308 . doi: 10.1093/jxb/ers282                                                      | Temperate | N.I.    |
| Chumová Z, Krejčíková J, Mandáková T, et al (2015) Evolutionary and taxonomic implications of variation in nuclear genome size: Lesson from the grass genus <i>Anthoxanthum</i> (Poaceae). <i>PLoS ONE</i> 10: . doi: 10.1371/journal.pone.0133748                                                 | Temperate | N.I.    |
| Čížková J, Hříbová E, Christelová P, et al (2015) Molecular and cytogenetic characterization of wild <i>Musa</i> species. <i>PLoS ONE</i> 10: . doi: 10.1371/journal.pone.0134096                                                                                                                  | Tropical  | N.I.    |
| Coates BS, Alves AP, Wang H, et al (2012) Distribution of genes and repetitive elements in the <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> genome estimated using BAC sequencing. <i>Journal of Biomedicine and Biotechnology</i> 2012: . doi: 10.1155/2012/604076                                       | Temperate | N.I.    |
| Collevatti RG, Dornelas MC (2016) Clues to the evolution of genome size and chromosome number in <i>Tabebuia alliance</i> (Bignoniaceae). <i>Plant Systematics and Evolution</i> 302:601–607 . doi: 10.1007/s00606-016-1280-z                                                                      | Tropical  | N.I.    |
| Costa L, Oliveira Á, Carvalho-Sobrinho J, Souza G (2017) Comparative cytomolecular analyses reveal karyotype variability related to biogeographic and species richness patterns in Bombacoideae (Malvaceae). <i>Plant Systematics and Evolution</i> 303:1131–1144 . doi: 10.1007/s00606-017-1427-6 | Tropical  | Linear* |
| Cronk Q, Hidalgo O, Pellicer J, et al (2016) <i>Salix</i> transect of Europe: Variation in ploidy and genome size in willow-associated common nettle, <i>Urtica dioica</i> L. sens. lat., from Greece to arctic Norway. <i>Biodiversity Data Journal</i> 4: . doi: 10.3897/BDJ.4.e10003            | Temperate | N.I.    |
| Crosby K, Stokes TO, Latta RG (2014) Evolving californian genotypes of <i>Avena barbata</i> are derived from multiple                                                                                                                                                                              | Temperate | N.I.    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|
| introductions but still maintain substantial population structure. PeerJ 2014: . doi: 10.7717/peerj.633                                                                                                                                                                                        |           |       |
| Cuba-Díaz M, Cerda G, Rivera C, Gómez A (2017) Genome size comparison in <i>Colobanthus quitensis</i> populations show differences in species ploidy. Polar Biology 40:1475–1480 . doi: 10.1007/s00300-016- 2058-z                                                                             | Temperate | N.I.  |
| Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 114:149–159 . doi: 10.1007/s11240-013-0311-5                                                                          | Temperate | N.I.  |
| Da Silva RA, Souza G, Lemos LSL, et al (2017) Genome size, cytogenetic data and transferability of EST-SSRs markers in wild and cultivated species of the genus <i>Theobroma</i> L. (Byttnerioideae, Malvaceae). PLoS ONE 12: . doi: 10.1371/journal.pone.0170799                              | Tropical  | Log.* |
| Delaney JT, Baack EJ (2012) Intraspecific Chromosome Number Variation and Prairie Restoration-A Case Study in Northeast Iowa, U.S.A. Restoration Ecology 20:576–583 . doi: 10.1111/j.1526-100X.2011.00825.x                                                                                    | Temperate | N.I.  |
| Denaeghel H, Van Laere K, Leus L, et al (2017) Interspecific hybridization in <i>Sarcococca</i> supported by analysis of ploidy level, genome size and genetic relationships. Euphytica 213: . doi: 10.1007/s10681-017-1934-0                                                                  | Temperate | N.I.  |
| Drapikowska M, Susek K, Hasterok R, et al (2013) Variability of stomata and 45S and 5S rDNAs loci characteristics in two species of <i>Anthoxanthum</i> genus: <i>A. aristatum</i> and <i>A. odoratum</i> (Poaceae). Acta Biologica Hungarica 64:352–363 . doi: 10.1556/ABiol.64.2013.3.8      | Temperate | N.I.  |
| Du Q, Sui Z, Chang L, et al (2016) Genome size of <i>Alexandrium catenella</i> and <i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> estimated by flow cytometry. Journal of Ocean University of China 15:704–710 . doi: 10.1007/s11802-016-2988-7                                                           | Temperate | N.I.  |
| Duchoslav M, Šafářová L, Jandová M (2013) Role of adaptive and non-adaptive mechanisms forming complex patterns of genome size variation in six cytotypes of polyploid <i>Allium oleraceum</i> (Amaryllidaceae) on a continental scale. Annals of Botany 111:419–431 . doi: 10.1093/aob/mcs297 | Temperate | N.I.  |
| Ekrt L, Koutecký P (2016) Between sexual and apomictic: Unexpectedly variable sporogenesis and production of viable                                                                                                                                                                            | Temperate | N.I.  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------|
| polyhaploids in the pentaploid fern of the <i>Dryopteris affinis</i> agg. (Dryopteridaceae).<br>Annals of Botany 117:97–106 . doi: 10.1093/aob/mcv152                                                                                                                                                           |           |         |
| Faisal M, Alatar AA, Hegazy AK, et al (2014) Thidiazuron induced in vitro multiplication of <i>Mentha arvensis</i> and evaluation of genetic stability by flow cytometry and molecular markers. Industrial Crops and Products 62:100–106 . doi: 10.1016/j.indcrop.2014.08.019                                   | Temperate | N.I.    |
| Faux A-M, Berhin A, Dauguet N, Bertin P (2014) Sex chromosomes and quantitative sex expression in monoecious hemp ( <i>Cannabis sativa</i> L.). Euphytica 196:183–197 . doi: 10.1007/s10681-013-1023-y                                                                                                          | Temperate | N.I.    |
| Feitoza L, Costa L, Guerra M (2017) Condensation patterns of prophase/prometaphase chromosome are correlated with H4K5 histone acetylation and genomic DNA contents in plants. PLOS ONE 12:e0183341 . doi: 10.1371/journal.pone.0183341                                                                         | Tropical  | Linear* |
| Feng RJ, Wang X, Tao M, et al (2017) Genome size and identification of abundant repetitive sequences in <i>Vallisneria spirulosa</i> . PeerJ 2017: . doi: 10.7717/peerj.3982                                                                                                                                    | Temperate | N.I.    |
| Fleischmann A, Michael TP, Rivadavia F, et al (2014) Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus <i>Genlisea</i> (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. Annals of Botany 114:1651–1663 . doi: 10.1093/aob/mcu189                  | Temperate | N.I.    |
| Fridley JD, Craddock A (2015) Contrasting growth phenology of native and invasive forest shrubs mediated by genome size. New Phytologist 207:659–668 . doi: 10.1111/nph.13384                                                                                                                                   | Temperate | N.I.    |
| Fujito S, Takahata S, Suzuki R, et al (2015) Evidence for a common origin of homomorphic and heteromorphic sex chromosomes in distinct <i>Spinacia</i> species. G3: Genes, Genomes, Genetics 5:1663–1673 . doi: 10.1534/g3.115.018671                                                                           | Temperate | N.I.    |
| Fyad-Lameche F-Z, Iantcheva A, Siljak-Yakovlev S, Brown SC (2016) Chromosome number, genome size, seed storage protein profile and competence for direct somatic embryo formation in Algerian annual <i>Medicago</i> species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 124:531–540 . doi: 10.1007/s11240-015-0912-2 | Temperate | Linear  |
| Galbraith DW (2014) Endoreduplicative standards for calibration of flow cytometric C-Value measurements.                                                                                                                                                                                                        | Temperate | N.I.    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |           |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Cytometry Part A 85:368–374 . doi: 10.1002/cyto.a.22440                                                                                                                                                                                                                                                  |           |        |
| Galbraith DW, Lambert GM (2012a) High-throughput monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. <i>Methods in Molecular Biology</i> 918:311–325 . doi: 10.1007/978-1-61779-995-2_16                                                                                                        | Temperate | N.I.   |
| Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, et al (2016) Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of <i>Paspalum</i> (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. <i>Journal of Plant Research</i> 129:697–710 . doi: 10.1007/s10265-016-0813-4                            | Temperate | N.I.   |
| Garcia S, Leitch IJ, Anadon-Rosell A, et al (2014) Recent updates and developments to plant genome size databases. <i>Nucleic Acids Research</i> 42:D1159–D1166 . doi: 10.1093/nar/gkt1195                                                                                                               | Temperate | N.I.   |
| Gillooly DA, Ranney TG (2015) Genome sizes and ploidy levels in the genus <i>Kalmia</i> . <i>HortScience</i> 50:1426–1428                                                                                                                                                                                | Temperate | N.I.   |
| Girón V, Garnatje T, Vallès J, et al (2012) Geographical Distribution of Diploid and Tetraploid Cytotypes of <i>Thymus</i> sect. <i>Mastichina</i> (Lamiaceae) in the Iberian Peninsula, Genome Size and Evolutionary Implications. <i>Folia Geobotanica</i> 47:441–460 . doi: 10.1007/s12224-012-9126-0 | Temperate | Linear |
| Gitaí J, Paule J, Zizka G, et al (2014) Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: Additional data and critical review. <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i> 176:349–368 . doi: 10.1111/boj.12211                                                                                    | Tropical  | N.I.   |
| Gomes SSL, Saldanha CW, Neves CS, et al (2014) Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen. <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 118:45–56 . doi: 10.1007/s11240-014-0460-1                                                           | Tropical  | N.I.   |
| Greilhuber J, Leitch IJ (2013b) Genome size and the phenotype                                                                                                                                                                                                                                            | Temperate | N.I.   |
| Gu AX, Zhao JJ, Li LM, et al (2016) Analyses of phenotype and ARGOS and ASY1 expression in a ploidy Chinese cabbage series derived from one haploid. <i>Breeding Science</i> 66:161–168 . doi: 10.1270/jsbbs.66.161                                                                                      | Temperate | N.I.   |
| Guimarães G, Cardoso L, Oliveira H, et al (2012) Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant <i>Catharanthus roseus</i> (L.) g. don. <i>AoB PLANTS</i> 12: . doi: 10.1093/aobpla/pls002                                                                                          | Temperate | Linear |
| Gunn BF, Baudouin L, Beulé T, et al (2015) Ploidy and domestication                                                                                                                                                                                                                                      | Tropical  | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| are associated with genome size variation in palms. American Journal of Botany 102:1625–1633 . doi: 10.3732/ajb.1500164                                                                                                                                                                        |           |        |
| Guo SL, Yu J, Li DD, et al (2015) DNA C-values of 138 herbaceous species and their biological significance. Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica 35:6516–6529 . doi: 10.5846/stxb201406111208                                                                                                | Temperate | N.I.   |
| Gurushidze M, Fuchs J, Blattner FR (2012) The evolution of genome size variation in drumstick onions ( <i>Allium</i> subgenus <i>Melanocrommyum</i> ). Systematic Botany 37:96–104 . doi: 10.1600/036364412X616675                                                                             | Temperate | N.I.   |
| Gwinner R, Setotaw TA, Rodrigues FA, et al (2016) Population structure of <i>Annona crassiflora</i> : An endemic plant species of the Brazilian Cerrado. Genetics and Molecular Research 15: . doi: 10.4238/gmr15049137                                                                        | Tropical  | N.I.   |
| Hajrudinović A, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, et al (2015) When sexual meets apomict: Genome size, ploidy level and reproductive mode variation of <i>Sorbus aria</i> s.l. and <i>S. austriaca</i> (Rosaceae) in Bosnia and Herzegovina. Annals of Botany 116:301–312 . doi: 10.1093/aob/mcv093 | Temperate | Log.   |
| Hanušová K, Ekrt L, Vít P, et al (2014) Continuous morphological variation correlated with genome size indicates frequent introgressive hybridization among <i>Diphasiastrum</i> species (Lycopodiaceae) in Central Europe. PLoS ONE 9: . doi: 10.1371/journal.pone.0099552                    | Temperate | N.I.   |
| Henry TA, Bainard JD, Newmaster SG (2015) Genome size evolution in Ontario ferns (Polypodiidae): Evolutionary correlations with cell size, spore size, and habitat type and an absence of genome downsizing. Genome 57:555–566 . doi: 10.1139/gen-2014-0090                                    | Temperate | N.I.   |
| Hidalgo O, Garcia S, Garnatje T, et al (2015a) Genome size in aquatic and wetland plants: fitting with the large genome constraint hypothesis with a few relevant exceptions. Plant Systematics and Evolution 301:1927–1936 . doi: 10.1007/s00606-015-1205-2                                   | Temperate | Linear |
| Hidalgo O, Vallès J, Romo A, et al (2015b) Genome size variation in gymnosperms under different growth conditions. Caryologia 68:92–96 . doi: 10.1080/00087114.2015.1024546                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |
| Horáček J, Švábová L, Šarhanová P, Lebeda A (2013) Variability for resistance to <i>Fusarium solani</i> culture filtrate and fusaric acid among somaclones in pea.                                                                                                                             | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |           |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| Biologia Plantarum 57:133–138 . doi: 10.1007/s10535-012-0131-1                                                                                                                                                                                                                                        |           |      |
| Huang H, Tong Y, Zhang Q-J, Gao L-Z (2013) Genome Size Variation among and within <i>Camellia</i> Species by Using Flow Cytometric Analysis. PLoS ONE 8: . doi: 10.1371/journal.pone.0064981                                                                                                          | Temperate | N.I. |
| Iaffaldano BJ, Zhang Y, Cardina J, Cornish K (2017) Genome size variation among common dandelion accessions informs their mode of reproduction and suggests the absence of sexual diploids in North America. Plant Systematics and Evolution 303:719–725 . doi: 10.1007/s00606-017-1402-2             | Temperate | N.I. |
| Ilut DC, Sanchez PL, Costich DE, et al (2015) Genomic diversity and phylogenetic relationships in the genus <i>Parthenium</i> (Asteraceae). Industrial Crops and Products 76:920–929 . doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.035                                                                             | Tropical  | N.I. |
| Irimia R-E, Montesinos D, Eren O, et al (2017) Extensive analysis of native and non-native <i>Centaurea solstitialis</i> L. Populations across the world shows no traces of polyploidization. PeerJ 2017: . doi: 10.7717/peerj.3531                                                                   | Temperate | N.I. |
| Ivanova T, Dimitrova D, Gushev C, et al (2015) <i>Ex situ</i> conservation of <i>Ruscus aculeatus</i> L. - Ruscogenin biosynthesis, genome-size stability and propagation traits of tissue-cultured clones. Biotechnology and Biotechnological Equipment 29:27–32 . doi: 10.1080/13102818.2014.984976 | Temperate | N.I. |
| Izuno A, Hatakeyama M, Nishiyama T, et al (2016) Genome sequencing of <i>Metrosideros polymorpha</i> (Myrtaceae), a dominant species in various habitats in the Hawaiian Islands with remarkable phenotypic variations. Journal of Plant Research 129:727–736 . doi: 10.1007/s10265-016-0822-3        | Temperate | N.I. |
| Jersáková J, Trávníček P, Kubátová B, et al (2013) Genome size variation in Orchidaceae subfamily Apostasioideae: Filling the phylogenetic gap. Botanical Journal of the Linnean Society 172:95–105 . doi: 10.1111/boj.12027                                                                          | Temperate | N.I. |
| Jevremović S, Lojić M, Jeknić Z, et al (2015) In vitro propagation of <i>Iris reichenbachii</i> Heuff. and clonal fidelity of regenerated plants. Botanica Serbica 39:129–136                                                                                                                         | Temperate | N.I. |
| Jourdana P, Zale P, Stieve S (2015) Germplasm characterization for <i>Phlox</i> , <i>Rudbeckia</i> and <i>Coreopsis</i> :                                                                                                                                                                             | Temperate | N.I. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Determination of genome size by flow cytometry. Acta Horticulturae 1104:349–355 . doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1104.52                                                                                                                                              |           |        |
| Kabatova K, Vit P, Suda J (2014) Species boundaries and hybridization in central-European <i>Nymphaea</i> species inferred from genome size and morphometric data. Preslia 86:131–154                                                                                | Temperate | N.I.   |
| Kalinka A, Achrem M, Poter P (2017) The DNA methylation level against the background of the genome size and the heterochromatin content in some species of the genus <i>Secale</i> L. PeerJ 2017: . doi: 10.7717/peerj.2889                                          | Temperate | N.I.   |
| Kang M, Tao J, Wang J, et al (2014) Adaptive and nonadaptive genome size evolution in Karst endemic flora of China. New Phytologist 202:1371–1381 . doi: 10.1111/nph.12726                                                                                           | Temperate | N.I.   |
| Kharrat-Souissi A, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Chaieb M (2013) Cytogeography of <i>Cenchrus ciliaris</i> (Poaceae) in Tunisia. Folia Geobotanica 48:95–113 . doi: 10.1007/s12224-012-9137-x                                                                         | Temperate | Linear |
| Kim KM, Park J-H, Bhattacharya D, Yoon HS (2014) Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:333–345 . doi: 10.1099/ijs.0.054221-0             | Temperate | N.I.   |
| Kim S, Rayburn AL, Boe A, Lee DK (2012a) Neopolyploidy in <i>Spartina pectinata</i> Link: 1. Morphological analysis of tetraploid and hexaploid plants in a mixed natural population. Plant Systematics and Evolution 298:1073–1083 . doi: 10.1007/s00606-012-0617-5 | Temperate | N.I.   |
| Kim S, Rayburn AL, Parrish A, Lee DK (2012b) Cytogeographic Distribution and Genome Size Variation in Prairie Cordgrass ( <i>Spartina pectinata</i> Bosc ex Link). Plant Molecular Biology Reporter 30:1073–1079 . doi: 10.1007/s11105-012-0414-x                    | Temperate | N.I.   |
| Kolař F, Lučanová M, Koutecký P, et al (2014) Spatio-ecological segregation of diploid and tetraploid cytotypes of <i>Galium valdepiosum</i> in central Europe. Preslia 86:155–178                                                                                   | Temperate | N.I.   |
| Kolár F, Lucanová M, Teitel J, et al (2012) Glycerol-treated nuclear suspensions—an efficient preservation method for flow cytometric analysis of plant samples. Chromosome Research 20:303–315 . doi: 10.1007/s10577-012-9277-0                                     | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Kolář F, Lučanová M, Vít P, et al (2013) Diversity and endemism in deglaciated areas: Ploidy, relative genome size and niche differentiation in the <i>Galium pusillum</i> complex (Rubiaceae) in Northern and Central Europe. <i>Annals of Botany</i> 111:1095–1108 . doi: 10.1093/aob/mct074          | Temperate | N.I.   |
| Kolarčík V, Zozomová-Lihová J, Ducár E, Mártonfi P (2014) Evolutionary significance of hybridization in <i>Onosma</i> (Boraginaceae): Analyses of stabilized hemisexual odd polyploids and recent sterile hybrids. <i>Biological Journal of the Linnean Society</i> 112:89–107 . doi: 10.1111/bij.12270 | Temperate | N.I.   |
| Konieczny R, Sliwinska E, Pilarska M, Tuleja M (2012) Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in <i>Trifolium nigrescens</i> Viv. <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 109:131–141 . doi: 10.1007/s11240-011-0081-x                                             | Temperate | Linear |
| Kreiner JM, Kron P, Husband BC (2017) Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. <i>New Phytologist</i> 214:879–889 . doi: 10.1111/nph.14423                                                       | Temperate | N.I.   |
| Kron P (2015) Endopolyploidy, genome size, and flow cytometry. <i>Cytometry Part A</i> 87:887–889 . doi: 10.1002/cyto.a.22718                                                                                                                                                                           | Temperate | N.I.   |
| Kron P, Husband BC (2012) Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: Improved methodology and applications. <i>Annals of Botany</i> 110:1067–1078 . doi: 10.1093/aob/mcs167                                                                                                                   | Temperate | Linear |
| Kuo L-Y, Huang Y-J, Chang J, et al (2017) Evaluating the spore genome sizes of ferns and lycophytes: a flow cytometry approach. <i>New Phytologist</i> 213:1974–1983 . doi: 10.1111/nph.14291                                                                                                           | Temperate | N.I.   |
| Kúr P, Štech M, Koutecký P, Trávníček P (2012) Morphological and cytological variation in <i>Spergularia echinosperma</i> and <i>S. rubra</i> , and notes on potential hybridization of these two species. <i>Preslia</i> 84:905–924                                                                    | Temperate | N.I.   |
| Kuta E, Jedrzejczyk-Korycińska M, Cieślak E, et al (2014) Morphological versus genetic diversity of <i>Viola reichenbachiana</i> and <i>V. riviniana</i> (sect. <i>Viola</i> , Violaceae) from soils differing in heavy metal content. <i>Plant Biology</i> 16:924–934 . doi: 10.1111/plb.12143         | Temperate | N.I.   |
| Kynast RG, Joseph JA, Pellicer J, et al (2014) Chromosome behavior at the base of the angiosperm radiation: Karyology of <i>Trithuria</i>                                                                                                                                                               | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                         |           |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| <i>submersa</i> (Hydatellaceae, Nymphaeales). American Journal of Botany 101:1447–1455 . doi: 10.3732/ajb.1400050                                                                                                                                       |           |        |
| Lattier JD, Contreras RN (2017) Ploidy and genome size in lilac species, cultivars, and interploid hybrids. Journal of the American Society for Horticultural Science 142:355–366 . doi: 10.21273/JASHS04189-17                                         | Temperate | N.I.   |
| Lattier JD, Ranney TG, Fantz PR, Avent T (2014) Identification, nomenclature, genome sizes, and ploidy levels of <i>Liriope</i> and <i>Ophiopogon</i> taxa. HortScience 49:145–151                                                                      | Temperate | N.I.   |
| Layton DJ, Kellogg EA (2014) Morphological, phylogenetic, and ecological diversity of the new model species <i>Setaria viridis</i> (Poaceae: PANICEAE) and its close relatives. American Journal of Botany 101:539–557 . doi: 10.3732/ajb.1300428       | Temperate | N.I.   |
| Li X, Hu D, Luo M, et al (2013) Nuclear DNA content variation of three <i>Miscanthus</i> species in China. Genes and Genomics 35:13–20 . doi: 10.1007/s13258-013-0063-y                                                                                 | Temperate | N.I.   |
| Lipnerová I, Bureš P, Horová L, Šmarda P (2013) Evolution of genome size in <i>Carex</i> (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition. Annals of Botany 111:79–94 . doi: 10.1093/aob/mcs239                               | Temperate | N.I.   |
| Liu M-S, Kuo TC-Y, Ko C-Y, et al (2016) Genomic and transcriptomic comparison of nucleotide variations for insights into bruchid resistance of mungbean ( <i>Vigna radiata</i> [L.] R. Wilczek). BMC Plant Biology 16: . doi: 10.1186/s12870-016-0736-1 | Temperate | N.I.   |
| Long Q, Rabanal FA, Meng D, et al (2013) Massive genomic variation and strong selection in <i>Arabidopsis thaliana</i> lines from Sweden. Nature Genetics 45:884–890 . doi: 10.1038/ng.2678                                                             | Temperate | N.I.   |
| Loureiro J, Castro M, de Oliveira JC, et al (2013) Genome size variation and polyploidy incidence in the alpine flora from Spain. Anales del Jardin Botanico de Madrid 70:39–47 . doi: 10.3989/ajbm.2350                                                | Temperate | Linear |
| Loureiro J, Castro S (2015) The rising world of flow cytometric analysis of pollen grains. Cytometry Part A 87:885–886 . doi: 10.1002/cyto.a.22700                                                                                                      | Temperate | N.I.   |
| Makowczyńska J, Sliwinska E, Kalemba D, et al (2016) In vitro propagation, DNA content and essential                                                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |           |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| oil composition of <i>Teucrium scorodonia</i> L. ssp. <i>scorodonia</i> . Plant Cell, Tissue and Organ Culture 127: . doi: 10.1007/s11240-016-1024-3                                                                                                                                                                       |           |      |
| Mandák B, Krak K, Vít P, et al (2016) How genome size variation is linked with evolution within <i>Chenopodium sensu lato</i> . Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 23:18–32 . doi: 10.1016/j.ppees.2016.09.004                                                                                       | Temperate | N.I. |
| Mandák B, Trávníček P, Paštová L, Kořínková D (2012) Is hybridization involved in the evolution of the <i>Chenopodium album</i> aggregate? An analysis based on chromosome counts and genome size estimation. Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 207:530–540 . doi: 10.1016/j.flora.2012.03.010 | Temperate | N.I. |
| Markova DN, Mason-Gamer RJ (2015) Diversity, abundance, and evolutionary dynamics of Pong-like transposable elements in Triticeae. Molecular Phylogenetics and Evolution 93:318–330 . doi: 10.1016/j.ympev.2015.07.008                                                                                                     | Temperate | N.I. |
| Marques I, Nieto Feliner G, Martins-Loução MA, Fuertes Aguilar J (2012) Genome size and base composition variation in natural and experimental <i>Narcissus</i> (Amaryllidaceae) hybrids. Annals of Botany 109:257–264 . doi: 10.1093/aob/mcr282                                                                           | Tropical  | N.I. |
| Mcintyre PJ (2012) Cyto geography and genome size variation in the <i>Claytonia perfoliata</i> (Portulacaceae) polyploid complex. Annals of Botany 110:1195–1203 . doi: 10.1093/aob/mcs187                                                                                                                                 | Temperate | N.I. |
| Mickelson-Young L, Wear E, Mulvaney P, et al (2016) A flow cytometric method for estimating S- phase duration in plants. Journal of Experimental Botany 67:6077–6087 . doi: 10.1093/jxb/erw367                                                                                                                             | Temperate | N.I. |
| Moon Y-H, Cha Y-L, Choi Y-H, et al (2013) Diversity in ploidy levels and nuclear DNA amounts in Korean <i>Miscanthus</i> species. Euphytica 193:317–326 . doi: 10.1007/s10681-013-0910-6                                                                                                                                   | Temperate | N.I. |
| Moyers BT, Rieseberg LH (2013) Divergence in gene expression is uncoupled from divergence in coding sequence in a secondarily woody sunflower. International Journal of Plant Sciences 174:1079–1089 . doi: 10.1086/671197                                                                                                 | Temperate | N.I. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Mujib A, Ali M, Tonk D, Zafar N (2017) Nuclear 2C DNA and genome size analysis in somatic embryo regenerated gladiolus plants using flow cytometry. <i>Advances in Horticultural Science</i> 31:165–174 . doi: 10.13128/ahs-21956                                                                  | Tropical  | N.I.   |
| Nath S, Jha TB, Mallick SK, Jha S (2014a) Karyological relationships in Indian species of <i>Drimys</i> based on fluorescent chromosome banding and nuclear DNA amount. <i>Protoplasma</i> 252:283–299 . doi: 10.1007/s00709-014-0679-z                                                            | Tropical  | N.I.   |
| Nath S, Mallick SK, Jha S (2014b) An improved method of genome size estimation by flow cytometry in five mucilaginous species of Hyacinthaceae. <i>Cytometry Part A</i> 85:833–840 . doi: 10.1002/cyto.a.22489                                                                                     | Tropical  | N.I.   |
| Neto MF, Pereira TNS, Geronimo IGC, et al (2016) Coconut genome size determined by flow cytometry: Tall versus Dwarf types. <i>Genetics and Molecular Research</i> 15: . doi: 10.4238/gmr.15017470                                                                                                 | Tropical  | Linear |
| Ni J, He B, Wang W, Yu K (2015) Flow Cytometric Analysis of Genome Size in <i>Atractylodes lancea</i> . <i>Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials</i> 38:1153–1156                                                                                                   | Temperate | N.I.   |
| Niketić M, Siljak-Yakovlev S, Frajman B, et al (2013) Towards resolving the systematics of <i>Cerastium</i> subsection <i>Cerastium</i> (Caryophyllaceae): A cytogenetic approach. <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i> 172:205–224 . doi: 10.1111/boj.12050                            | Temperate | N.I.   |
| Nitthaisong P, Ishigaki G, Tanaka H, Akashi R (2016) Chromosome number, genomic variation, and molecular markers to assess genetic diversity of <i>Brachiaria</i> species. <i>Crop Science</i> 56:312–321 . doi: 10.2135/cropsci2015.04.0203                                                       | Temperate | N.I.   |
| Nosrati H (2015) Relationship between ploidy level and genome size in strawberries. <i>Plant Biosystems</i> 149:1036–1041 . doi: 10.1080/11263504.2014.941036                                                                                                                                      | Temperate | N.I.   |
| Ochatt S, Conreux C, Smýkalová I, et al (2016) Developing biotechnology tools for ‘beautiful’ vavilovia ( <i>Vavilovia formosa</i> ), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 127:637–648 . doi: 10.1007/s11240-016-1133-z | Temperate | N.I.   |
| Ochatt SJ, Conreux C, Jacas L (2013) Flow cytometry distinction between species and between landraces within <i>Lathyrus</i> species and assessment of true-to-typeness of in vitro regenerants. <i>Plant</i>                                                                                      | Temperate | Linear |

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |           |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Systematics and Evolution 299:75–85 . doi: 10.1007/s00606-012-0704-7                                                                                                                                                                                                       |           |        |
| Olanj N, Garnatje T, Sonboli A, et al (2015) The striking and unexpected cytogenetic diversity of genus <i>Tanacetum</i> L. (Asteraceae): A cytometric and fluorescent in situ hybridisation study of Iranian taxa. BMC Plant Biology 15: . doi: 10.1186/s12870-015-0564-8 | Temperate | Linear |
| Oliveira ACL, Pasqual M, Bruzi AT, et al (2015) Flow cytometry reliability analysis and variations in sugarcane DNA content. Genetics and Molecular Research 14:7172–7183 . doi: 10.4238/2015.June.29.11                                                                   | Tropical  | Log.   |
| Olšovská K, Perný M, Španiel S, Šingliarová B (2012) Nuclear DNA content variation among perennial taxa of the genus <i>Cyanus</i> (Asteraceae) in Central Europe and adjacent areas. Plant Systematics and Evolution 298:1463–1482 . doi: 10.1007/s00606-012-0650-4       | Temperate | N.I.   |
| Omondi EO, Debener T, Linde M, et al (2017) Mating biology, nuclear DNA content and genetic diversity in spider plant ( <i>Cleome gynandra</i> ) germplasm from various African countries. Plant Breeding 136:578–589 . doi: 10.1111/pbr.12485                             | Tropical  | N.I.   |
| Palomino G, Martínez J, Cepeda-Cornejo V, Pimienta-Barrios E (2012) Nuclear genome size and cytotype analysis in <i>Agave cupreata</i> Trel. & Berger (Agavaceae). Caryologia 65:281–294 . doi: 10.1080/00087114.2012.752915                                               | Tropical  | N.I.   |
| Palomino G, Martínez J, Méndez I, et al (2015) Nuclear genome size and cytotype analysis in <i>Agave parviflora</i> Torr. subsp. <i>flexiflora</i> Gentry (Asparagales, Asparagaceae). Caryologia 68:159–168 . doi: 10.1080/00087114.2015.1032575                          | Tropical  | N.I.   |
| Palomino G, Martínez J, Méndez I, et al (2016) Nuclear genome size, ploidy level and endopolyploidy pattern in six species of <i>Opuntia</i> (Cactaceae). Caryologia 69:82–89 . doi: 10.1080/00087114.2015.1109956                                                         | Tropical  | N.I.   |
| Palomino G, Martínez J, Romero P, et al (2017) Nuclear genome size and karyotype analysis of <i>Agave angustifolia</i> Haw. “Cimarron” and “Lineño” (Asparagales, Asparagaceae). Caryologia 70:93–101 . doi: 10.1080/00087114.2017.1279931                                 | Tropical  | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |           |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Pavlíková Z, Paštová L, Münzbergová Z (2017) Synthetic polyploids in <i>Vicia cracca</i> : methodology, effects on plant performance and aneuploidy. <i>Plant Systematics and Evolution</i> 303:827–839 . doi: 10.1007/s00606-017-1414-y                                                    | Temperate | N.I.   |
| Peirson JA, Reznicek AA, Semple JC (2012) Polyploidy, infraspecific cytotype variation, and speciation in Goldenrods: The cytogeography of <i>Solidago</i> subsect. <i>Humiles</i> (Asteraceae) in North America. <i>Taxon</i> 61:197–210                                                   | Temperate | N.I.   |
| Pellicer J, Clermont S, Houston L, et al (2012) Cytotype diversity in the <i>Sorbus complex</i> (Rosaceae) in Britain: Sorting out the puzzle. <i>Annals of Botany</i> 110:1185–1193 . doi: 10.1093/aob/mcs185                                                                              | Temperate | N.I.   |
| Pellicer J, Hidalgo O, Garnatje T, et al (2014a) Life cycle versus systematic placement: Phylogenetic and cytogenetic studies in annual <i>Artemisia</i> (Asteraceae, Anthemideae). <i>Turkish Journal of Botany</i> 38:1112–1122 . doi: 10.3906/bot-1404-102                               | Temperate | N.I.   |
| Pellicer J, Kelly LJ, Leitch IJ, et al (2014b) A universe of dwarfs and giants: Genome size and chromosome evolution in the monocot family Melanthiaceae. <i>New Phytologist</i> 201:1484–1497 . doi: 10.1111/nph.12617                                                                     | Temperate | N.I.   |
| Pellicer J, Leitch IJ (2014) The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. <i>Methods in Molecular Biology</i> 1115:279–307 . doi: 10.1007/978-1-62703-767-9_14                                                                                  | Temperate | Linear |
| Phillips WD, Ranney TG, Touchell DH, Eaker TA (2016) Fertility and reproductive pathways of triploid flowering pears ( <i>Pyrus sp.</i> ). <i>HortScience</i> 51:968–971                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |
| Piosik Ł, Zenkteler E, Zenkteler M (2016) Development of haploid embryos and plants of <i>Lactuca sativa</i> induced by distant pollination with <i>Helianthus annuus</i> and <i>H. tuberosus</i> . <i>Euphytica</i> 208:439–451 . doi: 10.1007/s10681-015-1578-x                           | Temperate | N.I.   |
| Pires AS, Azinheira HG, Cabral A, et al (2016) Cytogenomic characterization of <i>Colletotrichum kahawae</i> , the causal agent of coffee berry disease, reveals diversity in minichromosome profiles and genome size expansion. <i>Plant Pathology</i> 65:968–977 . doi: 10.1111/ppa.12479 | Temperate | N.I.   |
| Ponert J, Trávníček P, Vuong TB, et al (2016) A New Species of <i>Cleisostoma</i> (Orchidaceae) from the                                                                                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |           |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Hon Ba Nature Reserve in Vietnam: A Multidisciplinary Assessment. PLoS one 11:e0150631 . doi: 10.1371/journal.pone.0150631                                                                                                                                             |           |        |
| Poulièková A, Mazalová P, Vašut RJ, et al (2014) DNA content variation and its significance in the evolution of the genus <i>Micrasterias</i> (desmidiaceae, streptophyta). PLoS ONE 9: . doi: 10.1371/journal.pone.0086247                                            | Temperate | N.I.   |
| Prančl J, Kaplan Z, Trávníček P, Jarolímová V (2014) Genome size as a key to evolutionary complex aquatic plants: Polyploidy and hybridization in <i>Callitriche</i> (plantaginaceae). PLoS ONE 9: . doi: 10.1371/journal.pone.0105997                                 | Temperate | N.I.   |
| Raggi L, Bitocchi E, Russi L, et al (2015) Understanding genetic diversity and population structure of a <i>Poa pratensis</i> worldwide collection through morphological, nuclear and chloroplast diversity analysis. PLoS ONE 10: . doi: 10.1371/journal.pone.0124709 | Temperate | N.I.   |
| Ray A, Bashir Y, Rather IA, Konwar BK (2015) Genome size determination of <i>Eclipta alba</i> and <i>Aloe barbadensis</i> . Bangladesh Journal of Pharmacology 10:697–702 . doi: 10.3329/bjp.v10i3.23642                                                               | Tropical  | N.I.   |
| Reis AC, Franco AL, Campos VR, et al (2016) rDNA mapping, heterochromatin characterization and AT/GC content of <i>Agapanthus africanus</i> (L.) Hoffmanns (Agapanthaceae). Anais da Academia Brasileira de Ciencias 88:1727–1734 . doi: 10.1590/0001-3765201620150514 | Tropical  | N.I.   |
| Reis AC, Sousa SM, Vale AA, et al (2014) <i>Lippia alba</i> (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? American Journal of Botany 101:1002–1012 . doi: 10.3732/ajb.1400149                                                                                   | Tropical  | N.I.   |
| Reis AC, Viccini LF, de Sousa SM (2015) Contributions to cytogenetics of <i>Plectranthus barbatus</i> Andr. (Lamiaceae): A medicinal plant. Comparative Cytogenetics 9:451–463 . doi: 10.3897/CompCytogen.v9i3.5164                                                    | Tropical  | Log.   |
| Řepka R, Koutecký P, Vahalík P (2015) <i>Gymnocalycium campestre</i> (Cactaceae, Trichocereaceae), a new species from Córdoba, Argentina. Novon 24:280–288 . doi: 10.3417/2015007                                                                                      | Temperate | N.I.   |
| Rewers M, Kisiala A, Drouin J, et al (2012) In vitro-regenerated wetland sedge <i>Eriophorum vaginatum</i> L. is genetically stable. Acta Physiologiae Plantarum 34:2197–2206 . doi: 10.1007/s11738-012-1020-0                                                         | Temperate | Linear |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Rewers M, Sliwinska E (2012) Endoreduplication intensity as a marker of seed developmental stage in the Fabaceae. Cytometry Part A 81 A:1067–1075 . doi: 10.1002/cyto.a.22202                                                                                                                                                           | Temperate | N.I.   |
| Rios EF, Kenworthy KE, Munoz PR (2015) Association of phenotypic traits with ploidy and genome size in annual ryegrass. Crop Science 55:2078–2090 . doi: 10.2135/cropsci2015.01.0039                                                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |
| Roberts DJ, Werner DJ (2016) Genome size and ploidy levels of <i>Cercis</i> (Redbud) species, cultivars, and botanical varieties. HortScience 51:330–333                                                                                                                                                                                | Temperate | N.I.   |
| Rocha LC, Jankowska M, Fuchs J, et al (2017) Decondensation of chromosomal 45S rDNA sites in <i>Lolium</i> and <i>Festuca</i> genotypes does not result in karyotype instability. Protoplasma 254:285–292 . doi: 10.1007/s00709-016-0942-6                                                                                              | Tropical  | N.I.   |
| Róis AS, Teixeira G, Sharbel TF, et al (2012) Male fertility versus sterility, cytotype, and DNA quantitative variation in seed production in diploid and tetraploid sea lavenders ( <i>Limonium</i> sp., Plumbaginaceae) reveal diversity in reproduction modes. Sexual Plant Reproduction 25:305–318 . doi: 10.1007/s00497-012-0199-y | Temperate | N.I.   |
| Romo A, Hidalgo O, Boratyński A, et al (2013) Genome size and ploidy levels in highly fragmented habitats: The case of western Mediterranean <i>Juniperus</i> (Cupressaceae) with special emphasis on <i>J. thurifera</i> L. Tree Genetics and Genomes 9:587–599 . doi: 10.1007/s11295-012-0581-9                                       | Temperate | N.I.   |
| Ruperao P, Chan C-KK, Azam S, et al (2014) A chromosomal genomics approach to assess and validate the desi and kabuli draft chickpea genome assemblies. Plant Biotechnology Journal 12:778–786 . doi: 10.1111/pbi.12182                                                                                                                 | Tropical  | N.I.   |
| Sílesak H, Lisznian´ska M, Popielarska-Konieczna M, et al (2014) Micropropagation protocol for the hybrid sorrel <i>Rumex tianschanicus</i> × <i>Rumex patientia</i> , an energy plant. Histological, SEM and flow cytometric analyses. Industrial Crops and Products 62:156–165 . doi: 10.1016/j.indcrop.2014.08.031                   | Temperate | Linear |
| Sabirhazi G, Haxim Y, Abdurahman M, et al (2014) Genome sizes of some <i>Calligonum</i> species in Xinjiang of China. Vegetos 27:108–112 . doi: 10.5958/j.2229-4473.27.1.018                                                                                                                                                            | Temperate | N.I.   |
| Sadhu A, Bhadra S, Bandyopadhyay M (2016) Novel nuclei isolation buffer for flow cytometric genome size estimation of Zingiberaceae: A comparison with common isolation buffers. Annals of Botany                                                                                                                                       | Tropical  | Linear |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| 118:1057–1070 . doi: 10.1093/aob/mcw173                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |           |        |
| Sakhanokho HF, Islam-Faridi N (2013) Nuclear DNA content*base composition*and cytogenetic characterization of christia obcor. Journal of the American Society for Horticultural Science 138:205–209                                                                                                                                                 | Temperate | Linear |
| Sakiroglu M, Kaya MM (2012) Estimating genome size and confirming ploidy levels of wild tetraploid alfalfa accessions ( <i>Medicago sativa</i> subsp. $\times$ <i>varia</i> ) using flow cytometry. Turkish Journal of Field Crops 17:151–156                                                                                                       | Temperate | N.I.   |
| Salameh NM (2014) Flow cytometric analysis of Nuclear DNA between okra landraces ( <i>Abelmoschus</i> <i>Esculentus</i> L.). American Journal of Agricultural and Biological Science 9:245–250 . doi: 10.3844/ajabssp.2014.245.250                                                                                                                  | Temperate | N.I.   |
| Sanchez PL, Costich DE, Friebe B, et al (2014) Genome size variation in guayule and mariola: Fundamental descriptors for polyploid plant taxa. Industrial Crops and Products 54:1–5 . doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.052                                                                                                                            | Tropical  | N.I.   |
| Sánchez-Jiménez I, Hidalgo O, Canela MA, et al (2012) Genome size and chromosome number in <i>Echinops</i> (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: Technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame. Plant Systematics and Evolution 298:1085–1099 . doi: 10.1007/s00606-012-0618-4 | Temperate | N.I.   |
| Šarhanová P, Vašut RJ, Dančák M, et al (2012) New insights into the variability of reproduction modes in European populations of <i>Rubus</i> subgen. <i>Rubus</i> : How sexual are polyploid brambles? Sexual Plant Reproduction 25:319–335 . doi: 10.1007/s00497-012-0200-9                                                                       | Temperate | N.I.   |
| Schie S, Debener T (2013) The generation of novel species hybrids between garden dahlias and <i>Dahlia macdougalii</i> to increase the gene pool for variety breeding. Plant Breeding 132:224–228 . doi: 10.1111/pbr.12034                                                                                                                          | Temperate | N.I.   |
| Schneider JV, Paule J, Gitaí J, et al (2015) Divergent genome sizes reflect the infrafamilial subdivision of the neotropical woody Marcgraviaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 177:1–14 . doi: 10.1111/boj.12226                                                                                                                       | Tropical  | N.I.   |
| Shearer K, Ranney TG (2013) Ploidy levels and relative genome                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| sizes of species, hybrids, and cultivars of dogwood ( <i>Cornus</i> spp.). HortScience 48:825–830                                                                                                                                                                                                                    |           |      |
| Shibata F, Hizume M, Ohashi H, Furukawa S (2017) An event preceding genome differentiation in the A genome populations of <i>Scilla scilloides</i> . Cytologia 82:307–316 . doi: 10.1508/cytologia.82.307                                                                                                            | Temperate | N.I. |
| Shilpha J, Silambarasan T, Largia MJV, Ramesh M (2014) Improved in vitro propagation, solasodine accumulation and assessment of clonal fidelity in regenerants of <i>Solanum trilobatum</i> L. by flow cytometry and SPAR methods. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 117:125–129 . doi: 10.1007/s11240-013-0420-1 | Tropical  | N.I. |
| Sinclair EA, Statton J, Hovey R, et al (2016) Reproduction at the extremes: Pseudovivipary, hybridization and genetic mosaicism in <i>Posidonia australis</i> (Posidoniaceae). Annals of Botany 117:237–247 . doi: 10.1093/aob/mcv162                                                                                | Temperate | N.I. |
| Skaptsov MV, Smirnov SV, Kutsev MG, Shmakov AI (2016) Problems of a standardization in plant flow cytometry. Turczaninowia 19:120–122 . doi: 10.14258/turczaninowia.19.3.9                                                                                                                                           | Temperate | N.I. |
| Slazak B, Sliwinska E, Saługa M, et al (2015) Micropropagation of <i>Viola uliginosa</i> (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120:179–190 . doi: 10.1007/s11240-014-0592-3                             | Temperate | N.I. |
| Śliwińska-Wyrzychowska A, Jędrzejczyk I, Golczyk H (2017) Variability of stem morphology in <i>Lycopodium clavatum</i> (Lycopodiaceae) is not related to ploidy level. Plant Ecology and Evolution 150:112–115 . doi: 10.5091/plecevo.2017.1320                                                                      | Temperate | N.I. |
| Šmarda P, Bureš P, Horová L, et al (2014) Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111:E4096–E4102 . doi: 10.1073/pnas.1321152111                                                       | Temperate | N.I. |
| Šmarda P, Hejzman M, Březinová A, et al (2013) Effect of phosphorus availability on the selection of species with different ploidy levels and genome sizes in a long-term grassland fertilization experiment. New Phytologist 200:911–921 . doi: 10.1111/nph.12399                                                   | Temperate | N.I. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |           |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| Spannagl M, Bader K, Pfeifer M, et al (2016) PGSB/MIPS plant genome information resources and concepts for the analysis of complex grass genomes. <i>Methods in Molecular Biology</i> 1374:165–186 . doi: 10.1007/978-1-4939-3167-5_8                                                       | Temperate | N.I. |
| Staton M, Best T, Khodwekar S, et al (2015) Preliminary Genomic Characterization of Ten Hardwood Tree Species from Multiplexed Low Coverage Whole Genome Sequencing. <i>PLoS ONE</i> 10: . doi: 10.1371/journal.pone.0145031                                                                | Temperate | N.I. |
| Steinberg M, Boon E (2013) In vitro plant production: High-throughput screening of ploidy levels using flow cytometry [In vitro-Pflanzenproduktion: Hochdurchsatz-Screening von Ploidiestufen mittels Durchflusszytometrie]. <i>BioSpektrum</i> 19:417–419 . doi: 10.1007/s12268-013-0332-y | Temperate | N.I. |
| Stetter MG, Schmid KJ (2017) Analysis of phylogenetic relationships and genome size evolution of the <i>Amaranthus</i> genus using GBS indicates the ancestors of an ancient crop. <i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i> 109:80–92 . doi: 10.1016/j.ympev.2016.12.029                | Temperate | N.I. |
| Suda J, Meyerson LA, Leitch IJ, Pyšek P (2015) The hidden side of plant invasions: The role of genome size. <i>New Phytologist</i> 205:994–1007 . doi: 10.1111/nph.13107                                                                                                                    | Temperate | N.I. |
| Tanaka H, Chotekajorn A, Kai S, et al (2016) Determination of genome size, chromosome number, and genetic variation using inter-simple sequence repeat markers in <i>Lotus</i> spp. <i>Cytologia</i> 81:95–102 . doi: 10.1508/cytologia.81.95                                               | Temperate | N.I. |
| Tárnok A (2012) It's not just leukocytes in cytometry. <i>Cytometry Part A</i> 81 A:1013–1014 . doi: 10.1002/cyto.a.22235                                                                                                                                                                   | Temperate | N.I. |
| Tavan M, Mirjalili MH, Karimzadeh G (2015) In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of <i>Thymus persicus</i> (Lamiaceae). <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 122:573–583 . doi: 10.1007/s11240-015-0789-0            | Temperate | N.I. |
| Teh BT, Lim K, Yong CH, et al (2017) The draft genome of tropical fruit durian ( <i>Durio zibethinus</i> ). <i>Nature Genetics</i> 49:1633–1641 . doi: 10.1038/ng.3972                                                                                                                      | Tropical  | N.I. |
| Tenaillon MI, Manicacci D, Nicolas SD, et al (2016) Testing the link between genome size and growth rate in maize. <i>PeerJ</i> 2016: . doi: 10.7717/peerj.2408                                                                                                                             | Temperate | N.I. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Thiem B, Kikowska M, Krawczyk A, et al (2013) Phenolic acid and DNA contents of micropropagated <i>Eryngium planum</i> L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 114:197–206 . doi: 10.1007/s11240-013- 0315-1                                                                                                                                       | Temperate | Linear |
| Timbó ALO, Pereira RC, dos Santos VB, et al (2012) Histogram score contributes for reliability of DNA content estimatives in <i>Brachiaria spp</i> [Notas do histograma contribuem para a confiabilidade das estimativas do conteúdo de DNA de <i>Brachiaria spp</i> ]. Ciencia e Agrotecnologia 36:599–607 . doi: 10.1590/S1413-70542012000600001 | Tropical  | Log.   |
| Tiryaki I, Tuna M (2012) Determination of intraspecific nuclear DNA content variation in common vetch ( <i>Vicia sativa</i> L.) lines and cultivars based on two distinct internal reference standards. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 36:645–653 . doi: 10.3906/tar-1201-47                                                          | Temperate | N.I.   |
| Trávníček P, Kirschner J, Chudáčková H, et al (2013) Substantial Genome Size Variation in <i>Taraxacum stenocephalum</i> (Asteraceae, Lactuceae). Folia Geobotanica 48:271–284 . doi: 10.1007/s12224-013-9151-7                                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |
| Trávníček P, Ponert J, Urfus T, et al (2015) Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication. Cytometry Part A 87:958–966 . doi: 10.1002/cyto.a.22681                                                                                   | Temperate | Linear |
| Tungkajiwangkoon S, Shirakawa J, Azumatani M, Azumatani Y (2016) Breeding and Cytogenetic Characterizations of New Hexaploid <i>Drosera</i> Strains Colchicine-Induced from Triploid Hybrid of <i>D. rotundifolia</i> and <i>D. spatulata</i> . Cytologia 81:263–269 . doi: 10.1508/cytologia.81.263                                               | Temperate | N.I.   |
| Vallès J, Bašić N, Bogunić F, et al (2014) Contribution to plant genome size knowledge: First assessments in five genera and 30 species of angiosperms from western Balkans. Botanica Serbica 38:25–33                                                                                                                                             | Temperate | Log.   |
| Vallès J, Malik S, Gomez M, Siljak-Yakovlev S (2017) Contribution to knowledge about nuclear DNA amounts in the family Asteraceae: First assessments in one genus and 12 species, with chromosome counts for three taxa. Botanica Serbica 41:213–219 . doi: 10.5281/zenodo.1026505                                                                 | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| Varela-Álvarez E, Gómez Garreta A, Rull Lluch J, et al (2012) Mediterranean Species of Caulerpa Are Polyploid with Smaller Genomes in the Invasive Ones. PLoS ONE 7: . doi: 10.1371/journal.pone.0047728                                                                             | Temperate | N.I. |
| Veleba A, Bureš P, Adamec L, et al (2014) Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family Lentibulariaceae. New Phytologist 203:22–28 . doi: 10.1111/nph.12790                                                                                     | Temperate | N.I. |
| Verloove F, Zonneveld BJM, Semple JC (2017) First evidence for the presence of invasive <i>Solidago altissima</i> (Asteraceae) in Europe. Willdenowia 47:69–75 . doi: 10.3372/wi.47.47107                                                                                            | Temperate | N.I. |
| Veselý P, Bureš P, Šmarda P (2013) Nutrient reserves may allow for genome size increase: Evidence from comparison of geophytes and their sister non-geophytic relatives. Annals of Botany 112:1193– 1200 . doi: 10.1093/aob/mct185                                                   | Temperate | N.I. |
| Vít P, Krak K, Trávníček P, et al (2016) Genome size stability across Eurasian <i>Chenopodium</i> species (Amaranthaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 182:637–649 . doi: 10.1111/boj.12474                                                                             | Temperate | N.I. |
| Vít P, Wolfová K, Urfus T, et al (2014) Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: Assessing the threat to the Czech serpentine endemic <i>Cerastium alsinifolium</i> . Preslia 86:95–117                                   | Temperate | N.I. |
| Vítová J, Vít P, Suda J (2015) Rare occurrence of reciprocal hybridization in a sympatric population of the Czech stenoendemic <i>Dianthus arenarius</i> subsp. bohemicus and widespread <i>D. carthusianorum</i> . Preslia 87:329–345                                               | Temperate | N.I. |
| Vrána J, Šimková H, Kubaláková M, et al (2012) Flow cytometric chromosome sorting in plants: The next generation. Methods 57:331–337 . doi: 10.1016/j.ymeth.2012.03.006                                                                                                              | Temperate | N.I. |
| Wallace MJ, Guja LK, Jouault MA, et al (2017) DNA ploidy variation and distribution in the <i>Lepidosperma costale</i> complex (Cyperaceae): Implications for conservation and restoration in a biodiversity hotspot. Australian Journal of Botany 65:120–127 . doi: 10.1071/BT16197 | Temperate | N.I. |
| Walter J, Vekslyarska T, Dobeš C (2015) Flow cytometric, chromosomal and morphometric analyses challenge current taxonomic                                                                                                                                                           | Temperate | N.I. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| concepts in the <i>Portulaca oleracea</i> complex (Portulacaceae, Caryophyllales). Botanical Journal of the Linnean Society 179:144–156 . doi: 10.1111/boj.12309                                                                                                  |           |        |
| Wang J, Liu J, Kang M (2015) Quantitative testing of the methodology for genome size estimation in plants using flow cytometry: A case study of the <i>Primulina</i> genus. Frontiers in Plant Science 6:1–13 . doi: 10.3389/fpls.2015.00354                      | Temperate | Linear |
| Wang J, Presser JW, Goss EM (2016a) Nuclear DNA content of the hybrid plant pathogen <i>Phytophthora andina</i> determined by flow cytometry. Mycologia 108:899–904 . doi: 10.3852/15-107                                                                         | Temperate | N.I.   |
| Wang N, Mcallister HA, Bartlett PR, Buggs RJA (2016b) Molecular phylogeny and genome size evolution of the genus <i>Betula</i> (Betulaceae). Annals of Botany 117:1023–1035 . doi: 10.1093/aob/mcw048                                                             | Temperate | N.I.   |
| Wefferling KM, Castro S, Loureiro J, et al (2017) Cytogeography of the subalpine marsh marigold polyploid complex ( <i>Caltha leptosepala</i> s.l., ranunculaceae). American Journal of Botany 104:271–285 . doi: 10.3732/ajb.1600365                             | Temperate | N.I.   |
| Wenger JA, Cassone BJ, Legeai F, et al (2016) Whole genome sequence of the soybean aphid, Aphis glycines. Insect Biochemistry and Molecular Biology. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.01.005                                                                              | Temperate | N.I.   |
| Whittemore AT, Xia Z-L (2017) Genome size variation in Elms ( <i>Ulmus</i> spp.) and related genera. HortScience 52:547–553 . doi: 10.21273/HORTSCI11432-16                                                                                                       | Temperate | N.I.   |
| Wolf DE, Steets JA, Houliston GJ, Takebayashi N (2014) Genome size variation and evolution in allotetraploid <i>Arabidopsis kamchatica</i> and its parents, <i>Arabidopsis lyrata</i> and <i>Arabidopsis halleri</i> . AoB PLANTS 6: . doi: 10.1093/aobpla/plu025 | Temperate | N.I.   |
| Wong C, Murray BG (2012) Variable changes in genome size associated with different polyploid events in <i>Plantago</i> (Plantaginaceae). Journal of Heredity 103:711–719 . doi: 10.1093/jhered/ess049                                                             | Temperate | N.I.   |
| Worcester L, Mayfield MH, Ferguson CJ (2012) Cytotypic variation in <i>Phlox pilosa</i> ssp. <i>pilosa</i> (Polemoniaceae) at the western edge of its range in the central UNITED STATES. Journal of the Botanical Research Institute of Texas 6:443–451          | Temperate | N.I.   |
| Wu H, Ma Z, Wang M-M, et al (2016) A high frequency of allopolyploid speciation in the gymnospermous genus <i>Ephedra</i> and its possible association                                                                                                            | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| with some biological and ecological features. <i>Molecular Ecology</i> 25:1192–1210 . doi: 10.1111/mec.13538                                                                                                                                                                         |           |        |
| Wu L-P, Tang Y, Li Y-Y, et al (2013) Estimation of genome size of <i>Ziziphus jujuba</i> and <i>Z. acidojujuba</i> . <i>Beijing Linze Daxue Xuebao/Journal of Beijing Forestry University</i> 35:77–83                                                                               | Temperate | N.I.   |
| Yadav AK, Singh S, Bhardwaj G (2014) Nuclear DNA content and genome size estimation of <i>Stevia rebaudiana</i> using flow cytometry. <i>Minerva Biotechnologica</i> 26:143–148                                                                                                      | Tropical  | Linear |
| Yan H, Martin SL, Bekele WA, et al (2016) Genome size variation in the genus <i>Avena</i> . <i>Genome</i> 59:209–220 . doi: 10.1139/gen-2015-0132                                                                                                                                    | Temperate | N.I.   |
| Yang J, Zhang G, Zhang J, et al (2017) Hybrid de novo genome assembly of the Chinese herbal fleabane <i>Erigeron breviscapus</i> . <i>GigaScience</i> 6:1–17 . doi: 10.1093/gigascience/gix028                                                                                       | Temperate | N.I.   |
| Zale PJ, Jourdan P (2015) Genome size and ploidy of <i>Phlox paniculata</i> and related germplasm in subsections paniculatae and phlox. <i>Journal of the American Society for Horticultural Science</i> 140:436–448                                                                 | Temperate | N.I.   |
| Zale PJ, Roberts DWH, Jourdan P (2016) Genome size and ploidy levels of creeping phlox and related germplasm of mat-forming taxa from eastern and western North America. <i>Scientia Horticulturae</i> 203:53–61 . doi: 10.1016/j.scienta.2016.02.039                                | Temperate | N.I.   |
| Zhang J, Li X, Lu F, et al (2017) De novo sequencing and transcriptome analysis reveal key genes regulating steroid metabolism in leaves, roots, adventitious roots and calli of <i>periploca sepium bunge</i> . <i>Frontiers in Plant Science</i> 8: . doi: 10.3389/fpls.2017.00594 | Temperate | N.I.   |
| Zhang J, Nagai C, Yu Q, et al (2012) Genome size variation in three <i>Saccharum</i> species. <i>Euphytica</i> 185:511–519 . doi: 10.1007/s10681-012-0664-6                                                                                                                          | Temperate | N.I.   |
| Zhang L, Cao B, Bai C (2013) New reports of nuclear DNA content for 66 traditional Chinese medicinal plant taxa in China. <i>Caryologia</i> 66:375–383 . doi: 10.1080/00087114.2013.859443                                                                                           | Temperate | N.I.   |
| Zhao J, Cui J, Liu J, et al (2012) Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of <i>Spathiphyllum</i> “Supreme” and analysis of regenerants using flow cytometry. <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 110:239–249 . doi: 10.1007/s11240-012-0146-5          | Temperate | N.I.   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| Zhao Y, Thammannagowda S, Staton M, et al (2013) An EST dataset for <i>Metasequoia glyptostroboides</i> buds: The first EST resource for molecular genomics studies in <i>Metasequoia</i> . <i>Planta</i> 237:755–770 . doi: 10.1007/s00425-012-1783-y                                                                         | Temperate | N.I. |
| Zhou M, Xu C, Shen L, et al (2017) Evolution of genome sizes in Chinese <i>Bambusoideae</i> (Poaceae) in relation to karyotype. <i>Trees - Structure and Function</i> 31:41–48 . doi: 10.1007/s00468-016-1453-y                                                                                                                | Temperate | N.I. |
| Zonneveld B, Zonneveld BJM (2015) Genome sizes of <i>Ficaria</i> huds. ( <i>Ranunculaceae</i> ) indicate eight separate species [De verschillende genomgewichten van Europese <i>Ficaria</i> Huds. ( <i>Ranunculaceae</i> ) duiden op acht soorten]. <i>Gorteria: Tijdschrift voor Onderzoek aan de Wilde Flora</i> 37:118–140 | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM (2012a) Conifer genome sizes of 172 species, covering 64 of 67 genera, range from 8 to 72 picogram. <i>Nordic Journal of Botany</i> 30:490–502 . doi: 10.1111/j.1756-1051.2012.01516.x                                                                                                                           | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM (2012b) Genome sizes for all genera of Cycadales. <i>Plant Biology</i> 14:253–256 . doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00522.x                                                                                                                                                                                        | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM (2012c) Genome sizes of all 19 <i>Araucaria</i> species are correlated with their geographical distribution. <i>Plant Systematics and Evolution</i> 298:1249–1255 . doi: 10.1007/s00606-012-0631-7                                                                                                               | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM (2015) <i>Tulipa jacquesii</i> ( <i>Liliaceae</i> ), a new species from Western Kyrgyzstan. <i>Phytotaxa</i> 218:184–188 . doi: 10.11646/phytotaxa.218.2.9                                                                                                                                                       | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM, de Groot JJ (2012) <i>Tulipa kolbintsevia</i> Zonn., a new species from Eastern Kazakhstan. <i>Plant Systematics and Evolution</i> 298:1293–1296 . doi: 10.1007/s00606-012-0635-3                                                                                                                               | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM, Lindström AJ (2016) Genome sizes for 71 species of <i>Zamia</i> ( <i>Cycadales</i> : <i>Zamiaceae</i> ) correspond with three different biogeographic regions. <i>Nordic Journal of Botany</i> 34:744–751 . doi: 10.1111/njb.01094                                                                              | Tropical  | N.I. |
| Zonneveld BJM, Pollock WI (2012) Sports and hybrids of triploid <i>Hosta</i> “Sum and Substance” reveal chromosome losses and gains in all three apical layers. <i>Plant Systematics and Evolution</i> 298:1037–1043 . doi: 10.1007/s00606-012-0613-9                                                                          | Temperate | N.I. |
| Zonneveld BJM, te Linde B, van den Berg L-J (2015) Genome sizes of 227 accessions of <i>Gagea</i> ( <i>Liliaceae</i> ) discriminate between                                                                                                                                                                                    | Temperate | N.I. |

|                                                                                                                        |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
| the species from the Netherlands and reveal new ploidies in<br>Gagea. SpringerPlus 4: . doi: 10.1186/s40064-015-1167-4 |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|

\* = Information obtained by personal communicaiton

## 4 CONCLUSÕES

- As espécies sugeridas como padrões internos apresentaram picos com coeficiente de variação abaixo de 5% com todos os tampões utilizados, mostrando-se adequadas ao protocolo de citometria de fluxo;
- A variação intraespecífica de todas as espécies analisadas ficou abaixo de 3%, denotando boa estabilidade de valor 2C;
- As espécies sugeridas como novos padrões apresentam estabilidade cariotípica, sem presença de anomalias cromossômicas;
- Resultados obtidos com escala linear de fluorescência diferem significativamente dos resultados obtidos com escala logarítmica, corroborando recomendações contra o uso desta última;
- *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai cv. Crimson Sweet (2C = 0,86 pg), *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. BRS Pujante (2C = 1,37 pg), *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. IPA-6 (2C = 2,04 pg), *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss cv. Graúda (2C = 4,15 pg), *Allium cepa* L. cv. IPA-11 (2C = 35,22 pg), e *Nothoscordum pulchellum* Kunth (2C = 48,57 pg) podem ser utilizadas como padrões internos para quantificação de DNA por citometria de fluxo;

## REFERÊNCIAS

- BAINARD, J. D. et al. The effects of rapid desiccation on estimates of plant genome size. **Chromosome Research**, v. 19, n. 6, p. 825–842, ago. 2011.
- BENNETT, M. DNA Amounts in Two Samples of Angiosperm Weeds. **Annals of Botany**, v. 82, p. 121–134, dez. 1998.
- BENNETT, M. D. Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25 % Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of 125 Mb. **Annals of Botany**, v. 91, n. 5, p. 547–557, 1 abr. 2003.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 45–90, 1 jan. 2005.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 467–590, mar. 2011.
- BENNETT M.D.; LEITCH I.J. Plant DNA C-values Database (Release 6.0, Dec. 2012). Disponível em <<http://data.kew.org/cvalues>>, acessado em 10 de abril de 2014. 2012.
- BENNETT, M. D.; SMITH, J. B. Nuclear dna amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 274, n. 933, p. 227–274, 27 maio 1976.
- BENNETT, M. D.; SMITH, J. B. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 334, n. 1271, p. 309–345, 30 dez. 1991.
- BENNETT, M.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, n. 2, p. 113–176, ago. 1995.
- BOIVIN, A.; VENDRELY, R.; VENDRELY, C. L'acide des oxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 226, p. 1061, 1948.
- BRITTEN, R. J.; KOHNE, D. E. Repeated sequences in DNA. **Science**, p. 529–540, 1968.
- CONANT, G. C.; BIRCHLER, J. A.; PIRES, J. C. Dosage, duplication, and diploidization: clarifying the interplay of multiple models for duplicate gene evolution over time. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 91–98, jun. 2014.
- DEELEY, E. M. An integrating microdensitometer for biological cells. **Journal of Scientific Instruments**, v. 32, n. 7, p. 263–267, jul. 1955.

DODSWORTH, S. et al. Genomic Repeat Abundances Contain Phylogenetic Signal. **Systematic Biology**, v. 64, n. 1, p. 112–126, 1 jan. 2015.

DODSWORTH, S.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms?: Diploidization in Polyploid Angiosperms. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 180, n. 1, p. 1–5, jan. 2016.

DODSWORTH, S.; LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 73–78, dez. 2015.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (EDS.). **Flow Cytometry with Plant Cells**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 4, p. 143–154, set. 1991.

DOLEŽEL, J. et al. Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. **Annals of Botany**, v. 82, n. suppl\_1, p. 17–26, 1 dez. 1998.

DOLEŽEL, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99–110, 1 jan. 2005.

DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99–110, 1 jan. 2005.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LCRETI, S. Analysis of Nuclear DNA content in plant cells by Flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 113–120, mar. 1989.

DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**, v. 19, n. 2, p. 103–106, 1 fev. 1995.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J. Nuclear genome size: Are we getting closer? **Cytometry Part A**, v. 77A, n. 7, p. 635–642, 20 maio 2010.

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 4, p. 625–631, ago. 1992.

EDDY, S. R. The C-value paradox, junk DNA and ENCODE. **Current Biology**, v. 22, n. 21, p. R898–R899, nov. 2012.

EISERT, W. G.; OSTERTAG, R.; NIEMANN, E. -G. Simple flow microphotometer for rapid cell population analysis. **Review of Scientific Instruments**, v. 46, n. 8, p. 1021–1024, ago. 1975.

ELLIOTT, T. A.; GREGORY, T. R. What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1678, p. 20140331, 26 set. 2015.

FEULGREN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die- darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 135, n. 5–6, p. 203–248, jan. 1924.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1049–1051, 3 jun. 1983.

GALBRAITH, D. W. et al. Analysis of Nuclear DNA Content and Ploidy in Higher Plants. In: ROBINSON, J. P. et al. (Eds.). . **Current Protocols in Cytometry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

GARCIA, S. et al. Recent updates and developments to plant genome size databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1159–D1166, jan. 2014.

GREGORY, T. R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C- value enigma. **Biological Reviews**, v. 76, n. 1, p. 65–101, 11 jan. 2001.

GREGORY, T. R. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 133–146, 1 jan. 2005.

GREGORY, T. R. Animal Genome Size Database. Disponível em <<http://www.genomesize.com>>, acessado em 10 de abril de 2014. 2018.

GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. **Genome Research**, v. 9, n. 4, p. 317–324, abr. 1999.

GREILHUBER, J. Intraspecific Variation in Genome Size in Angiosperms: Identifying its Existence. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 91–98, 1 jan. 2005.

GREILHUBER, J. et al. Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770–777, nov. 2006.

GUCKER, F. T.; O'KONSKI, C. T. A photoelectronic counter for colloidal particles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 10, p. 2422–2431, out. 1947.

HINEGARDNER, R. Evolution of genome size. In: **Molecular evolution**. Sunderland, MA: Ayala F. J., 1976. p. 179–199.

JĘDRZEJUK, A.; MEYER, L.; SEREK, M. Characterization of interspecific hybrids of

*Petunia* and *Calibrachoa* by multiplex PCR, DNA content, and chromosome number. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 493–501, 3 set. 2017.

JIAO, Y. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 97–100, 5 maio 2011.

JOHNSTON, J. S. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 5, p. 609–613, maio 1999.

KULLMAN, B.; TAMM, H.; KULLMAN, K. Fungal Genome Size Database. Disponível em <<http://www.zbi.ee/fungal-genomesize>>, acessado em 10 de abril de 2014. 2018.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Ecological and genetic factors linked to contrasting genome dynamics in seed plants: *Tansley review*. **New Phytologist**, v. 194, n. 3, p. 629–646, maio 2012.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants: GENOME DOWNSIZING IN POLYPLOIDS. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 82, n. 4, p. 651–663, 9 ago. 2004.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry. **Annals of Botany**, v. 98, n. 3, p. 679–689, 1 set. 2006a.

LOUREIRO, J. et al. Flow Cytometric and Microscopic Analysis of the Effect of Tannic Acid on Plant Nuclei and Estimation of DNA Content. **Annals of Botany**, v. 98, n. 3, p. 515–527, 1 set. 2006b.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry. **Annals of Botany**, v. 98, n. 3, p. 679–689, 1 set. 2006c.

LOUREIRO, J. et al. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. **Preslia**, v. 82, n. 1, p. 3–21, 2010.

MACAS, J. et al. In Depth Characterization of Repetitive DNA in 23 Plant Genomes Reveals Sources of Genome Size Variation in the Legume Tribe Fabeae. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143424, 25 nov. 2015.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1–2, p. 41–51, 1993.

MASTERSON, J. Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 421–424, 15 abr. 1994.

MICHAELSON, M. J. et al. Comparison of Plant DNA Contents Determined by Feulgen Microspectrophotometry and Laser Flow Cytometry. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 2, p. 183, fev. 1991.

MIRSKY, A. E. THE DESOXYRIBONUCLEIC ACID CONTENT OF ANIMAL CELLS AND ITS EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE. **The Journal of General Physiology**, v. 34, n. 4, p. 451–462, 20 mar. 1951.

NOIROT, M. Nucleus–Cytosol Interactions—A Source of Stoichiometric Error in Flow Cytometric Estimation of Nuclear DNA Content in Plants. **Annals of Botany**, v. 86, n. 2, p. 309–316, ago. 2000.

NOIROT, M. Effects of Caffeine and Chlorogenic Acid on Propidium Iodide Accessibility to DNA: Consequences on Genome Size Evaluation in Coffee Tree. **Annals of Botany**, v. 92, n. 2, p. 259–264, 12 jun. 2003.

OGUR, M. et al. Nucleic acids in relation to cell division in *Lilium longiflorum*. **Experimental Cell Research**, v. 2, n. 1, p. 73–89, 1951.

OHNO, S. So much “junk” DNA in our genome. **Brookhaven Symposia in Biology**, v. 23, p. 366–370, 1972.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid Incidence and Evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, n. 1, p. 401–437, dez. 2000.

PELLICER, J.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J. The largest eukaryotic genome of them all?: THE LARGEST EUKARYOTIC GENOME? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 164, n. 1, p. 10–15, 15 set. 2010.

PELLICER, J.; LEITCH, I. J. The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. In: BESSE, P. (Ed.). **Molecular Plant Taxonomy**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. v. 1115p. 279–307.

PFOSSER, M. et al. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. **Cytometry**, v. 21, n. 4, p. 387–393, dez. 1995.

PRAÇA-FONTES, M. M. et al. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 1183–1191, jul. 2011.

PUTTICK, M. N.; CLARK, J.; DONOGHUE, P. C. J. Size is not everything: rates of genome size evolution, not C -value, correlate with speciation in angiosperms. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1820, p. 20152289, 7 dez. 2015.

RAYBURN, A. L.; AUGER, J. A. Genome size variation in *Zea mays* ssp. *mays* adapted to different altitudes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, n. 4, abr. 1990.

ROTHFELS, K. et al. Chromosome size and DNA content of species of *Anemone* L. and related genera (Ranunculaceae). **Chromosoma**, v. 20, n. 1, p. 54–74, 1966.

SCHMIDT, G.; THANNHAUSER, J. S. A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 161, p. 83–89, 1945.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry: Shapiro/Flow Cytometry 4e**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

SOLTIS, P. S. et al. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 119–125, dez. 2015.

STEPHENS, S. G. Possible significances of duplication in evolution. **Advances in Genetics**, v. 4, p. 247–265, 1951.

SUDA, J.; LEITCH, I. J. The quest for suitable reference standards in genome size research.

**Cytometry Part A**, v. 77A, n. 8, p. 717–720, 20 maio 2010.

SUDA, J.; TRÁVNÍČEK, P. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. **Cytometry Part A**, v. 69A, n. 4, p. 273–280, abr. 2006.

SWIFT, H. H. The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. **Physiological Zoology**, v. 23, n. 3, p. 169–198, jul. 1950.

THOMAS, C. A. The Genetic Organization of Chromosomes. **Annual Review of Genetics**, v. 5, n. 1, p. 237–256, dez. 1971.

VENDRELY, R.; VENDRELY, C. La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales. **Experientia**, v. 4, n. 11, p. 434–436, nov. 1948.

VINDELØV, L. L. et al. Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization. **Cytometry**, v. 3, n. 5, p. 332–339, mar. 1983.

VRÁNA, J. et al. Flow Sorting Plant Chromosomes. In: KIANIAN, S. F.; KIANIAN, P. M. A. (Eds.). **Plant Cytogenetics**. New York, NY: Springer New York, 2016. v. 1429p. 119–134.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738.

WEISS-SCHNEEWEISS, H. et al. Exploring the repeats' landscape and its impact on genome evolution and plant diversification. In: Germany: Koeltz Scientific Books, 2015.

WINKLER, L. W. Beiträge zur Gewichtsanalyse XV. **Zeitschrift für Angewandte Chemie**, v. 33, n. 96, p. 299–299, 30 nov. 1920.