



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ ROSENO DE MENDONÇA FILHO

**DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM REPRESENTANTES DO COMPLEXO
CRYPTANTHOID (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE)**

Recife

2019

JOSÉ ROSENO DE MENDONÇA FILHO

**DIVERSIDADE CAROTÍPICA EM REPRESENTANTES DO COMPLEXO
CRYPTANTHOID (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadores: Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal

Prof. Dr Jaílson Gitai dos Santos Frazão

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Mendonça Filho, José Roseno de
Diversidade cariotípica em representantes do complexo
Cryptanthoid (Bromelioideae, Bromeliaceae) / José Roseno de
Mendonça Filho - 2019.
70 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon
Coorientadores: Ana Christina Brasileiro-Vidal
Jailson Gitai dos Santos Frazão

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

Inclui referências.

1. Bromélias 2. Citogenética 3. Cromossomos B
I. Iseppon, Ana Maria Benko (Orientadora) II. Brasileiro-Vidal, Ana
Christina (Coorientadora) III. Frazão, Jailson Gitai dos Santos
(Coorientador) IV. Título

584.85 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-138

JOSÉ ROSENO DE MENDONÇA FILHO

**DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM REPRESENTANTES DO COMPLEXO
CRYPTANTHOID (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/07/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon
UFPE (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Betânia de Oliveira Melo
UFPE (Membro Interno)

Prof. Dr. Geyner Alves dos Santos Cruz
UPE – Campus de Petrolina (Membro Externo)

MEMBROS SUPLENTES

Profa. Dra. Valesca Pandolfi
UFPE (Suplente Interno)

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
UFRPE – (Suplente Externo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, os meus eternos conselheiros, que me apoiaram em todos os momentos de minha vida.

À minha queridíssima vovó Amara, que tanto me trouxe momentos felizes, de afeto e carinho.

Aos Meus filhos, Arthur Roseno e Mariana Roseno, que me transbordam de felicidade.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a Ana Christina Brasileiro Vidal pela sua dedicação ao meu desenvolvimento, por todos os ensinamentos e puxões de orelha, pela sua presença, pela oportunidade e confiança. Exemplo como pessoa e profissional. MUITO OBRIGADO!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon, pela estrutura e ensinamentos compartilhados, pela oportunidade concedida, e pela inenarrável conduta profissional, servindo como parâmetro para todos nós do LGBV.

Ao meu coorientador Prof Dr Jailson Gitai pela sua disposição em ajudar, pela sua presença e ensinamentos.

Aos colegas que fizeram ou ainda fazem parte do LGBV, ao grupo da citogenética, pela cooperação e trabalho em grupo. Em especial, Dra. Emanuelle Varão Vasconcelos (Manuzito) e Dra. Ana Rafaela Oliveira da Silva por todo o treinamento e suporte dado durante a pesquisa.

Às agências de fomento à pesquisa Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Muito obrigado.

RESUMO

As bromélias se destacam pela sua beleza e diversidade morfológica. Tal diversidade contrasta com a conservação dos números cromossômicos, havendo uma predominância de $x = 25$, considerado basal e observado na maioria das Bromeliaceae. Entretanto, *Cryptanthus* e gêneros relacionados (Complexo Cryptanthoid) representam uma exceção, por terem o número básico $x = 17$ (exceto *Orthophytum*, com $x = 25$), além da presença de cromossomos B. O gênero *Cryptanthus* lato sensu é endêmico no Brasil e compreende 55 espécies. No presente trabalho, 14 táxons de *Cryptanthus* e uma espécie relacionada (*Rokautskyia pseudoglazioui*) foram analisados, incluindo contagens cromossômicas, coloração de CMA₃ / DAPI e Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) utilizando sondas de DNAr 5S e 35S. A morfologia dos cromossomos foi altamente variável. Espécies com $2n = 34$ apresentaram dois a três sítios de DNAr 35S, enquanto todas as espécies com $2n = 32$ exibiram três sítios de DNAr 35S. Por outro lado, o número de sítios de DNAr 5S variou de um a quatro. Duas a seis bandas CMA⁺ foram observadas, e cromossomos B foram identificados em duas espécies (*C. bahianus* e *C. diana*). Os resultados revelam cariótipos altamente heteromórficos, uma diversidade estrutural significativa e indicam um papel chave da disploidia na carioevolução do grupo. Barreiras reprodutivas baixas e hibridação são sugeridos como agentes causadores deste cenário cariomorfológico e da gênese de cromossomos B.

Palavras-chave: Diversidade. *Rokautskyia*. *Hoplocryptanthus*. FISH. cromossomos B.

ABSTRACT

Bromeliads stand out for their beauty and morphological diversity. Such diversity contrasts with the conservation of chromosomal basic numbers, with a predominance of $x = 25$, considered basal and observed in most Bromeliaceae. However, *Cryptanthus* and related genera (Cryptanthoid Complex) represent an exception, as they have the basic number $x = 17$ (except *Orthophytum*, with $x = 25$), in addition to the presence of B chromosomes. The genus *Cryptanthus* lato sensu is endemic to Brazil and comprises 55 species. In the present work, 14 taxa of *Cryptanthus* and a related species (*Rokautskyia pseudoglazioui*) were analyzed, including chromosomal counts, CMA3 / DAPI staining and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) using DNAr 5S and 35S probes. The chromosome morphology was highly variable. Species with $2n = 34$ presented two to three DNAr 35S sites, while all species with $2n = 32$ exhibited three DNAr 35S sites. On the other hand, the number of DNAr 5S sites varied from one to four. Two to six CMA⁺ bands were observed, and B chromosomes were identified in two species (*C. bahianus* and *C. diana*). The results revealed highly heteromorphic karyotypes, significant structural diversity and indicate a key role of dysploidy in the carioevolution of the group. Low reproductive barriers and hybridization are suggested as causative agents of this karyomorphological scenario and the genesis of B chromosomes.

Keywords: *Cryptanthus*. *Rokautskyia*. *Hoplocryptanthus*. FISH. B chromosomes.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Filogenia de Bromeliaceae. Nessa figura é possível reconhecer as oito linhagens que representam as oito subfamílias atualmente estabelecidas: Brochhiniaceae, Lindmaniaceae, Tillandsiaceae, Hechtiaceae, Navioideae, Bromelioideae, Puyoiaceae e Pitcairniaceae (Reproduzido de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>) **16**
- FIGURA 2** - Distribuição geográfica de *Cryptanthus* representada por pontos. Pontos em amarelo representam locais de habitat com alto potencial para *Cryptanthus*..... **19**
- FIGURA 3** - Árvore de inferência bayesiana de 104 acessos de *Cryptanthus* com base em 489 caracteres obtidos com nove combinações de pares de primers AFLP e cinco *Orthophytum* como outgroup. Os quadrados indicam o tipo de subgênero e habitat **21**
- FIGURA 4** - Filogenia obtida por análise bayesiana baseada em dados de marcadores nucleares (AGT1, ETS, PHYC) e plastídeos [matK, trnH-psbA, ycf1 (pos. 1113-2103 e 4492-5440)] dados. As probabilidades posteriores (PP) da análise bayesiana são dadas acima dos ramos, bootstrap percentagens (BP) são mostradas abaixo dos ramos. Valores abaixo de 0,5 PP e 50 BP não são mostrados **22**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características morfológicas gerais das subfamílias inicialmente propostas para a família Bromeliaceae	15
TABELA 2 - Dados disponíveis na literatura com análise da distribuição de heterocromatina e sítios de DNAr em espécies de Bromeliaceae revelados pela técnica de FISH (Fluorescent <i>In situ</i> Hybridization/ Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente)	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismo de Tamanho do Fragmento Amplificado
CAM	Metabolismo Ácido das Crassulaceae
CMA ₃	Cromomicina A ₃
DAPI	4'-6-diamidino- 2-fenilindol
DNA	Deoxyribonucleic Acid / Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization / Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente
GC	Guanina - Citosina
Ma	Milhões de anos
p.	Página
RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolos
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
v.	Volume
8-HQ	8 – Hidroxiquinoleína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	FAMÍLIA BROMELIACEAE.....	13
2.1.1	Relações Filogenéticas em Bromeliaceae.....	14
2.1.2	Subfamília Bromelioideae.....	17
2.1.3	Gênero <i>Cryptanthus</i>	18
2.1.4	Filogenia de <i>Cryptanthus</i>	19
2.2	EVOLUÇÃO DO TAMANHO GENÔMICO EM ANGIOSPERMAS.....	23
2.3	TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA.....	24
2.3.1	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente	25
2.4	CROMOSSOMOS B.....	26
2.5	CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA BROMELIACEAE.....	28
2.6	CITOGENÉTICA DO GÊNERO <i>CRYPTANTHUS</i>	30
3	“Karyotype architecture and variability in <i>Cryptanthus</i> (Bromelioideae, Bromeliaceae) and a critical review on chromosome counts of the Cryptanthoid complex”.....	32
4	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptanthus* (subfamília Bromelioideae) ocorre exclusivamente no Brasil, incluindo 55 espécies descritas (Leme *et al.*, 2017). O gênero se destaca por posição derivada dentro da subfamília Bromelioideae. Além disso, sua filogenia infragenérica ainda não está bem resolvida, sendo conflitante entre propostas taxonômicas existentes (Leme *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2019).

Espécies do gênero ocorrem em uma variedade de habitats, como florestas úmidas, restingas, campos rupestres e caatinga, muitas com distribuição restrita, sendo consideradas microendêmicas. A maioria das espécies ocorre na costa do Atlântico, com ênfase para o nordeste e o sudeste brasileiro (Ramirez-Morillo, 1998; Ramirez-Morillo & Brown, 2001; Luther, 2010; Forza *et al.*, 2013; Leme *et al.*, 2017). Até 2013, oito espécies do gênero *Cryptanthus* figuravam na lista de espécies ameaçadas de extinção devido ao crescente desmatamento de suas áreas de ocorrência, como é o caso de *C. fernseeoides* Leme e *C. whitmanii* Leme (Forzza, 2013).

Considerando estudos citogenéticos, apenas 13% das Bromeliaceae foram estudadas, onde a maioria dos relatórios inclui apenas contagens de cromossomos (Gitaí *et al.*, 2014). A análise cromossômica tem se destacado um dos campos da citologia e da genética aplicável a estudos evolutivos e taxonômicos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma (Brammer *et al.*, 2004). Entre as metodologias citogenéticas usadas, a técnica de FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) é uma das mais promissoras, podendo ser aplicada em áreas tão diversas quanto a citotaxonomia, a citogenética clínica e o melhoramento genético (Guerra, 2004). Essa técnica gerou grandes avanços, possibilitando uma investigação detalhada de estruturas cromossômicas, sendo possível a detecção de diferentes rearranjos cromossômicos, como inserções, deleções, translocação, fusão em tandem, dentre outros (Schubert, 2007).

Como revisado por Gitaí *et al.* (2014), a família Bromeliaceae apresenta número básico de $x = 25$, observado na maioria dos gêneros, com prevalência do nível diploide ($2n = 50$). Por outro lado, os representantes de *Cryptanthus* previamente analisados apresentam números contrastantes para o resto da família com $2n = 32$ e 34 , com prevalência de $2n = 34$ ($x = 17$), considerada uma condição derivada dentro da subfamília Bromelioideae (Gitaí *et al.*, 2014). Além disso,

observa-se a presença de um número variável de cromossomos B em três espécies, incluindo *C. bahianus* L. B. Smith ($2n = 34 + 1-4B$; Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000; Gitaí *et al.*, 2005; Ceita *et al.*, 2008), *C. praetextus* E. Morrenex Baker ($2n = 32 + 1-2B$; Gitaí *et al.*, 2014) e *C. diana* Leme ($2n = 32 + 1-3 B$) (Gitaí *et al.*, 2014).

Embora Bellintaniet *et al.* (2005) tenham relatado cromossomos maiores em *Cryptanthus* em comparação com outras espécies diploides de Bromelioideae, estimativas do conteúdo de DNA de espécies do gênero indicaram similaridade do tamanho do genoma em relação a outros gêneros de Bromelioideae com $2n = 50$, sugerindo que os números básicos $x = 17$ e 16 derivaram de $x = 25$ por disploidia regressiva (Gitaí *et al.*, 2014). Esse é o caso dos membros analisados do gênero *Orthophytum* Beer (complexo Cryptanthoid), com $2n = 50, 100$ ou 150). (Gitaí *et al.*, 2014).

Dessa forma, uma investigação citogenética mais aprofundada (com uso de marcadores cromossômicos estruturais, como sondas teloméricas e sequências de DNAr) pode auxiliar significativamente no entendimento de processos de evolução cromossômica, na delimitação inter e infragenérica, bem como para relacionar diferenças genéticas e morfológicas. Informações cariotípicas, como número cromossômico e morfologia são importantes para o esclarecimento das relações filogenéticas e a identificação de tendências evolutivas em grupos complexos como no caso de *Cryptanthus*, onde ainda são poucas as espécies estudadas citogeneticamente (Gitai *et al.*, 2005; 2014). Assim, o presente trabalho visa responder as seguintes questões: (1) Considerando a hipótese de que os números diploides $2n = 32$ e 34 se originaram de um processo de disploidia regressiva de $2n = 50$, mais de um par de sítios de DNAr 5S e 35 S seria esperado. Esta hipótese é confirmada? (2) Além da variabilidade do número de cromossomos ($2n = 32, 34$), há uma variabilidade na estrutura cromossômica entre espécies homoploides? (3) Os marcadores cromossômicos podem ajudar na compreensão da origem dos cromossomos B em alguns táxons de *Cryptanthus*? (4) As características cariotípicas são indicativas de evolução ativa e hibridização? Para responder a essas perguntas, 15 espécies de *Cryptanthus* s.l. (de 25 acessos) foram analisadas, incluindo contagem e morfologia cromossômica, bandeamento com fluorocromos (DAPI / CMA3) e FISH com DNAr 35S e 5S.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA BROMELIACEAE

Bromeliaceae apresenta ampla distribuição nos Neotrópicos e apresentam uma gama de adaptações que permitem sua sobrevivência em uma variedade de ambientes (Givnish *et al.*, 2014). Na família, foram descritas 3.352 espécies divididas em 58 gêneros (Luther, 2012). Ocorrem desde o sudeste dos Estados Unidos até regiões do Chile e Argentina, com exceção de uma única espécie encontrada no oeste do continente Africano [*Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr.], provavelmente como consequência de um evento de dispersão em longa distância (Smith & Downs, 1974; Jacques-Felix, 2000; Givnish *et al.*, 2004). Bromeliaceae apresenta espécies de plantas herbáceas, em geral rizomatosas, com folhas simples lanceoladas em roseta, formando por vezes um recipiente central ou fitotelmo, que retém água e nutrientes. Apresenta inflorescências geralmente racemosas situadas na posição central da roseta contendo flores com três pétalas e ovário variando de súpero a ínfero com placentação axial. Os frutos podem ser de dois tipos, cápsula ou baga, com sementes aladas, plumosas ou desprovidas de apêndices (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979; Benzing, 2000).

Estudos mostram que a diversificação das espécies de Bromeliaceae está estreitamente ligada à vida em cordilheiras férteis, úmidas e geograficamente extensivas, com vínculos significativos adicionais ao hábito epifítico, à polinização por aves e às fitotelmatas ou presença de tanques (Givnish *et al.*, 2014). Estudos evolutivos mostram que foram observadas menores taxas de extinção do caráter “presença de tanque” em espécies que o apresentam, o que favoreceu a manutenção de espécies da família (Silvestro *et al.*, 2014).

O sucesso da sua manutenção em diversos ambientes está intimamente ligado à presença de inovações-chave, tais como tricomas epidérmicos responsáveis pela absorção de água e o aprimoramento de estratégias de adaptação ao estresse hídrico, como suculência, represamento foliar e fotossíntese do tipo CAM (Metabolismo Ácido das Crassulaceae) (Crayn *et al.*, 2004; Shulte & Zizka, 2008). Em vista destas diversas estratégias, as bromélias destacam-se como importantes elementos ecológicos em muitas comunidades, contribuindo para a

complexidade estrutural do ambiente, o que se reflete diretamente na riqueza e diversidade do grupo, incluindo associações de flora e fauna envolvendo seus representantes (Benzing, 2000).

Na Floresta Atlântica, a família Bromeliaceae figura entre as mais abundantes em espécies (Stehmann *et al.*, 2009). A variação em grande escala da latitude e altitude encontrada na Floresta Atlântica permite a diversificação de habitats dentro de um domínio caracterizado por uma cobertura florestal úmida (Thomas & Barbosa 2008). Dessa forma, padrões espaciais de riqueza e endemismo podem ser encontrados ao longo da extensão geográfica do ecossistema, o que permitiu Prance (1987) identificar uma série de centros de endemismos. Evidências utilizando as ferramentas mais diversas e distintos grupos biológicos confirmam a existência desses padrões e atestam suas origens históricas (Carnaval & Moritz 2008, Carnaval *et al.*, 2009, 2014). Devido ao seu alto grau de endemismo e importante valor ecológico, que são consequência sobretudo da sua interação com a fauna, Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais relevantes da Floresta Atlântica, onde se pode constatar a presença 337 táxons citados em listas oficiais de espécies ameaçadas, sendo os corredores de biodiversidade bastante significativos para a conservação da família, abrigando um grande número de espécies ameaçadas e endêmicas (Martinelli *et al.*, 2008).

Bromeliaceae não só apresenta importante papel ecológico, mas também tem um significativo valor econômico como planta ornamental e para fins alimentícios, como é o caso de *Cryptanthus zonatus* Beer. e do abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.], respectivamente. A família tornou-se mais popular no Brasil devido ao seu valor ornamental, porém esta tendência tem levado a um aumento da pressão antrópica nas populações naturais (Versieux & Wendt, 2007).

2.1.1 Relações filogenéticas em Bromeliaceae

Estima-se que as bromélias surgiram cerca de 100 milhões de anos (Ma) nas Guianas, espalhando-se por radiação para o novo mundo há aproximadamente 16 Ma, sendo uma espécie de *Pitcairnia* dispersa para a África Ocidental há cerca de 9,3 Ma, tendo suas linhagens modernas divergido a partir de 19 Ma (Givnish *et al.*, 2011). Quase dois terços das bromélias existentes pertencem a duas grandes radiações: o núcleo de Tillandsioideae, originário dos Andes há cerca de 14 Ma e as

bromélias do escudo brasileiro, originárias do Serra do Mar e regiões adjacentes a aproximadamente 9,1 Ma, as quais compreendem principalmente a subfamília Bromelioideae (Givnish *et al.*, 2011).

Bromeliaceae foi posicionada na ordem Poales, constituindo um grupo monofilético considerado como irmão do restante das famílias desta ordem (Gilmartin & Brown, 1987; Crayn *et al.*, 2004; Linder & Rudall, 2005; APG III, 2009; Givnish *et al.*, 2007, 2010, 2011). Smith & Downs (1974, 1977, 1979), analisando as características morfológicas de flores, frutos e sementes, inicialmente classificaram a família dividida em três grandes subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae, sendo a primeira um grupo polifilético (Terry *et al.*, 1997; Horres *et al.*, 2000; Crayn *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2004, 2007). Características morfológicas foram utilizadas para delimitação inicial entre as famílias de Bromeliaceae, como observado na Tabela 1 (Smith & Downs, 1974; 1977; 1979).

Tabela 1 – Características morfológicas gerais das subfamílias inicialmente propostas para a família Bromeliaceae. (Smith & Downs, 1974; 1977; 1979)

Subfamília	Folha	Fruto	Semente	Ovário
Pitcairnioideae	Margens espinescentes, serrilhadas ou raramente lisas	Cápsula	Geralmente providas de alas ou outros apêndices	Súpero (flores hipóginas)
Bromelioideae	Margens foliares serrilhadas ou espinescentes	Baga	Sem apêndices	Ífero ou semi-ífero
Tillandsioideae	Margem inteira	Cápsula	Tufos de apêndices plumosos nas extremidades	Súpero ou raramente semi-ífero (Glomeroptcairnia)

Atualmente, estudos moleculares baseados em filogenia molecular utilizando inicialmente o *ndhF*, e posteriormente por uma análise multilocos com oito

genes cloroplastidiais, determinaram que seus gêneros se dividam em oito subfamílias (figura 1): Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae (Givnish *et al.*, 2007, 2011). Bromelioideae e Tillandsioideae são confirmadas como monofiléticas e Pitcairnioideae que emergia nas análises filogenéticas como polifilética, é dividida em seis subfamílias, conforme foi proposto por Givnish *et al.* (2007).

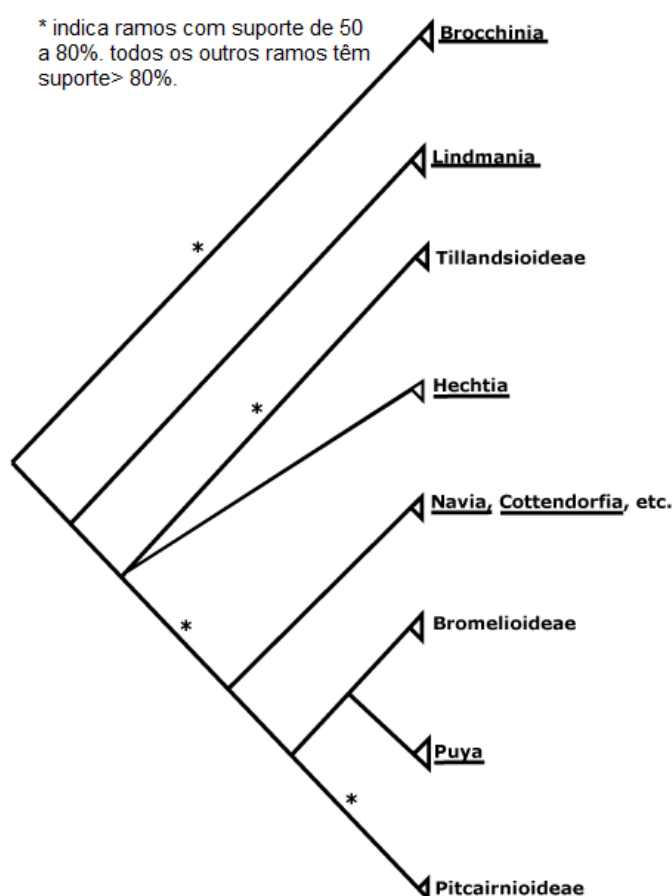


Figura 1. Filogenia simplificada de Bromeliaceae. É possível reconhecer as oito linhagens que representam as oito subfamílias atualmente estabelecidas: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Bromelioideae, Puyoideae e Pitcairnioideae (Reproduzido de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

2.1.2 A Subfamília Bromelioideae

A subfamília Bromelioideae é uma das mais representativas para Bromeliaceae, possui 936 espécies e 33 gêneros, distribuídas pela América Tropical e Subtropical, com centro de distribuição na região Sudeste do Brasil (Butcher & Gouda, 2016).

Tradicionalmente, a subfamília Bromelioideae tem sido separada das demais por apresentar formação de tanque; tricomas peltados foliares, com células irregularmente dispostas; ovário completamente ínfero ou quase, portando óvulos obtusos ou caudados; e frutos do tipo baga, com sementes não apendiculadas (Smith & Downs, 1979). A atribuição da característica monofilética de Bromelioideae é sustentada por sinapomorfias morfológicas, como o fruto do tipo baga e sementes sem apêndices (Horres *et al.*, 2007; Schulte & Zizka 2008; Schulte *et al.*, 2009; Givnish *et al.*, 2011, 2014; Silvestro *et al.*, 2014).

Datações baseadas em análises de dados nucleares e plastidiais propõem que a subfamília evoluiu nos últimos 10 Ma, com uma possível origem ancestral andina e um evento de colonização e irradiação no leste do Brasil, sendo a subfamília monogenérica Puyioideae seu grupo irmão (Givnish *et al.*, 2007, 2011, 2014; Silvestro *et al.*, 2014). Duas linhagens divergem-se a partir de características morfológicas em Bromelioideae (Silvestro *et al.*, 2014). A primeira reúne grande parte das espécies com rosetas que não acumulam água e a segunda linhagem reúne essencialmente gêneros e espécies com roseta formando o tanque típico da família Bromeliaceae (Sass & Specht, 2010).

Por outro lado, o estabelecimento das relações filogenéticas dentro da subfamília Bromelioideae é dificultado (Aguirre-Santoro *et al.*, 2016; Evans *et al.*, 2015; Heller *et al.*, 2015; Louzada *et al.*, 2014; Sass & Specht, 2010; Schulte & Zizka, 2008), principalmente pela presença de diversos gêneros parafiléticos (Sass & Specht, 2010; Smith & Downs 1979). Schulte; Horres & Zizka (2005), a partir de análises moleculares, analisaram a filogenia de 29 gêneros e 58 espécies de Bromelioideae, além de outras espécies de Bromeliaceae. Os autores buscaram ainda compreender aspectos biogeográficos e a evolução do metabolismo do tipo CAM na família. Bromelioideae foi indicada como clado monofilético, provavelmente surgido na região dos Andes, a partir da qual a Mata Atlântica na costa brasileira teria sido colonizada. De acordo com os autores, as espécies ancestrais de

Bromelioideae tinham forma de vida terrestre, fotossíntese do tipo C3 e tanque ausente.

2.1.3 Gênero *Cryptanthus* Otto e Dietr.

Os representantes de *Cryptanthus* são terrícolas ou saxícolas, em geral esciófilas, com exemplos de heliófilas (Leme & Siqueira-Filho, 2006). Apresentam folhas em rosetas, geralmente liguladas ou ocasionalmente com pecíolos bem definidos (Ramírez-Morillo, 1996). As margens das folhas podem ser uniformemente onduladas ou inteiras, ou algumas vezes serradas apenas na base, e ter acúleos de até 5 mm de comprimento em algumas espécies. As inflorescências são compostas e geralmente possuem duas ou três flores, ou mais raramente simples. O ovário é ínfero e os frutos são bagas (Ramírez-Morillo, 1996). *Cryptanthus* apresenta algumas características distintas da família Bromeliaceae, características autapomórficas incluem a tendência para andromonoiccia (Ramírez-Morillo & Brown, 2001; Leme *et al.*, 2017). As informações taxonômicas do grupo são pouco elucidadas, sendo importante estudos filogenéticos e anatômicos de forma mais aprofundada no gênero. Estudos anatômicos são bem escassos, poucos foram os estudos anatômicos relacionados com este gênero, como o de Pereira (2011) com anatomia foliar de *C. schwackeanus* Mez com enfoque descritivo e ecológico, Magalhães *et al.* (2013) com anatomia foliar de *C. zonatus* Beer com cunho taxonômico, Ribeiro & Aoyama (2015) que realizaram a morfo-anatomia foliar de *C. beuckeri* E. Morren em diferentes condições de luminosidade além da anatomia dos órgãos vegetativos de *C. beuckeri* com enfoque taxonômico.

O gênero apresenta valor econômico difundido as espécies utilizadas em ornamentação, como exemplo *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis., que é uma das espécies mais ornamentais e populares do gênero (Leme & Siqueira-Filho 2006).

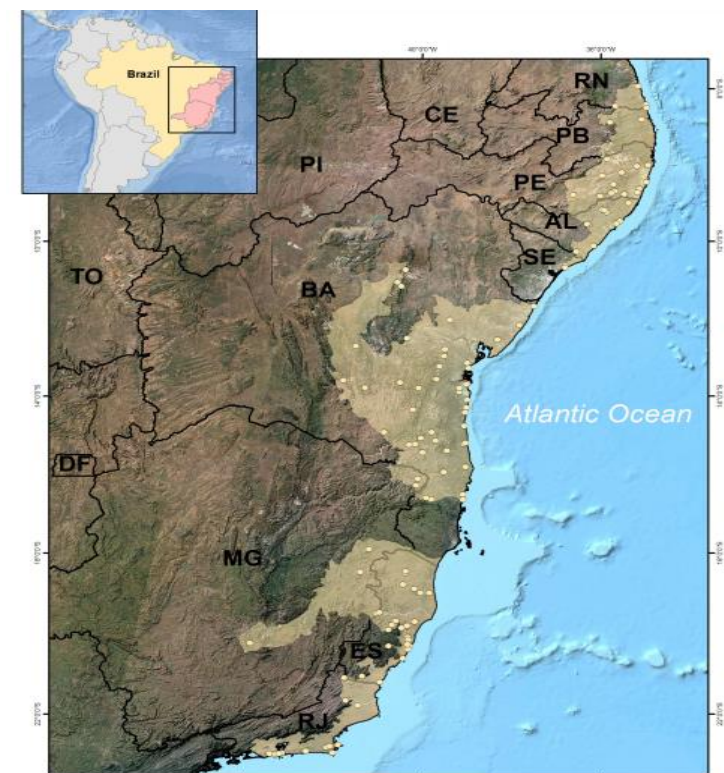


Figura 2. Distribuição geográfica de *Cryptanthus* representada por pontos. Pontos em amarelo representam locais de habitat com alto potencial para *Cryptanthus*. Fonte: Leme et al (2017)

2.1.4 Filogenia de *Cryptanthus*

Cryptanthus vem sendo caracterizado como um gênero derivado entre as Bromelioideae, devido a características morfológicas como: fotossíntese do tipo CAM, tendência ao andromonoicismo e ovário ínfero. Adicionalmente, o número cromossômico básico menor ($x = 17$) encontrado no gênero, fortalece a teoria de *Cryptanthus* ser um gênero derivado na subfamília Bromelioideae, resultante do mecanismo de disloidia que o diferencia do número básico predominante em Bromeliaceae ($x = 25$). (Gitaí et al., 2005; Ceita et al., 2008).

Estudos utilizando AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*/ Polimorfismo de Tamanho do Fragmento Amplificado) forneceram informações importantes sobre os mecanismos filogenéticos moleculares e biogeográficos do gênero *Cryptanthus* (Cruz et al., 2017). A reconstrução filogenética realizada por Cruz et al., (2017), corrobora o monofiletismo de *Cryptanthus* subg. (agora considerado gênero *Cryptanthus*) e determina o subgênero *Hoplocryptanthus* (agora considerado gênero *hoplocryptanthus*), que emerge como parafilético apresentando pelo menos três linhagens distintas. No entanto, em decorrência da limitação do método de AFLP não foi possível identificar os gêneros filogeneticamente

relacionados às linhagens de *Cryptanthus*. Adicionalmente, o subgênero *Hoplocryptanthus* é bem definido no clado basal (Figura 3), assim como o gênero *Orthophytum*, além disso apresentam uma melhor definição em termos de ocupação geográfica, onde além da mata atlântica, campos rupestres, canga estão associados com as espécies do subgênero. Esse padrão fortalece as evidências em favor de uma condição polifilética do subgênero (Cruz *et al.*, 2017).

Posteriormente, Leme *et al.* (2017) baseado em estudos que utilizam características morfológicas, biogeográficas, ecológicas e dados moleculares, propuseram o subgênero *Cryptanthus* como o verdadeiro gênero *Cryptanthus*, dividindo o subgênero *Hoplocryptanthus* em três novos gêneros: *Hoplocryptanthus*, *Rokautskyia* e *Forzzaea*. Adicionalmente, Leme *et al.* (2017) referem-se a estes gêneros juntamente com *Orthophytum*, *Lapanthus* e *Sincoraea* como um “complexo Cryptanthoid”. A análise molecular incorporou 91 acessos representando 33 espécies de *Cryptanthus*, todas as espécies (3) de *Lapanthus*, 42 espécies de *Orthophytum* e nove espécies de *Sincoraea*. A filogenia obtida apenas a partir de dados moleculares é representada na Figura 4. Bromeliaceae tem sido o foco de muitos estudos filogenéticos nas últimas décadas. Esses estudos têm esclarecido muitas questões de longa data sobre a história evolutiva deste grupo de plantas ecologicamente importante, fornecendo uma base para a reconstrução biogeográfica e para a investigação da radiação adaptativa na família (Palma-Silva *et al.*, 2016).

Finalmente, Cruz *et al.*, (2019) fornece um estudo que relaciona o tamanho genômico com a filogenia do complexo. Entretanto, verificou-se que a variação observada no tamanho do genoma no complexo Cryptanthoid pode não estar diretamente relacionada às relações filogenéticas.

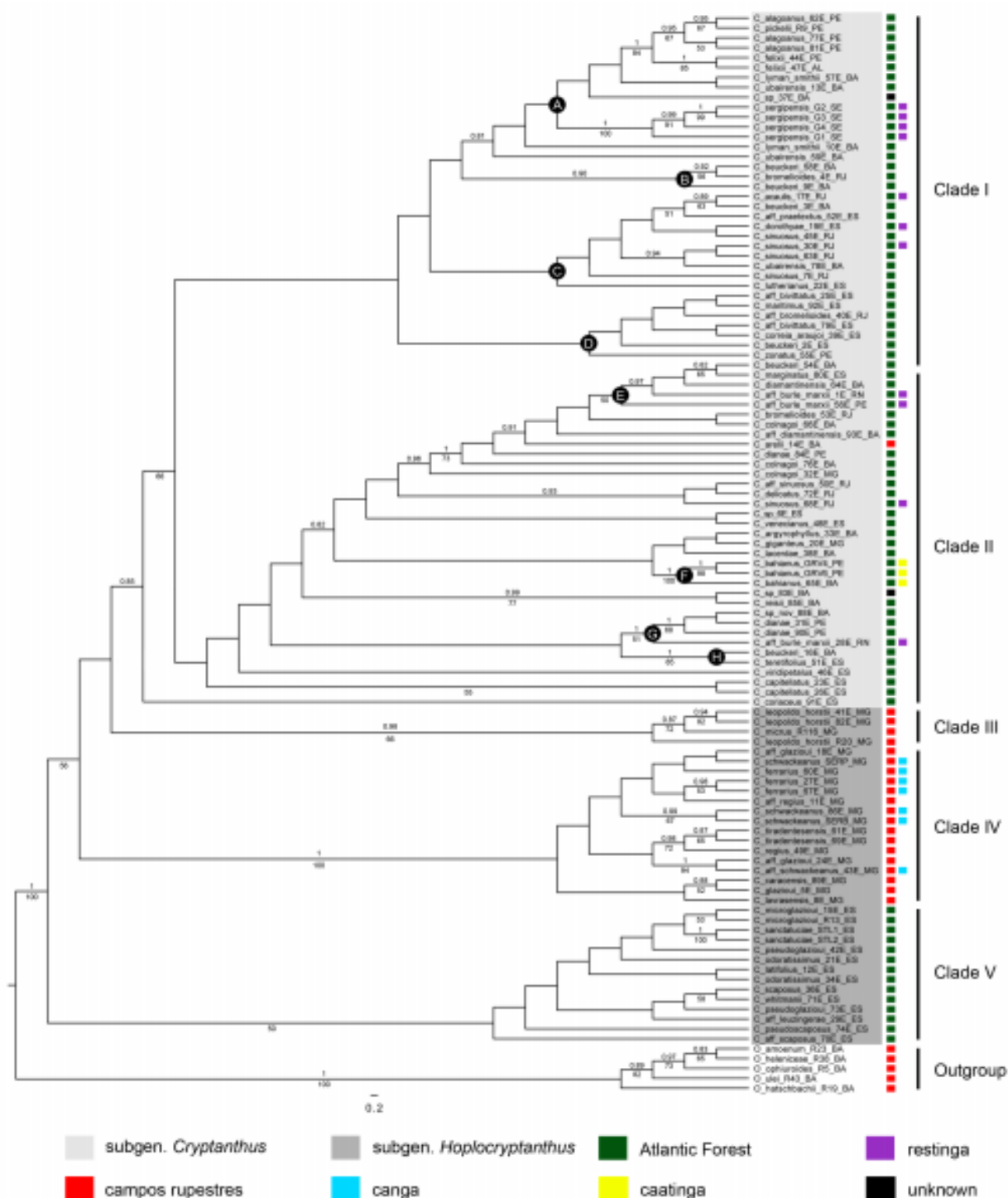


Figura 3. Árvore de inferência bayesiana de 104 acessos de *Cryptanthus* com base em 489 caracteres obtidos com nove combinações de pares de primers AFLP e cinco *Orthophytum* como outgroup. Os quadrados indicam o tipo de subgênero e habitat. Fonte: Cruz et al. (2017)

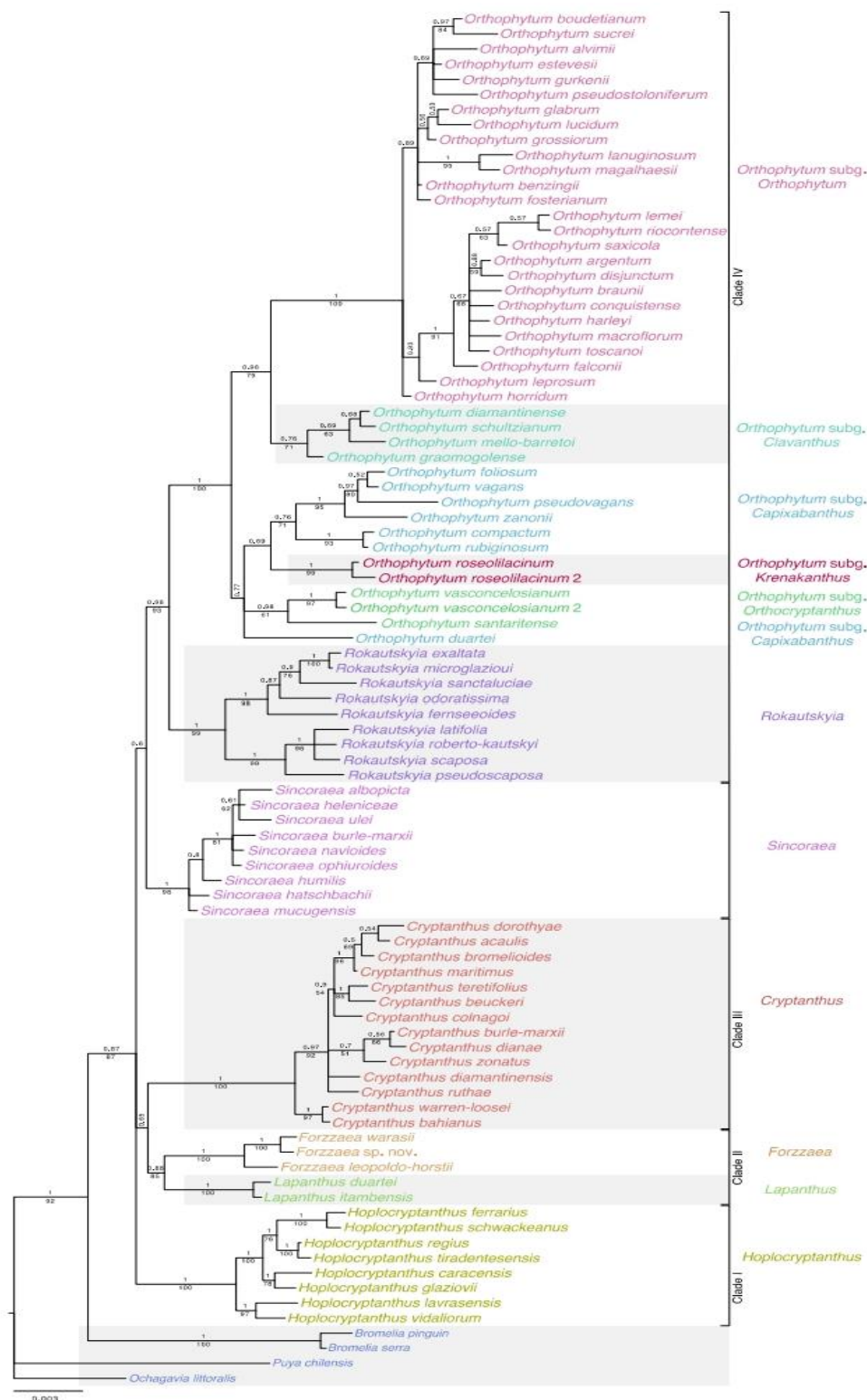


Figura 4. Filogenia obtida por análise bayesiana baseada em dados de marcadores nuclear (AGT1, ETS, PHYC) e plastidiais [matK, trnH-psbA, ycf1 (pos. 1113-2103 e 4492-5440)] dados. As probabilidades posteriores (PP) da análise bayesiana são dadas acima dos ramos, bootstrap percentagens (BP) são mostradas abaixo dos ramos. Valores abaixo de 0,5 PP e 50 BP não são mostrados. Fonte: Leme et al. (2017)

2.2 EVOLUÇÃO DO TAMANHO GENÔMICO DAS ANIOSPERMAS

A variação no tamanho do genoma de angiospermas é causada principalmente pela evolução do DNA repetitivo não codificante (DNA satélite, elementos transponíveis, pseudogenes), que pode ser alterado por diferentes mecanismos, como poliploidização, acúmulo de cromossomos e amplificação de elementos transponíveis (Heslop-Harrison, 2012). Alterações numéricas e estruturais a nível cromossômico podem causar mudanças acentuadas e repentinas no tamanho genômico, enquanto os mecanismos moleculares são mais graduais, produzindo apenas leves modificações (Dušková *et al.*, 2010). Por outro lado, em angiospermas, grande parte dessas alterações são toleradas pelos indivíduos, que desenvolvem mecanismos de adaptação a essas mudanças, como o silenciamento e a ativação de genes (Heslop-Harrison, 2012; Escudero *et al.*, 2014). Populações poliploides, por exemplo, podem sofrer a chamada diploidização do genoma pós-poliploide, gerando gradualmente um genoma funcionalmente diploide através de rearranjos cromossômicos que frequentemente resultam em mudanças dispoloides decrescentes (Mandáková & Lysak, 2018).

O significado biológico e evolutivo do tamanho do genoma são melhor compreendidos por meio da análise das relações filogenéticas, que são os fatores de maior importância para determinar a variação do tamanho do genoma, superando correlações com variáveis ecogeográficas e biogeográficas (Loureiro *et al.*, 2007; 2010). Entretanto, o tamanho do genoma e vários parâmetros ambientais (como habitat, temperatura, precipitação e latitude) têm sido o foco de vários estudos (Loureiro *et al.*, 2010; Rice *et al.*, 2019). Rice *et al.* (2019), por exemplo, sugerem tendência a genomas maiores para plantas situadas em latitude elevada, em ecorregiões com alta frequência de ervas perenes e em baixas temperaturas (regiões polares). Diferenças no tamanho do genoma também estão associadas a algumas características morfológicas ou a capacidades fisiológicas da planta, como a ocorrência em certos tipos de nichos (Francis; Davies & Barlow, 2008). Por exemplo, Veselý *et al.* (2012) observaram que a evolução do tamanho do genoma em geófitas está intimamente relacionada à sua ecologia (por exemplo, crescimento em condições úmidas) e a características fenológicas. Em um estudo do gênero *Lasiocephalus* Willd. ex Schltdl. (Asteraceae), Dušková *et al.* (2010) também encontraram uma forte correlação entre características das plantas (por exemplo,

ciclo de vida) e os tamanhos do genoma. Adicionalmente, Cruz *et al.* (2019), sugere que a ocupação de diferentes habitats desempenha um papel importante na evolução do tamanho do genoma, como observado na diminuição do conteúdo genômico em *Hoplocryptanthus* spp. de campos rupestres comparativamente ao mesmo grupo oriundo da Mata atlântica.

A evolução do tamanho do genoma das angiospermas tornou-se um fenômeno relativamente bem estudado, embora ainda haja vários grupos com informações escassas (Garcia *et al.*, 2014). Em Bromeliaceae, vários estudos investigativos foram realizados para estimar o tamanho do genoma (Zonneveld & Bennet, 2005; Leitch *et al.*, 2010; Gitaí *et al.*, 2014; Cruz, *et al.*, 2017; Moura *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2019; Cruz, *et al.*, 2019).

2.3 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA

Os cromossomos são o mais alto grau de organização do genoma nuclear em nível estrutural e funcional, sendo estes distintos e em geral constantes (morfologicamente e numericamente) para uma determinada espécie. A constância cariotípica dentro de uma espécie surge como um pré-requisito para a correta segregação cromossômica e transferência de material genético para as linhagens celulares futuras, enquanto variações no cariótipo podem conferir mudanças evolutivas (Guerra, 2008; Weiss-Schneeweiss & Schneeweiss, 2013). Estudos citogenéticos tem como base a comparação entre cariótipos de diferentes táxons, fornecendo informações importantes para o entendimento dos mecanismos de evolução das espécies, assim como de relações filogenéticas e sistemáticas (Schubert, 2007; Guerra, 2008; Guerra, 2012). Na citogenética clássica, a descrição de um cariótipo leva em consideração diferentes características, como número, tamanho e morfologia cromossômica (posição de constrições primárias e secundárias), além de observação da simetria do cariótipo e determinação do tipo de núcleo interfásico (Chester *et al.*, 2010).

Em células de organismos eucariotos, a cromatina é constituída por filamentos de DNA genômico associados a diferentes classes de proteínas (histonas e não histonas), sendo estas responsáveis pelos diferentes níveis de condensação (Neves, *et al.*, 2005). Do ponto de vista citogenético, a cromatina pode ser dividida em eucromatina e heterocromatina, sendo esta última caracterizada por se manter

condensada, fortemente corada durante todo o ciclo celular, e é comumente relacionada a sequências de DNA repetitivo em tandem (Ricards & Elgin, 2002). A heterocromatina pode ser observada em cromossomos metafásicos mediante técnicas de bandeamento, as quais revelam o número e padrões de distribuição de bandas ao longo dos cromossomos. Ela foi primeiramente observada no início dos anos 70, por meio de técnicas clássicas de bandeamento, como o bandeamento-C (Sumner, 1972; Vosa & Marchi, 1972), revelando grande polimorfismo nos padrões de distribuição de bandas entre diferentes táxons (Revisado por Guerra, 2000).

Dentre as técnicas comumente utilizadas para a caracterização da heterocromatina, destaca-se a coloração por meio de fluorocromos cromomicina A₃ (CMA), que se liga a regiões ricas em GC, e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que revela regiões cromossômicas ricas em AT (Guerra, 2000). Trabalho pioneiro com os corantes fluorescentes CMA e DAPI foi realizado com três espécies vegetais (*Vicia faba* L., *Scilla siberica* e *Ornithogalum caudatum* Aiton), mostrando as regiões organizadoras do nucléolo e outras partes heterocromáticas marcadas CMA⁺, enquanto as mesmas regiões apresentaram-se negativas para DAPI (Schweizer, 1976).

A coloração diferencial com fluorocromos apresenta vantagem em relação ao bandeamento-C, por ser um método mais simples e por não danificar a estrutura da cromatina, possibilitando, assim, que as preparações cromossômicas sejam sequencialmente submetidas a outras análises, como a hibridização *in situ* fluorescente (Souza *et al.*, 2012). O uso da dupla coloração CMA/DAPI tem permitido discutir diversas hipóteses envolvendo: identificação de alterações cromossômicas (Guerra, 2000), estudos de evolução cariotípica (Chiarini *et al.*, 2013), descrição de híbridos naturais (Moraes *et al.*, 2013), descrição de novas espécies (Almeida *et al.*, 2016), e diferenciação de espécies correlacionadas (Cordeiro *et al.*, 2016; Marinho *et al.*, 2018).

2.3.1 Hibridização *In Situ* Fluorescente

Desenvolvida por Gall & Paduan (1969), a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma metodologia citogenética eficaz e precisa para mapear sequências de DNA de cópia única e repetitiva em cromossomos (He *et al.*, 2015). A técnica consiste na desnaturação e hibridização do ácido nucleico alvo com uma sonda

adequada (DNA ou RNA conhecido e previamente marcado), permitindo a localização *in situ* de sequências de ácidos nucleicos nos cromossomos, citoplasma, organelas e tecidos. Uma diversidade de sondas pode ser marcada e utilizada na hibridização *in situ*, como sequências repetitivas organizadas em tandem (DNA telomérico, DNAr 35S e 5S), sequências repetitivas dispersas (elementos transponíveis) e sequências de cópia única (Guerra, 2012).

A técnica de FISH vem sendo utilizada na hibridização de núcleos interfásicos, cromossomos mitóticos e meióticos, como também em fibras de DNA estendidas. Permite: distinguir e identificar cromossomos individuais; analisar e investigar a estrutura, função e evolução dos cromossomos; analisar a distribuição de DNA repetitivo ao longo do genoma; localizar genes ou sequências específicas de DNA nos cromossomos; integrar grupos de ligação a cromossomos específicos; determinar as origens de genomas de híbridos; auxiliar na elucidação problemas taxonômicos e filogenéticos, e na compreensão da evolução de cromossomos sexuais e de cromossomos B (Jiang & Gill, 2006; Heslop-Harrison & Schwarzach, 2011; Guerra, 2012; Ziemniczak *et al.*, 2015; Badaeva *et al.*, 2018; Malimpensa *et al.*, 2018). Várias sondas podem ser detectadas em um mesmo cromossomo, possibilitando que seja determinada a ordem física das sequências e, conseqüentemente, permitindo a construção de mapas citogenéticos (Peters *et al.*, 2009; Badaeva *et al.*, 2018). Adicionalmente, tem permitido entender de forma mais aprofundada o processo de evolução cariotípica, baseando-se na identificação de rearranjos estruturais, numéricos e evolução de sequências (Mandáková & Lysak, 2008).

2.4 CROMOSSOMOS B

Os cromossomos B, já descrito em 1.685 espécies de eucariotos (Jones, 2017), são adicionais e dispensáveis no cariótipo de alguns indivíduos ou populações de algumas espécies. Geralmente originam-se dos cromossomos do complemento A, mas seguem a sua própria evolução (Camacho, 2000), não sendo essenciais para desenvolvimento e sobrevivência dos organismos (Carvalho *et al.*, 2008). Entretanto, os cromossomos B podem se acumular em populações naturais, por meio de segregação preferencial ou não disjunção cromossômica, uma vez que

não seguem às leis de segregação mendeliana (Camacho, 2005; Clark *et al.*, 2017, Jones & Ruban, 2019). Em angiospermas, há relatos de cromossomos B para 1112 espécies, maioria (66%) do total de espécies descritas (revisado por Jones, 2017), destacando estudos realizados com centeio (*Secale cereale*) (Carchilan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2017; Pereira, 2017) e em *Zea mays* L (Houben *et al.*, 2013).

Esses cromossomos extranumerários não apresentam um padrão de origem em comum. As hipóteses sobre o seu surgimento no genoma são variadas e controversas. As primeiras análises realizadas nas décadas de 1970 e 1980 demonstraram que os cromossomos B continham DNA semelhante ao encontrado no complemento A (Camacho *et al.*, 2005). Dessa forma, a teoria mais aceita sugere que os elementos extras são provenientes do complemento de cromossomos A, como observado em boa parte dos estudos (Valente *et al.*, 2014; Malimpensa *et al.*, 2018; Jones & Ruban, 2019). Seu surgimento pode estar diretamente relacionado a rearranjos cromossômicos do tipo fusão, fissão e a partir da geração de indivíduos híbridos mediante cruzamentos entre espécies próximas (Clark *et al.*, 2017; Jones & Ruban, 2019). A gênese dos Bs pode também estar associada a uma diversidade de eventos, como a partir da formação de isocromossomos (Mestriner *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2004), mecanismos de acumulação de elementos transponíveis (Oliveira *et al.*, 2011), quebra nas regiões organizadoras de nucléolo, visto que essas são suscetíveis a quebras cromossômicas (Ruiz-Esteves *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2014), além do acúmulo de DNA organelar (Ma *et al.*, 2017).

Diversas classes de genes podem estar presentes nos cromossomos B, tais como elementos transponíveis (TEs - transposons e retrotransposons), DNAs ribossomais e DNAs satélites (satDNA) (Camacho, 2005), genes para histonas (Utsunomia *et al.*, 2016), microssatélites (Malimpensa *et al.*, 2018), DNA organelar (Marques *et al.*, 2013), entre outras. Além disso, genes ativos também já foram identificados nos cromossomos B de alguns organismos, como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Navarro-Domínguez *et al.*, 2017), em indivíduos da família Asteraceae, como em *Crepis capillaris* (Leach *et al.*, 2005), no Cervídeo *Capreolus pygargus* (Trifonov *et al.*, 2013) e no centeio (*Secale cereale* L.) (Carchilan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2017). Adicionalmente, alguns trabalhos também trazem evidências da associação dos cromossomos B aos processos de hibridização, preferencialmente em angiospermas cultivadas (Jones & Ruban, 2019).

Devido a sua ocorrência diversificada na natureza e a pouco esclarecimento sobre suas propriedades, cromossomos B se apresentam como sistemas experimentais para resolver uma variedade de questões em citogenética molecular e biologia de populações. Cada vez mais espécies de animais e vegetais são descritas como portadoras de cromossomos B, apontando tais componentes como um problema interessante do ponto de vista evolutivo e funcional (Jones & Ruban, 2019; Ahmad & Martins, 2019).

2.5 CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA BROMELIACEAE

A família Bromeliaceae apresenta apenas 13% de suas espécies analisadas no âmbito da citogenética, havendo poucos dados cariológicos que contribuam para o esclarecimento das lacunas existentes quanto às relações taxonômicas e filogenéticas, entre gêneros e seu posicionamento nas demais subfamílias. A maioria dos estudos está restrita a contagens cromossômicas, havendo em alguns gêneros discrepâncias entre os números mitóticos e meióticos (Gitaí *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2017), justificado por alguns autores pela presença de cromossomos pequenos e dificuldade de obtenção de bons espalhamentos, além da não observação de variações citogenéticas em ampla escala.

Bromeliaceae apresenta uma considerável variação no número de cromossomos ($2n = 18$ a $2n = 200$), enquanto $x = 25$ foi estabelecido como o número base mais provável. Espécies dos gêneros *Cryptanthus*, *Hoplocryptanthus* e *Rokautskyia* são um único grupo dentre os analisados com um número básico sugerido de $x = 17$ ($2n = 32, 34, 36$) sendo esses números considerados como derivados em Bromelioideae (Gitaí *et al.*, 2014). A variação do número diploide nesse grupo pode estar relacionada à disploidia, processo frequentemente descrito em plantas, incluindo outros grupos de campos rupestres, como Xyridaceae (Benko-Iseppon & Wanderley, 2002) e Asteraceae (Salles-de-Mello *et al.*, 2010). Como em outros grupos de plantas, processos de poliploidização pode ser claramente reconhecível em Bromeliaceae (Gitaí *et al.*, 2014).

Análises citogenéticas com Bromeliaceae iniciaram-se com o pioneirismo de Lindschau (1933), que a partir da técnica de corte microtômico de ápices radiculares analisou 50 espécies da família, disponibilizando dados de contagem. Matsuura &

Suto (1935) também realizaram algumas contagens para espécies da família. Marchant (1967), por sua vez, realizou um estudo citogenético acrescentando novas espécies às contagens prévias de Lindschau (1933), encontrando valores que diferiam dos informados pelo primeiro autor.

Até 2013, os estudos na família eram restritos a simples contagens cromossômicas (Mc Willians, 1974; Gauthé, 1965; Weiss, 1965; Sharma, 1971; Louzada, *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2013), como observados para espécies dos gêneros *Orthophytum* (Louzada, *et al.*, 2010) e *Pticaoia* (Nunes *et al.*, 2013). Neste último, foi estabelecido o primeiro kariograma da família Bromeliaceae. Uma revisão mais abrangente foi realizada por Gitaí *et al.* (2014) com o acréscimo de contagens novas e de revisão de todos os números cromossômicos, contabilizando um total de 55 espécies da família, incluindo análises de morfologia e estimativa do tamanho do genoma mediante citometria de fluxo. Esses estudos também evidenciaram uma uniformidade dos cromossomos da subfamília Bromelioideae em tamanho e morfologia, caracterizados por serem muito pequenos (1,12 a 2,91 μm) e com morfologia variando de metacêntrico a submetacêntricos (Bellintaniet *et al.*, 2005; Gitaí *et al.*, 2014) com exceção do gênero *Cryptanthus*, que apresentaram alguns cromossomos ligeiramente maiores que o restante do grupo (Bellintaniet *et al.*, 2005).

Estudos citogenéticos utilizando técnicas de coloração por fluorocromos limitam-se a dois trabalhos, como o de Gitaí *et al.* (2014) onde foi utilizado tripla coloração CMA₃/ Actinomicina/ DAPI nas espécies *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker, *Greigia sphacelata* Ruiz & Pav. e *Ochagavia litoralis* (Phil.) Zizka], além dos estudos de Silva *et al.* (2016), que utilizaram dupla coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI em espécies do gênero *Fosterella*. Adicionalmente, a aplicação da técnica de FISH para a família é restrita ao trabalho realizado em *Fosterella* (Silva *et al.*, 2016). Os dados de ambos os trabalhos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados disponíveis na literatura com análises da distribuição de heterocromatina e sítios de DNAr em espécies de Bromeliaceae revelados pela técnica de FISH (*Fluorescent In situ Hybridization* / Híbridização *in situ* Fluorescente).

Espécies	2n	Bandas CMA	DNAr (35S)	DNAr (5S)	Tamanho	Autor
Bromelioideae						
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	50	2	-	-	2,72–1,36	GITAÍ <i>et al.</i> , 2014
<i>Greigia sphacelata</i> (Ruiz. e Pav.)	50	1	-	-	1,71–0,86	GITAÍ <i>et al.</i> , 2014
<i>Ochagavia litoralis</i> (Phil.) Zizka	50	1	-	-	2,61–1,18	GITAÍ <i>et al.</i> , 2014
Pitcairnoideae						
<i>Fosterella</i>					-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. robertreadii</i> Ibisch & J. Peters	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. christophii</i> Ibisch, R.Vásquez & J. Peters	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. christophii</i> Ibisch, R.Vásquez & J. Peters	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. micrantha</i> (Lindley) L.B. Smith	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. gracilis</i> (Rusby) L.B. Smith	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. floridensis</i> Ibisch & E.Gross	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. hatschbachii</i> L.B. Smith & R.W. Read	100	2	2	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. rusbyi</i> (Mez) L.B.Smith	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. spectabilis</i> H. Luther	50	1	1	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016
<i>F. yuvinkae</i> Ibisch, E. Gross & Reichle	100	2	2	1	-	SILVA <i>et al.</i> , 2016

2.6 CITOGENÉTICA DO GÊNERO *CRYPTANTHUS*

Cryptanthus possui um número básico incomum $x = 17$, resultado de um possível processo de disloidia em grande escala (Gitaí *et al.*, 2014). Adicionalmente, também pela existência de cromossomos B e pelas variações detectadas no tamanho do genoma em espécies com o mesmo nível de ploidia ($2n = 32, 34, 36$). O número básico incomum é considerado uma condição derivada dentro da subfamília Bromelioideae (Gitaí *et al.*, 2014). Além disso, a presença de um

número variável de cromossomos B em três espécies, incluindo *C. bahianus* LB Smith ($2n = 34 + 1 - 4 B$; Cotias-deOliveira *et al.*, 2000; Gitaí *et al.*, 2005; Ceita *et al.*, 2008), *C. praetextus* E. Morrenex Baker ($2n = 32 + 1 - 2B$; Gitaí *et al.*, 2014) e *C. diana* Leme ($2n = 32 + 1-3 B$) (Gitaí *et al.*, 2014).

Apenas 12 espécies do gênero apresentaram números cromossômicos caracterizados até o momento, todas as análises foram baseadas apenas em contagem cromossômica e medições do genoma a partir da citometria de fluxo (Gitaí *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2019). Bellintani *et al.* (2005) apontaram maiores cromossomos em *Cryptanthus* em comparação com outras espécies diploides de Bromeliaceae. Por outro lado, estimativas do conteúdo de DNA de espécies de *Cryptanthus* indicaram similaridade do tamanho do genoma em relação a outros membros de Bromelioideae com $2n = 50$, sugerindo a ocorrência de disploidia no grupo (Gitaí *et al.*, 2014).

Informações cariotípicas, como número cromossômico e morfologia são necessárias para o esclarecimento das relações filogenéticas e tendência evolutiva no gênero, pois ainda são poucas as espécies do gênero estudadas citogeneticamente (Gitaí *et al.*, 2005; 2014).

3. Karyotype architecture and variability in *Cryptanthus* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and a critical review on chromosome counts of the Cryptanthoid complex

JOSÉ ROSENO DE MENDONÇA-FILHO¹; ANA CHRISTINA BRASILEIRO-VIDAL¹; JAÍLSON GITAÍ²; RAFAEL BATISTA LOUZADA³; DÉBORA MARIA CAVALCANTI FERREIRA³ and ANA MARIA BENKO-ISEPPON^{1*};

¹*Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

²*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada/UAST, PE, Brazil*

³*Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

*Corresponding author. Email: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Running title: Karyotype variability in *Cryptanthus*

ABSTRACT

The basic chromosome number $x = 25$ is observed for most Bromeliaceae and is considered ancestral for the family, under different ploidy levels. *Cryptanthus*, and *Hoplocryptanthus* are exceptions, for having species with the basic number $x = 17$, besides the presence of B chromosomes, reported for some *Cryptanthus* species. In the present work, karyological data on 14 taxa of *Cryptanthus* and one related species (*Rokautskyia pseudoglazioui*) was generated, including chromosome counts, CMA/DAPI staining and Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) of 5S and 35S rDNA. Chromosome morphology was highly variable. Species with $2n = 34$ chromosomes had two or three 35S rDNA sites, while all species with $2n = 32$ exhibited three 35S rDNA sites. In turn, the number of 5S rDNA sites varied from one to four. Two to six CMA⁺ bands were observed. The results uncover highly heteromorphic karyotypes, a significant structural diversity, confirming a key role of dysploidy in the karyoevolution of *Cryptanthus*, besides *Rokautskyia* and *Hoplocryptanthus* ($2n = 34$ and 32). B chromosomes were identified in *C. bahianus* and *C. diana* and might be by-products of chromosome evolution. The presence of different basic numbers in distinct clades of the Cryptanthoid complex, with some genera presenting $x = 25$ and other with $x = 17$ or 16 , revealed an unusual heterogeneity, indicating that the relationships of the genera within this complex should be re-evaluated.

Keywords: *Rokautskyia*; *Hoplocryptanthus*; karyoevolution; FISH; rDNA; B-chromosomes.

INTRODUCTION

The genus *Cryptanthus* Otto & A.Dietr. (subfamily Bromelioideae) occurs exclusively and endemically to Brazil, including 55 described species (Leme *et al.*, 2017). The genus has drawn attention due to its derived position within the subfamily Bromelioideae. Besides, its infrageneric phylogeny is still not well resolved, conflicting with existing taxonomic proposals (e.g., Cruz *et al.*, 2017; Leme *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2019). Until recently, the genus was divided into two subgenera (*Cryptanthus* Otto & Dietr and *Hoplocryptanthus* Mez), being both differentiated by morphological and ecological characters besides geographic distribution (Leme *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2019). However, recent phylogenetic studies indicated that the subgenus *Hoplocryptanthus* is polyphyletic (Silvestro; Zizka; Schulte, 2013; Louzada *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2017; Leme *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2019), what justified its subdivision in three genera by Leme *et al.* (2017): *Forzzaea* Leme, S. Heller & Zizka, *Hoplocryptanthus* (Mez) Leme, S. Heller & Zizka and *Rokautskyia* Leme, S. Heller & Zizka. Therefore, *Cryptanthus* sensu stricto includes actually only the members of the *Cryptanthus* subgenus. Currently, they are positioned in a related group denominated "Cryptanthoid complex", which includes seven genera (*Cryptanthus*, *Forzzaea*, *Hoplocryptanthus*, *Lapanthus* Louzada & Versieux, *Orthophytum* Beer, *Rokautskyia* and *Sincoraea* Ule), related by ecology, geographic distribution, endemism, habit, floral and vegetative characters (Leme *et al.*, 2017).

Cryptanthoid species grow in a variety of habitats such as wet forests, Restingas, Campos Rupestres, and Caatinga, many of them with restricted distribution, being thus considered microendemic. For example, *Cryptanthus glazioui* Mez is restricted to the rocky fields of Serra do Caraça, in Minas Gerais, Brazil. Most species occur in the Brazilian Northeast and Southeast regions (Ramirez-Morillo, 1998; Ramirez-Morillo & Brown, 2001;

Luther, 2010; Forzza *et al.*, 2011; Leme *et al.*, 2017). Forzza (2013) reported that eight *Cryptanthus* species figured in the list of endangered taxa due to the increasing deforestation of their areas of occurrence, as it is the case of *C. fernseeoides* Leme, *C. roberto-kautskyi* Leme, *C. fosterianus* L.B.Sm, *C. glazioui*, *C. caracensis* Leme & E.Gross, *C. capitatus* Leme, *C. minarum* L.B.Sm and *C. whitmanii* Leme. No recent survey is available for the genus, but considering their narrow distribution and prevalence of many populations in periurban areas the situation may be even more serious.

Considering cytogenetic studies, only ca. 13% of the Bromeliaceae have been studied so far, and most of the reports include only chromosome counts (reviewed by Gitaí *et al.*, 2014). The main basic number ($x = 25$) is proposed for the family and was observed for most studied genera, with a prevalence of the diploid level ($2n = 50$). On the other hand, *Cryptanthus* and *Hoplocryptanthus* representatives previously analyzed (Table 1) presented contrasting numbers to the rest of the family with $2n = 32$ and 34 , and a prevalence of $2n = 34$ ($x = 17$), considered a derived condition within the Bromelioideae subfamily (Gitaí *et al.*, 2014). According to Cruz *et al.*, (2019), the diversity of the chromosome number observed in representatives of the cryptanthoid group indicates a possible polyphyletic origin. In contrast, counts for 11 species of *Orthophytum* revealed $2n = 50, 100, 150$, while *Lapanthus duartei* (L.B. Smith) Louzada & Versieux was reported to have $2n = 50$ (revised by Gitaí *et al.*, 2014).

Up to date, only 12 *Cryptanthus* species had their chromosome numbers characterized so far (revised by Gitaí *et al.*, 2014). Although Bellintani *et al.* (2005) reported larger chromosomes in *Cryptanthus* as compared to other diploid species of Bromeliaceae, estimates of the DNA content of *Cryptanthus* species indicated similarity of genome size in relation to other members of Bromelioideae with $2n = 50$, suggesting the occurrence of dysploidy (Gitaí *et al.*, 2014). Besides, the presence of a variable number of B chromosomes in two

Cryptanthus species is noteworthy, including *C. bahianus* L. B. Sm. ($2n = 34 + 1-4B$; Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000; Gitaí *et al.*, 2005; Ceita *et al.*, 2008) and *C. praetextus* E.Morren in Baker ($2n = 32 + 1-2B$; Gitaí *et al.*, 2014).

Ribosomal coding (rDNA) regions usually are distributed in two cluster types, one regarding 35S rDNA sites and other for 5S rDNA sites. The 35S clusters comprise the 18S, 5.8S and 26S genes (Seitz and Seitz, 1979) that are transcribed as a large precursor with approximately 35S in size and then processed into respective rRNAs (Volkov *et al.*, 2004), although 45S term is widely used. They may appear as secondary constrictions of mitotic chromosomes, also called Nucleolus Organizer Regions (NORs). In turn, 5S rDNA tandem arrays are composed exclusively of 5S rDNA genes (Grummt and Pikaard, 2003). The nuclear genes encoding rRNA have been the subject of much research amongst molecular biologists and cytogeneticists, particularly for inferring evolutionary relationships between species. The most frequent numbers of 35S sites per diploid karyotype are two and four, whereas a single pair of chromosomes with 5S sites appear in most species. These data suggest that despite the wide dispersion capacity of these sequences, the number of rDNA sites tends to be restricted, and rarely appear in an uneven number of sites (revised by Roa and Guerra, 2012, 2015).

Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) is the method of choice for detecting rDNA sites in plant species (Roa and Guerra, 2012, 2015). Previous studies in *Fosterella* L.B.Sm. (Bromeliaceae) using FISH (Silva *et al.*, 2016) uncovered one pair each of 5S and 35S rDNA sites per complement in diploid species ($2n = 50$), whereas the only tetraploid species ($2n = 100$) studied with FISH presented four 35S rDNA sites. Studies using the fluorochromes CMA (Chromomycin A3) and DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) have also been useful and reveal GC- or AT-rich heterochromatic regions, respectively. Previous analyses with

these fluorochromes in Bromeliaceae revealed only NOR-associated CMA positive regions (Gitaí *et al.*, 2005, 2014; Silva *et al.*, 2016).

Despite the singularities considering *Cryptanthus* chromosome numbers and morphology, no previous reports included data on chromosome banding or FISH with rDNA repetitive sequences that have the potential to act as markers and help to trace karyoevolutive trends in the group. Thus, the present work targets the following questions: (1) Considering that previously analyzed diploid species ($2n = 50$) presented a single pair of each 5S and 35S rDNA, is this number maintained in *Cryptanthus* species? (2) Are these rDNA sequences useful markers to understand karyotype evolution within the genus? (3) In addition to the variability of chromosome numbers ($2n = 32, 34$) is there chromosome structural variability between homoploid species? (4) Can chromosome markers (e.g., rDNA sites) help in understanding the genesis of B chromosomes in some *Cryptanthus* taxa? (5) FISH and fluorochrome banding can confirm the dysploidy hypothesis by comparing species with $2n = 32$ and $2n = 34$ chromosomes?

For this purpose, 14 *Cryptanthus* and one *Rokautskyia* species were analyzed (out of 25 accessions), including chromosome counts and morphology, fluorochrome banding (DAPI/CMA), and FISH with 35S and 5S rDNA. The here generated data was discussed in the light of all available chromosome data for the Cryptanthoid complex.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

A list of the 14 *Cryptanthus* and one *Rokautskyia* species among 25 accessions analysed in the present study (with their voucher number and provenances) is available in Table 1.

Slide preparation

For the preparation of slides, root tips were collected of potted plants sampled in the field (eventually of germinated seeds) and then pre-treated at 18 °C in 8-hydroxyquinoline (2 mM) for 4.5 h. The roots were then fixed in ethanol:acetic acid (3:1 v/v) at room temperature for 24 h and stored at -20 °C until use. For conventional staining, fixed root tips were washed in distilled water and hydrolyzed in 5N HCl at room temperature for 20 min. Slides were obtained by crushing the meristematic tissue in 60% acetic acid and then staining with 2% Giemsa for 15 min and assembled with Entellan (Merck). For staining with DAPI, the fixed root tips were washed in distilled water and digested in an enzyme solution containing 2% cellulase (Onozuka R-10, Serva) and 20% pectinase (v/v) (Sigma-Aldrich) for 4 h at 37 °C. Slides preparation followed the protocol described by Carvalho & Saraiva (1993) with modifications introduced by Vasconcelos *et al.* (2010). In the follow the slides were stained in DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 2 µg ml⁻¹/glycerol solution (1:1, v/v).

Double staining with CMA/DAPI

After aging of the slides for three days, double staining was carried out with the fluorochromes CMA (chromomycin A₃) and DAPI, following Schweizer (1976), with 20 µL CMA at 0.5 mg ml⁻¹ for 1 h, and 20 µl DAPI at 2 µg ml⁻¹ for 30 min. The slides were then stored for three days, until analysis and image capture. In the follow the slides were decolorized in ethanol:acetic acid (3:1, v/v) for 30 min, followed by immersion in absolute ethanol at room temperature for 1 h, being stored at -20 °C for posterior FISH procedure.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

For FISH R2 probes were used, consisting of a 6.5 kb fragment with the 18S-5.8S-15S rDNA of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Wanzenböck *et al.*, 1997), besides D2, a 400 pb

fragment with two units of 5S rDNA repeats of *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen (Pedrosa *et al.*, 2002). Both probes (5S and 35S rDNA) were labeled by nick translation with digoxigenin-11-dUTP or biotin-11-dUTP. Chromosome and probe denaturation conditions, post-hybridization washes and detection were carried out as described by Pedrosa *et al.* (2003), except the stringency wash that was carried out in 0.1x SSC at 42 °C. Labeled probes (digoxigenin or biotin) were detected using anti-digoxigenin conjugated with rhodamine (Roche Diagnostics) and streptavidin conjugated with Alexa Fluor (Invitrogen), respectively, in a solution containing 1% bovine serum albumin (p/v). Slides were counterstained with 2 µg ml⁻¹ DAPI and were mounted in Vectashield (Vector; 1:1, v/v).

Data analysis

Slides were analyzed in a Leica® DFC 340FX epifluorescence microscope and were optimized for contrast and brightness using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated). Best images were acquired by a CCD camera using CW 4000 Leica® software. The relative chromosome sizes were measured using the MicroMeasure v3.3 program, and at least 10 metaphases were evaluated for each species. B chromosomes were classified from the absence of the homologous pair, taking into consideration morphological comparison and chromosome measurements. A minimum of 50 cells was analyzed for each species with probable B chromosomes (*C. bahianus* and *C. diana*e Leme).

RESULTS

For the 15 analyzed species, small chromosomes (2.91 – 1.01 µm) were observed, most of them submetacentric (Table 1). Twelve species presented the diploid number $2n = 34$, while the remaining three species (including *Rokautskyia pseudoglazioui* (Leme) Leme, S. Heller & Zizka) exhibited $2n = 32$ (Figures 1, 2, 3 and 4). For all species, interphase nuclei were of the

semi-reticulated type, as shown for *C. warren-loosei* Leme (Figure 1E) and *C. diamantinensis* Leme (Figure 1F).

B chromosomes were observed in two of the analyzed species: *C. bahianus*, $2n = 34 + 1-3 B$ (Figure 1A), and in both accessions of *C. diana*, $2n = 32 + 1-3 B$ (Figure 1B). In both species, Bs were present in all analyzed cells, varying in number from one to three Bs.

In species with $2n = 34$, the size of A chromosomes varied from 1.01 to 2.68 μm , whereas in species with $2n = 32$ the sizes varied from 1.02 to 2.91 μm . For *R. pseudoglazioui* (Figure 1C) and *C. warren-loosei* (Figure 1D), a considerably larger chromosome pair was identified, as compared with the other chromosomes of the complement. In turn, the size of B chromosomes ranged from 0.74 to 0.88 μm in *C. bahianus* and from 0.75 to 0.85 μm in *C. diana*.

Two or three GC-rich heterochromatin bands were observed, associated with NOR-bearing chromosomes as revealed by CMA⁺/DAPI⁻ bands (positive for CMA and negative for DAPI bands) at the terminal or interstitial portion of the chromosomes (Figures 2, 3 and 4).

Additionally, in *C. boanovens* Leme (Figure 2D, D') and in *C. burle-marxii* Leme (Figure E, E'), a 5S rDNA site was also CMA⁺, but DAPI⁰ (neutral). Besides, *C. boanovens* (Figure 2D, D') also presented two CMA⁺/DAPI⁰ not associated with rDNA sites. All species also presented heteromorphism of size and/or brightness of CMA⁺ bands, as exemplified by *C. acaulis* Beer (Figure 2A) and *C. zonatus* Beer (Figure 3F).

FISH results also uncovered a high infrageneric variability, evidenced by the number of hybridized rDNA sites (Figure 5). All three species with $2n = 32$ exhibited three 35S rDNA sites (*C. diana*, Figure 4B; *C. warren-loosei*, Figure 4D; *R. pseudoglazioui*, Figure 4F); and one (*C. diana*) or three (*R. pseudoglazioui* and *C. warren-loosei*) 5S rDNA sites. In *C. diana*, 35S and 5S rDNA sites were located in terminal and interstitial regions, respectively, of different chromosomes (Figures 4B, 5C). However, in *C. warren-loosei* (Figure 4D) and *R.*

pseudoglazioui (Figure 4F) rDNA sites varied in size, intensity (brightness), and location. The three 5S rDNA sites were terminal for *C. warren-loosei*, and terminal or subterminal for *R. pseudoglazioui*, whereas for the 35S rDNA they were all interstitial (Figure 5D). One of the 35S rDNA sites was positioned adjacent to one of the 5S terminal rDNA sites, whereas the other two sites were located on separate chromosomes. In *R. pseudoglazioui*, the 5S and 35S rDNA carrier chromosome and a 35S rDNA carrier always presented a satellite.

Among the 12 species with $2n = 34$, seven presented four 5S rDNA sites and two 35S rDNA sites, while four had two 5S rDNA sites and two 35S rDNA sites (Figures 2 and 3). Only *C. boanovens* had three 35S rDNA sites and one 5S rDNA site (Figure 2D, D').

The 35S rDNA sites were heteromorphic in size and intensity in all analyzed species, and sometimes in position, as observed in *C. acaulis* (Figure 2A'), *C. diamantinensis* (Figure 2F'), *C. pseudopetiolatus* (Figure 3B') and *C. zonatus* (Figure 3F'). The location of 35S rDNA sites varied, being interstitial (*C. bahianus*, Figure 5A), terminal (*C. pseudopetiolatus* Philcox, Figure 5B) or subterminal (*C. reisii* Leme, Figure 5A), following the same pattern identified in the double staining with the fluorochromes CMA⁺/DAPI⁻, with predominance of the subterminal position (19 out of 34 bands).

In turn, the 5S rDNA sites were more uniform in size among species with $2n = 34$ when compared to the 35S rDNA sites. In general, they were terminal or subterminal. However, in *C. acaulis* (Figure 5A), *C. diamantinensis* (Figure 5A), *C. lutherianus* I.Ramírez (Figure 5A), *C. reisii* (Figure 5A), *C. sergipensis* I.Ramírez (Figure 5A), *C. burle-marxii* (Figure 5B), *C. pseudopetiolatus* (Figure 5B), *C. walkerianus* Leme & L.Kollmann (Figure 5B) and *C. boanovens* (Figure 5C), at least one 5S rDNA site was heteromorphic and located in regions ranging from subterminal to interstitial position. Besides, *C. diamantinensis* (Figures 2F' and A) shared in one of its chromosomes both rDNA (one 5S and one 35S), differing from all other species analyzed with the same chromosome number.

DISCUSSION

Karyological studies in Bromeliaceae are still limited and were restricted to chromosome counts in most cases. Previous approaches, including chromosome banding and FISH in a phylogenetic context, were applied only to *Fosterella* (Silva *et al.*, 2016) of the Pitcairnioideae subfamily, besides some isolated evaluations of three Bromelioideae species (*Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker ex Benth. & Hook.f., *Greigia sphacelata* Regel and *Ochagavia litoralis* (Phil.) Zizka, Trumpler & Zöllner) with fluorochrome staining by CMA and DAPI (Gitaí *et al.*, 2005). The present work is the first to use banding procedures and FISH to characterize cytogenetically 14 *Cryptanthus* and one *Rokautskyia* species, both genera belonging to the “Cryptanthoid complex” (Bromelioideae subfamily), including new counts for 11 species. As revised by Gitaí *et al.* (2014), $2n = 34$ is the prevalent diploid number in *Cryptanthus*, a scenario also confirmed in the present work, where 12 (out of 14 analyzed species) exhibited this number. The number $2n = 34$ was also reported for *Hoplocryptanthus schwackeanus* (Mez) Leme, S.Heller & Zizka (Ramírez-Morillo & Brown, 2001) from the same complex (Leme *et al.*, 2017).

In the present work, only three species (*C. diana*, *C. warren-loosei*, and *R. pseudoglazioui*) presented $2n = 32$. It is noteworthy that two out of three species with $2n = 32$ (*C. warren-loosei* and *R. pseudoglazioui*) presented a larger chromosome pair, with approximately 2.78 and 2.91, respectively, which correspond to 1.4 and 1.5 times the average chromosome size of each species, respectively. Chromosome counts are new for *C. diana* and *R. pseudoglazioui*. However, in previous chromosome counts of *C. warren-loosei* (a population from Salvador, Bahia state, Brazil), the number $2n = 34$ was reported, but with

chromosomes of similar sizes (Ceita *et al.*, 2008), diverging from the two here analyzed populations (both collected in Morro do Chapéu, Bahia State).

No studied species presented $2n = 36$ nor $2n = 54$, both numbers previously reported by Lindschau (1933) for few species and possibly associated with miscounts, as indicated by Gitaí *et al.* (2005, 2014) (see also Table 1). Such discrepancies have been detected when comparing new data with older reports. Lindschau (1933) used the manual section technique that should be considered with caution. The major concern in regard to the section technique relies on the fact that metaphase chromosomes are often positioned in different planes in three-dimensional nuclei. Thus, the evaluation of stained cuts often leads to over- or underestimation of chromosome number.

Dysploidy is known as the stepwise increase or decrease in chromosome number observed among related species (Ehrendorfer, 1964). Examples of dysploid series were reported for *Clarkia* Pursh, *Crepis* L., *Crocus* L., *Haplopappus* Cass., and *Luzula* DC. (revised by Guerra, 2008). They have been often related to events as Robertsonian rearrangements, tandem fusion or may result from an association of reciprocal translocations and pericentric inversions (Guerra, 2008; Schubert & Lysak, 2011), often with discrete changes or no changes in genome size (revised by Escudero *et al.*, 2014). Complex rearrangements, including reciprocal translocations and pericentric inversions, are considered to be associated, for example, with the decreasing dysploidy that originated the number $n = 5$ in *A. thaliana*, as compared with two other *Arabidopsis* species and four related genera (Lysak *et al.*, 2006). Such a stepwise decrease has also been called ‘post-polyploid diploidization’, generating different haploid numbers (Mandáková & Lysak, 2018).

Since most Bromeliaceae exhibit $2n = 50$ or higher ploidy levels (Gitaí *et al.*, 2014), they can be considered paleopolyploids as previously proposed by Grant (1981). The term ‘paleopolyploid’ was proposed by Mangenot & Mangenot (1962) and refers to a polyploid

group whose diploid ancestors are unknown or were extinct (Mandáková & Lysak, 2018). Considering this and the derived position of Bromelioideae in the Bromeliaceae phylogeny published by Givnish *et al.* (2011), it has been suggested that $2n = 34$ and 32 are conditions derived from $2n = 50$ by decreasing dysploidy as proposed by several authors (e.g., Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000, Gitaí *et al.*, 2005; 2014; Cruz *et al.* 2019). The larger chromosome pair in species with $2n = 32$ (*C. warren-loosei* and *R. pseudoglazioui*), for instance, could be the result of chromosome fusion from a species with $2n = 34$ (Ramírez-Morillo and Brown, 2001), as proposed for some other angiosperm groups with descending dysploidy (revised by Mandáková & Lysak, 2018).

On the other hand, when looking at the recently published phylogeny of the Cryptanthoid complex (see Figure 6 and Table 1) by Leme *et al.* (2017) some heterogeneity can be recognized, with an alternation of the basic numbers $x = 25$ and $x = 17$ and 16 along with the clades (Figure 6). It would be expected that genera with $x = 25$ would cluster near the outgroup and not alternated along the phylogeny. No counts are available for *Sincoraea*, and a single species was analyzed for *Hoplocryptanthus* and *Rokautskyia* (Figure 6). Thus, a broader coverage – including members of all clades – is desirable to generate a clear picture of the karyotype evolution within the Cryptanthoid complex, besides a further enrichment of the phylogeny with additional polymorphisms.

Additionally, Cruz *et al.* (2019) performed the reconstruction of the genome size of the phylogenetic tree for the Cryptanthoid complex. However, the study did not show a clear pattern of covariance between species in the group. The genome size was more variable within the genus *Cryptanthus* in relation to other genera, with changes that point to an increase in the DNA content. Besides, *Rokautskia*, *Sincoraea*, and *Hoplocryptanthus* presented similar genome sizes. In general, the variation observed in the size of the genome in the Cryptanthoid complex cannot be directly related to the proposed phylogenetic

relationships (Cruz *et al.*, 2019). This variation corroborates with the cytogenetic analyzes performed here, showing variations in the chromosome size comparing species of *Cryptanthus*. Besides, Cruz *et al.* (2019) suggested that the occupation of different habitats possibly played a role in the genome size evolution between species of the complex, as observed in the decrease of genomic content in *Hoplocryptanthus* spp. of rupestrian fields.

Intraspecific chromosome heteromorphisms regard differences in size and position, or also an uneven number of marker sequences, including rDNA sites, or even in chromosome sizes and position of constrictions. Some type of heteromorphism was observed for all investigated species in the present work (Figure 5). In the literature, high intraspecific variation in the number and position of 35S rDNA sites were reported, for example, in *Phaseolus vulgaris* L. (Pedrosa-Harand *et al.*, 2006). Such polymorphisms may be related to chromosome rearrangements, like insertions, deletions, duplications, translocations, inversions, which are considered major evolutionary forces (Ahmad & Martins, 2019). Additionally, according to Roa and Guerra (2012), the number and/or size of the rDNA sites can be amplified within a karyotype by dispersion and/or amplification of repetitive units. However, in higher plants, when amplified, they tend to maintain the relative position of the original site, with 35S rDNA sites prevailing in terminal regions, as observed in *C. diamantinensis* and opposite to the observed in *C. warren-loosei* and *R. pseudoglazioui*.

Additionally, hybridization processes are known to cause significant heteromorphisms in rDNA (5S and 35S) sites, as observed here, regarding repeat number, position, and size (Figure 5). In *Citrus* L. species, for instance, hybridization processes were previously associated with several heteromorphisms between homologous chromosomes carrying rDNA sites, regarding their position and size (Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007). In the present work, odd rDNA sites were observed, even considering that no hybridization events were conclusively reported for *Cryptanthus*. The presence of three 5S rDNA sites was

observed in two species with $2n = 32$ chromosomes and one site for the other two species with $2n = 34$. Besides, three 35S rDNA sites were detected in four species with $2n = 32$ and 34. Previous studies in *Fosterella* (Silva *et al.* 2016), the only Bromeliaceae genus analyzed by FISH, revealed stable karyotypes with no heteromorphisms and only one pair of each 5S and 35S rDNA sites.

Furthermore, for three here analyzed species 5S rDNA was associated with 35S rDNA in a single chromosome, a rare event in higher plants (revised by Roa and Guerra, 2015). The sharing of 5S and 35S rDNA sites on a single chromosome evidenced in *C. diamantinensis* ($2n = 34$) may be the result of random transpositions (Roa and Guerra, 2015) or a consequence of a reciprocal translocation, as suggested for species of the subfamily Aurantioideae (Barros e Silva *et al.*, 2013), and *Cichorium intybus* L. varieties (Bernardes *et al.*, 2013).

Most species presented CMA⁺ bands colocalized with NORs (Nucleolus Organizer Regions), except in *C. burle-marxii* and *C. boanovensis*, where one of the CMA⁺ bands colocalized with 5S rDNA site. A similar result has already been described in some other angiosperms and may be related to the amplification of GC-rich regions, as observed in *Ricinus communis* L. (Vasconcelos *et al.*, 2010) and *Hypochaeris catharinensis* Cabrera (Reck *et al.*, 2011). In *C. burle-marxii*, only one of the two chromosomes carrying the 5S rDNA site proved to be CMA⁺, probably because it presented distinct GC content in the 5S rDNA intergenic regions, as suggested by Cabral *et al.* (2006). These authors also proposed that changes in chromatin, including epigenetic factors (such as cytosine methylation), may interfere with the association of rDNA with CMA staining.

The presence of B chromosomes in some Bromeliaceae, including *Cryptanthus* (*C. bahianus* and *C. praetextus*), was reported before (Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000; Gitaí *et al.*, 2005; Ceita *et al.*, 2008; Gitaí *et al.*, 2014), except for *C. diana*, here studied for the first

time. It is interesting that in the case of *C. bahianus*, reports of different populations from Bahia (present work and Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000) besides an accession cultivated at the Botanical Garden of the Leipzig University (analyzed by Gitaí *et al.*, 2014) presented the same chromosome number $2n = 34$ and the presence of B chromosomes (1-3 or 1-4 Bs, Table 1), indicating that Bs are not restricted to a single population or accession.

Different studies have pointed out that Bs generally originate from rearrangements regarding chromosomes of the A complement (Artoni *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013), as also revised by Marques *et al.* (2018). In the present work, the origin of Bs could not be tracked since no bands were observed in these supernumerary chromosomes. Anyway, previous works also bring evidence that B chromosomes can arise from meiotic mispairing resulted from interspecific hybridization (Camacho *et al.*, 2000; Jones & Ruban, 2019). The latter mode of origin was firstly proposed by Battaglia (1964) and was confirmed by other authors (McVean, 1995; Camacho *et al.*, 2000). In plants, for instance, interspecific crosses between *Coix aquatica* Roxb. ($2n = 10$; published as *C. aquaticus*) and *C. gigantea* J.Koenig ($2n = 20$ and aneuploids) generated plants with different chromosome number, in which *C. gigantea* chromosomes showed B-like-behavior during meiosis (Sapre & Deshpande, 1987). B chromosomes were also detected in hybrids between two cultivated lines of *Pennisetum glaucum* R.Br. (Le Thi *et al.*, 1994). Besides, recombination of nonhomologous chromosomes during the DNA double-strand repair process at S-phase in *T. aestivum* L./*Elymus trachycaulus* (Link) Hoover hybrids was suggested for the formation of a ‘zebra chromosome’, composed of *T. aestivum* L./*Elymus trachycaulus* rearranged chromosome fragments (Zhang *et al.*, 2008), which was described by Dhar *et al.* (2019) as “a novel mechanism for the evolution of B chromosome”. In *Cryptanthus*, hybridization events are not described yet but shall be considered and tested in future studies.

The cytogenetic resemblance between *R. pseudoglazioui* and *C. warren-loosei* is noteworthy, both with $2n = 32$ and conservation in the number and positioning of rDNA blocks and CMA⁺ bands. In the phylogeny generated by Leme *et al.* (2017) *C. warren-loosei* is positioned in clade III (*Cryptanthus*), separately from the representatives of *Rokautskyia* (*R. pseudoglazioui* was not included in the phylogeny). The cytogenetic similarities in both species ($2n = 32$) could be due to convergence since they belong to different clades and *C. warren-loosei* was grouped in the same clade of *C. bahianus* (Leme *et al.*, 2017), with $2n = 34 + 1-3$ B. Anyway, additional evaluation of the taxonomic relationships of both taxa is advisable.

Concluding remarks and perspectives

The present evaluation of 14 *Cryptanthus* and one *Rokautskyia* species (15 taxa/25 accessions) indicated that they share the uncommon numbers $2n = 34$ and 32 (with main basic number $x = 17$), together with the previously studied *Hoplocryptanthus* ($x = 17$; $2n = 34$). On the other hand, numbers reported for *Orthophytum* ($2n = 50, 100, 150$) and one *Lapanthus* species ($2n = 50$) are indicative of the basic number $x = 25$, prevalent in Bromeliaceae family. The scenario described here points to some heterogeneity of the group regarding the karyotype/genome architecture, demanding further studies for a better definition of the Cryptanthoid complex. While for *Orthophytum*, a role of polyploidy can be recognized, chromosome numbers of *Cryptanthus*, *Rokautskyia*, and *Hoplocryptanthus* indicate dysploidy as the main mechanism of chromosome evolution.

All analyzed species presented some chromosome heteromorphism (differences among homologs) regarding size, position, number, or intensity of chromosome markers considering 5S and 35S rDNA blocks revealed by FISH or CMA⁺ bands (GC-rich DNA).

Such widely observed heteromorphisms are surprising and unprecedented in Bromeliaceae, whereas an uneven number of 5S or 35S rDNA markers are indicative of instability and ongoing genome evolution. Also, B chromosomes were identified in three species, but their origin could not be tracked using fluorochromes or by FISH with rDNA probes. Such features have been widely reported as a consequence of interspecific hybridization in plants. Given the cytogenetic characteristics reported here, additional evaluations are mandatory, including, for example, evaluation of meiosis to check if the chromosomes form bivalents (or multivalents) and if segregation is normal. Reproductive biological studies can also be elusive, including pollen viability, evaluation of seed germination rates, achievement of controlled interspecific crosses, and may help to evaluate the extent to which the groups in question are actually reproductively isolated, also helping to understand the prevailing karyoevolutive mechanisms in this fascinating taxonomic group.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JOSÉ ROSENO DE MENDONÇA-FILHO: carried out the experiments, participated in conceiving and planning of the experiments, contributed to the interpretation of the results, and wrote the manuscript.

ANA CHRISTINA BRASILEIRO-VIDAL: conceived and planned the experiments, co-supervised the project, contributed to the interpretation of the results, and writing of the manuscript.

JAÍLSON GITAÍ: collected material and helped with the growth of potted plants, conceived and planned the experiments, co-supervised the project, provided critical feedback and helped to shape the research.

RAFAEL BATISTA LOUZADA: collected material and helped with the growth of potted plants, provided critical feedback and helped to shape the research.

DEBORA MARIA CAVALCANTI FERREIRA: collected material and helped with the growth of potted plants and roots acquisition, provided critical feedback.

ANA MARIA BENKO-ISEPPON: conceived and planned the experiments, obtained funding for the research, supervised the project, contributed to the interpretation of the results and writing of the manuscript.

All authors read the manuscript and agree with its content.

Acknowledgments

We thank Elton M.C. Leme for providing biological material and for identification of part of the studied species. To Geyner A.S. Cruz, Rodrigo C.G. Oliveira and Maria Betânia M. de Oliveira we thank for suggestions and interesting discussions. We also acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil – PROBRAL Program) and FACEPE (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco, Brazil) for financial support and fellowships.

4. REFERÊNCIAS

- Aguirre-Santoro J, Michelangeli FA, Stevenson DW.** 2016. Molecular phylogenetics of the Ronnbergia Alliance (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into their morphological evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100: 1–20.
- Ahmad SF, Martins C.** 2019. The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. *Cells*, 8: 5–17.
- Almeida EM, Wanderley AM, Nollet F, Costa FR, Souza LGR, Felix LP.** 2016. A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. *Systematic Botany*, 41:2:423–429.
- APG III.** An updated of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III, 2009. *Botanical Journal Linnean Society*, 161: 105–121.
- Artoni RF, Vicari MR, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC.** 2009. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19: 3.
- Badaeva ED, Ruban A, Shishkina AA, Sibikeev SN, Druzhin AE, Surzhikov SA, Dragovicha A.** 2018. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. ($2n=4x=28$, $UcUcXcXc$) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat $\times$ *Ae. columnaris* introgressive lines. *Genome*, 61(2): 131–143.
- Barros e Silva AE, Dos Santos Soares Filho W, Guerra M.** 2013. Linked 5S and 45S rDNA sites are highly conserved through the subfamily Aurantioideae (Rutaceae). *Cytogenetics and Genome Research*, 140: 62–69.
- Battaglia E.** 1964. Cytogenetics of B-chromosomes. *Caryologia*, 17: 245–299.

- Barlow J, Peres CA.** 2008. Fire-mediated dieback and compositional cascade in an Amazonian forest. *R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363: 1787–1794.
- Bennett MD, Leitch IJ.** 2005. Genome size evolution in plants. In: Gregory T, eds. *The evolution of the genome*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 89–162.
- Benko-Iseppon AM, Wanderley MGL.** 2002. Cytogenetic studies on Brazilian *Xyris* species (Xyridaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 138: 2: 245–252
- Benzing, D H.** 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, 1:690.
- Bellintani MC, Assis JGA, Cotias-de-Oliveira ALP.** 2005. Chromosomal evolution of Bromeliaceae. *Cytologia*, 70: 129–133.
- Bernardes ECS, Benko-Iseppon AM, Vasconcelos S, Carvalho S, Brasileiro-Vidal AC.** 2013. Intra- and interspecific chromosome polymorphisms in cultivated *Cichorium L. species* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 36: 357–363
- Brammer, S P.** 2015. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82: 01–08.
- Butcher D, Gouda E.** 2018. The new Bromeliad Taxon list, 2018. Disponível em: <<http://botu07.bio.uu.nl/bcg/taxonList.php>>
- Cabral JS, Felix LP and Guerra M.** 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 29: 659–664
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW.** 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 355, 163–178.
- Carchilan M, Kumke K, Mikolajewski S, Houben A.** 2009. Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma*, 118:5:607.

- Carnaval AC, Moritz C.** 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35: 1187–1201.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C.** 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323: 785–789.
- Carnaval AC, Waltari E, Rodrigues MT, Rosauer D, VanDerWal J, Damasceno R, Prates I, Strangas M, Spanos Z, Rivera D, Pie MR, Firkowski CR, Bornschein MR, Ribeiro LF, Moritz C.** 2014. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281.
- Carvalho CR, Saraiva LS.** 1993. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic and Histochemistry*, 68: 142–145.
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M.** 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic and Genome Research*, 109: 276–282.
- Ceita GO, Assis JGA, Guedes MLS, Cotias-de-Oliveira ALP.** 2008. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. *Botanical Journal Linnean Society*, 158: 189–193.
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE.** 2010. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes*, 1(2): 166–192.
- Clark FE, Conte MA, Ferreira-bravo IA, Poletto AB, Martins C, Kocher TD.** 2017. Dynamic Sequence Evolution of a Sex-Associated B Chromosome in Lake Malawi Cichlid Fish. *J Hered*, 53–62.
- Chiarini FE, Santinaque FF, Urdampilleta.** 2013. Genome size and karyotype diversity in *Solanum* sect. *Acanthophora* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 300:113–123.

- Cordeiro JMP, Lima SAA, Paz SN, Santos MAS, Felix LP.** 2016. Karyotype evolution in the genus *Jacaranda* Juss. (Jacarandaeae, Bignoniaceae): chromosome numbers and heterocromatin. *Genetics and Molecular Research*, 15: gmr15048973.
- Cordeiro JMP, Kaehler M, Souza G, Felix LF.** 2017. Karyotype analysis in Bignoniaceae (Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89: 2697–2706.
- Cotias-de-Oliveira AL, Assis JGA, Bellintani MC, Andrade JCS, Guedes MLS.** 2000. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 173–177.
- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Ceita G, Palmeira ACL, Guedes MLS.** (2004.) Chromosome number for Bromeliaceae species occurring in Brazil. *Cytologia*, 69:161–166.
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC.** 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 101:3703–3708
- Cruz, GAS.** Filogenia molecular, evolução e biogeografia do gênero *Cryptanthus* Otto & DIETR. (Bromeliaceae). 2013. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Cruz GAS, Zizka G, Silvestro D, Leme EMC, Schulte K, Benko-Iseppon AM.** 2017. Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107: 152–165.
- Cruz GAS, Mendonça-Filho JR, Vasconcelos S, Gitaí J, Campos, Lyderson Facio Viccini JMS, Zizka G, Leme EMC, Brasileiro-Vidal AC, Benko-Iseppon AM.** 2019. Genome size evolution and number of chromosomes of species of the cryptantoid complex (Bromelioideae, Bromeliaceae) in a phylogenetic structure, *Botanical Journal da Linnean Society*, boz103, <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz103>

- Dhar MK, Kour J, Kaul S.** 2019. Origin, Behaviour, and Transmission of B Chromosome with Special Reference to *Plantago lagopus*. *Genes*, 10, 152.
- Dušková E, Kolář F, Sklenář P, Rauchová J, Kubešová M, Fér T, Suda D, Marhold K.** 2010. Genome size correlates with growth form, habitat and phylogeny in the Andean genus *Lasiocephalus* (Asteraceae). *Preslia*, 82: 127–148
- Ehrendorfer, F.** 1964. Cytologie, Taxonomie und Evolution bei Samenpflanzen. *Vistas in Botany*, 4: 99–186.
- Escudero M, Martín-Bravo S, Mayrose I, Fernández-Mazuecos M, Fiz-Palacios O, Hipp AL, Pimentel M, Jiménez-Mejías P, Valcárcel V, Vargas P, Luceño M.** 2014. Karyotypic changes through dysploidy persist longer over evolutionary time than polyploid changes. *PLoS One*, 9(1): e85266.
- Evans TM, Jabaily RS, Faria APG, Sousa LOF, Wendt T, Brown GK.** 2015. Phylogenetic Relationships in Bromeliaceae Subfamily Bromelioideae based on Chloroplast DNA Sequence Data *Phylogenetic. Systematic Botany*, 40: 116–128.
- Forzza RC.** 2013. Bromeliaceae. In: Martinelli, G.; Moraes, M. A. *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 315-396.
- Forzza, RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G.** 2011. Bromeliaceae em Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006324>
- Francis D, Davies MS, Barlow PW.** 2008. A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level. *Annals of Botany*, 101: 747–757.
- Garcia S, Leitch IJ, Anadon-Rosell A, Canela MÁ, Gálvez F, Garnatje T, Gras A, Hidalgo O, Johnston E, Mas De Xaxars G, Pellicer J, Siljak-Yakovlev S, Vallès J, Viales D, Bennett, MD.** 2014. Recent updates and developments to plant genome size databases. *Nucleic Acids Research*, 42: 1159-1166.

- Gauthe J.** 1965. Contribution à l'étude caryologique des Tillandsiees. *Memories du Museum National d'Histoire Naturelle*, 16: 39–59.
- Gilmartin AJ, Brown GK.** 1987. Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies. *Systematic Botany*, 22.
- Gitaí J, Horres R, Benko-Iseppon AM.** 2005. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Systematic Evolution*, 253: 65–80.
- Gitai J, Paule J, Zizka G, Schulte K, Benko-Iseppon AM.** 2014. Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 176: 349–368.
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Chris Pires J, Berry PE, Sytsma KJ.** 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American–African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Sciences*, 165: S35–S54.
- Givnish TJ, Milliam KC, Berry PE, Sytsma KJ.** 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23 :3–26.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ.** 2011. Adaptive radiation and diversification in Bromeliaceae: insights from a 7-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872–895.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska P a, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ.** 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71: 55–78.

- Grant V.** (1981). Plant Speciation, second edition. Columbia University Press, New York.
- Grummt I, Pikaard CS.** 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:641–649.
- Guerra, M.** 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 23:1029–1041.
- Guerra M.** 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research*, 120: 339–350.
- Guerra M.** 2012. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems*, 146: 3703–710.
- He Q, Cai Z, Hu T, Liu H, Bao C, Mao W, Jin W. 2015. Repetitive sequence analysis and karyotyping reveals centromere-associated DNA sequences in radish (*Raphanus sativus L.*). *BMC Plant Biology* 15: 105.
- Heller S, Leme EMC, Schulte K, Benko-Iseppon AM, Zizka G.** 2015. Elucidating Phylogenetic Relationships in the Aechmea Alliance: AFLP Analysis of Portea and the Gravisia Complex (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany*, 40: 716–725.
- Heslop-Harrison JS.** 2012. Genome evolution: extinction, continuation or explosion? *Current Opinion in Plant Biology*, 15:115–121
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T.** 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant Journal*, 66(1):18–33
- Horres R, Zizka G, Kal G, Weising K.** 2000. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biology*, 2:306–315.
- Horres R, Schulte K, Weising K, Zizka G.** 2007. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso*, 23: 27–43.
- Houben A, Banaei-Mohhaddam AM, Klemme S, Timmis JN.** 2013. Evolution and biology of surpnumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71:467-478

- Huang W, Du Y, Zhao X, Jin W.** 2016. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays L.*). *BMC Plant Biology* 18:88.
- Jacques-Félix H.** 2000. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana*, 8:511.
- Jiang JM, Gill BS.** 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*. 49: 1057–1068.
- Jones N.** 2017. New species with B chromosomes discovered since 1980. *The Nucleus*, 60: 263–281.
- Jones N, Ruban A.** 2019. Are B chromosomes useful for crop improvement? *Plants People Planet*, 1:84–92.
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF.** 2010. Genome size dynamics and evolution in monocots. *Journal of Botany*, ID 862516.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA.** 2006. Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: Siqueira-Filho JA, In: Leme EMC, eds. *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste - biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 191–381.
- Leme Elton MC, Heller S, Zizka G, Halbritter H.** 2017. New circumscription of *Cryptanthus* and new *Cryptanthoid* genera and subgenera (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular phylogeny. *Phytotaxa*, 318: 10–45.
- LeThi K, Lespinasse R, Siljakyakovlev S, Robert T, Khalfallah N et al.** 1994. Karyotypic modifications in androgenetic plantlets of Pearl millet, *Pennisetum glaucum* (L) R-Brunken - occurrence of B chromosomes. *Caryologia* 47: 1–10.
- Lindschau M.** 1933. Beitrage Zur Zytologie de Cromeliaceae. *Planta* 3: 506–530.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C.** 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: test with 37 species. *Annals of Botany*, 100:875–888.

- Loureiro J, Trávníček P, Rauchová J, Urfus T, Vít P, Štech M, Castro S, Suda J.** 2010. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia*, 82: 3-21.
- Louzada RB, Versieux LM.** 2010. *Lapanthus* (Bromeliaceae, Bromelioideae): A new genus from the southern Espinhaço range, Brazil. *Systematic Botany*, 33: 497-503.
- Louzada RB.** Revisão taxonômica e filogenia de *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae, Bromelioideae). Luther H. 2012. An alphabetical list of Bromeliad binomials, 13th ed. Marie Selby Bot. Gardens and Bromeliad Soc. International, Sarasota.
- Louzada RB, Schulte K, Wanderley M, Silvestro D, Zizka G, Barfuss MH, Palma-Silva C.** 2014. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 77: 54–64.
- Luther HE.** 2010. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. Rabinowits, L. & Holst, B.K. (eds.), The Sarasota Bromeliad Society & Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota, 43–45.
- Luther HE.** 2012. An alphabetical list of Bromeliad binomials, 13th ed. Marie Selby Bot. Gardens and Bromeliad Soc. International, Sarasota.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I.** 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 5224–5229.
- Ma W.** 2017. Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog. *New Phytologist*, 213(2):916–928.

- Magalhães R, Lavor P, Versieux L, Calvente A.** 2013. Anatomia Foliar do Complexo *Cryptanthus zonatus* (Bromeliaceae). In: 64° Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte - MG. Anais do 64° Congresso Nacional de Botânica.
- Marino ACTA, Vasconcelos S, Vasconcelos EV, Maques DA, Benko-Iseppon AM, Brasileiro-Vidal AC.** 2018. Karyotype and genome size comparative analyses among six species of the oilseed-bearing genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 41:442–449.
- Marques A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S.** 2013. B chromosomes of rye are highly conserved and accompanied the development of early agriculture. *Annals of Botany*. doi:10.1093/aob/mct121.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC.** 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, 59: 209–258.
- Malimpensa GC, Traldi JB, Toyama D, Henrique-Silva F, Vicari MR, Moreira-Filho, O.** 2018. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. *Cytogenetics and Genome Research*, 154:99–106.
- Mandáková T, Lysak MA.** 2008. Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). *The Plant Cell*, 20(10):2559–70
- Mandáková T, Lysak MA.** 2018. Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Current Opinion in Plant Biology*, 42: 55–65.
- Mangenot S, Mangenot G.** 1962. Enquête sur les nombres chromosomiques dans une collection d'espèces tropicales. *Revue de Cytologie et Biologie Végétale* 25: 411–447.
- Marchant CJ.** 1967. Chromosome evolution in the Bromeliaceae. *Kew Bulletin*, 21: 161–168.

- Matsuura H, Sutô H.** 1935. Contributions to the idiogram study in phanerogamous plants I. Journal of Faculty of Sciences of Hokkaido Imperial University 5: 33–75.
- McVean GT.** 1995. Fractious chromosomes: hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. Bioessays 17: 579-582.
- McWilliams EL.** 1974. Bromeliaceae. Chromosome number and evolution. In: Smith LB, Downs RJ eds. Flora Neotropica . New York: Afner Press, 14: 33–40.
- Mestriner, CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruizà, IRG, Abel LS, Moreira-Filho O, Camacho JPM.** 2000. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Heredity, 85.
- Mez C.** 1986. Bromeliaceae. In: C. De Candolle. Monographiae Phanerogamarum. Paris. Sumptibus Masson, 9: 1–144.
- Miao VP, Covert SF, Vanetten HD.** 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. Science. 254:1773–1776.
- Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, Santos Soares Filho Wdos, Guerra M.** 2007. Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. Cytogenetic and Genome Research, 119: 275–281.
- Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC.** 2004. B Chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, tetragonopterinae): An overview in natural populations. Cytogenetics and Genome Research, 106: 230–234.
- Moura NV, Forzza RC, Cristiano MP.** 2018. Reconstruction of ancestral genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae): what can genome size tell us about the evolutionary history of its five genera? Botanical Journal of the Linnean Society, 186: 321-333.
- Müller LLB, Zotz G, Albach DC.** 2019. Bromeliaceae subfamilies show divergent trends of genome size evolution. Scientific Reports, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41474-w>.

- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, Corral JM, López-León MD, Sharbel TF, Camacho JPM.** 2017. Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Scientific Reports*, 7:45200.
- Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais CL, Viegas W.** 2005. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and genome research*, 109(1-3): 104-111.
- Nunes ACP, Nogueira EU, Gontijo ABPL.** 2013. The first karyogram of a Bromeliaceae species: an allopolyploid genome. *Plant Systematics and Evolution*, 299: 1135.
- Oliveira LN, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, Moura RC.** 2011. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Molecular Cytogenetics*. 4:24.
- Oliveira SG, Cabral-de-Melo DC, Moura RC, Martins C.** 2013. Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in *Scarabaeinae coleopterans*. *Molecular Cytogenetics*, 6: 3–12.
- Palma-Silva C, Leal BSS, Chaves CJN, Fay MF.** 2016. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 305–322.
- Pansonato-Alves, JC.** 2014. Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*. *PLoS ONE*, 9(9):107169–10.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A.** 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161: 1661–1672.
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair A, Schweizer D.** 2003. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 205–212.

- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M.** 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 924–933.
- Peters AS, Datema E, Szinay D, Van-Staveren MJ, Schijlen EG, Van-Haarst JC, Hesselink T, Abma-Henkens MH, Bai Y, Jong H, Stiekema WJ, Lankhorst RMK, Van-Ham RC.** 2009. *Solanum Lycopersicum* cv. Heinz 1706 chromosome 6: distribution and abundance of genes and retrotransposable elements. *Plant Journal, Malden*, 58: 857–869.
- Pereira, T A R.** Anatomia foliar de Bromeliaceae Juss. do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.
- Pereira, H.S. Rye.** 2017. (*Secale cereale*) supernumerary (B) chromosomes associated with heat tolerance during early stages of male sporogenesis. *Annals of Botany*, 119:325–337
- Prance GT.** 1987. Biogeography of Neotropical Plants. In: Whitmore TC, Prance GT, eds. *Biogeography and Quaternary History in Tropical America*. New York: Oxford University Press, 46–65.
- Ramírez-Morillo IM.** 1996. Systematics, phylogeny and chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). PhD Thesis. University of Missouri, St. Louis. 267–268.
- Ramírez-Morillo IM.** 1998. Systematic Revision of *Cryptanthus*: Major Results. *Journal of Bromeliad Society*, 48: 50–59.
- Ramírez-Morillo IM, Brown GK.** 2001. The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Systematic Botany*, 26: 722–726.
- Reck M, Benício L, Ruas EA, Rodrigues LA, Ruas PM, Ortiz MA, Talavera S, Urtubey E, Stuessy T, Weiss-Schneeweiss H.** 2011. Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochaeris catharinensis* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 296: 231–243.

- Ribeiro, FF, Aoyama, EM.** 2015. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Cryptanthus beuckeri* E. MORREN (BROMELIACEAE). Enciclopédia biosfera. 22:10
- Richards EJ, Elgin SC.** 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4): 489-500.
- Roa F, Guerra M.** 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 225–230.
- Roa F, Guerra M.** 2015. Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenet Genome Research*, 146:243–249
- Ruiz-Esteves M, López-Leon MD, Cabrero J, Camacho JPM.** 2012. Bchromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PloS One*, 7:5:36600.
- Salles-de-Melo MRC, Lucena RM, Semir J, Carvalho R, Pereira RCA, Benko-Iseppon AM.** 2010. Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae). *Plant Syst Evol*, 285:189–199.
- Santos LP, Castro JP, Francisco CM, Vicari MR, Almeida MC, Goll LG, Morelli S, Artoni R.** 2013. Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics*, 6: 1–5.
- Sapre AB, Deshpande DS.** 1987. Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity*, 78: 191–196.
- Sass C, Specht CD.** 2010. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 559–571.
- Schubert I, Lysak MA.** 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27: 207–216.
- Schubert, I.** 2007. Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, v 10, p. 109–115.

- Schulte K, Horres R, Zizka G.** 2005. Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family. *Senckengergiana biológica*, 15: 113–125.
- Schulte K, Zizka G.** 2008. Multi locus plastid phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) and the taxonomic utility of petal appendages and pollen characters. *Candollea*, 63: 209–225.
- Schulte K, Barfuss MHJ, Zizka G.** 2009. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 327–339.
- Schweizer D.** 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 4: 307–324.
- Seitz U, Seitz U.** 1979. The molecular weight of rRNA precursor molecules and their processing in higher plant cells. *Zeitschrift für Naturforschung*, 34: 253–259.
- Sharma AK, Gosh I.** 1973. Cytotaxonomy of the family Bromeliaceae. *Cytologia* 36: 237–247.
- Silva HML, Vasconcelos EV, Benko-Iseppon AM, Wagner N, Weising C, Brasileiro-Vidal AC.** 2016. Chromosomal features of *Fosterella* species (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 3: 532–541.
- Silvestro D, Zizka G, Schulte K.** 2013. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution*, St. Louis, 68: 1: 163–175.
- Silvestro, D.** 2014. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution*, 68: 163–175,
- Smith LB, Downs RJ.** 1974. Flora Neotropica. In Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York, 1–658.
- Smith LB, Downs RJ.** 1977. Flora Neotropica. In Tillandsioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York, pp 663–1492.

- Smith LB, Downs RJ.** 1979. Flora Neotropica. In Bromelioideae (Bromeliaceae). New York Botanical Garden, New York, pp 1493–2142.
- Smith, LB, Downs, RJ.** 1984. Flora Neotropica. In Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York, 658.
- Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M.** 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of botany*, 109(5): 987-999.
- Stehmann, JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY.** 2009. Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Sumner AT.** 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75(1): 304- 306.
- Terry RG, Brown GK, Olmstead RG.** 1997. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*, 84: 664–670.
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, Perelman, PL.** 2013. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biol*, 11:90
- Thomas WW, Barbosa MR V.** 2008. Natural Vegetation Types in the Atlantic Coastal Forest of Northeastern Brazil. In: Thomas WW, Britton EG, eds. The Atlantic Coastal Forest of Northeastern Brazil. New York: The New York Botanical Garden Press, 6 – 20.
- Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Arayane-Jaiime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC.** 2016. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PloS One*, 11: e0150573.
- Valente GT, Conte M, Fantinatti BEA, Cabral-de-Melo DC, Carvalho RF, Vicai MR, Kocer T, Martins C.** 2014. Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish

Astatotilapia latifasciata Based on integrates Genomic Analyses. *Molecular biology and Evolution*. 31:1–72.

Valente, GT, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher T, Martins C. 2016. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma*, 1–9.

Vasconcelos S, Souza AA, Gusmão CLS, Milani M, Benko- Iseppon AM, Brasileiro-Vidal AC. 2010. Heterochromatin and rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron*, 41: 746–753.

Versieux, Wendt. 2007. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 16:2989–3009.

Versieux, L.M.; Wendt, T.; Louzada, R.B.; Wanderley, M.G.L. 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4:99–110.

Veselý P, Bureš P, Šmarda P, Pavlíček T. 2012. Genome size and DNA base composition of 15 geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Annals of Botany*, 109: 65–75.

Volkov RA, Medina FJ, Zentgraf U, Hemleben V. 2004. Molecular Cell Biology: Organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance and nucleolus structure. In: *Progr. Botany* (Esser *et al.*, eds.) vol. 65, pp. 106–146, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Vosa, CG, Marchi, P. 1972. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature*, 237(75): 191-192.

Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A. 1997. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 11: 1007–1016.

Weiss HE. 1965. Etude caryologique et cyto-taxonomique de quelques Bromeliacees. *Memories du Museum National d'Histoire Naturelle*. 16: 9–38.

- Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM.** 2013. Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Angiosperms. *Holocentric Chromosomes*, 1: 209–230
- Zhang P, Li W, Friebe B, Gill BS.** 2008. The origin of a “zebra” chromosome in wheat suggests nonhomologous recombination as a novel mechanism for new chromosome evolution and step changes in chromosome number. *Genetics*, 179: 1169–1177.
- Ziemniczak K, Traldi JB, Noaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari MR.** 2015. In situ Localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet Genome Res*, 4:25–332.
- Zonneveld BJM, Leitch IJ, Bennet D.** 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 Angiosperms. *Annals of Botany*, 96: 229–244.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Metaphase Chromosomes (A–D) and interphase nuclei (E, F) of *Cryptanthus* and *Rokautskyia* species stained with DAPI (pseudocolored in grey, inverted images). A. *Cryptanthus bahianus*; B. *C. diana*; C. *Rokautskyia pseudoglazioui* (= *C. pseudoglaziovii*) D, E. *C. warren-loosei*. F. *C. diamantinensis*. Arrows point B chromosomes, and arrowheads indicate the largest chromosomes of the complement. Bar in F represents 5 μ m.

Figure 2. Metaphase chromosomes of diploid *Cryptanthus* species ($2n = 34$), stained with CMA/DAPI (A, B, C, D, E, F) and after FISH with rDNA probes (A', B', C', D', E', F') in *C. acaulis* (A, A'), *C. alagoanus* (B, B'), *C. bahianus* (C, C'), *C. boanovens* (D, D'), *C. burle-marxii* (E, E'), and *C. diamatinensis* (F, F'). Arrows indicate CMA⁺ bands (yellow) and 35S rDNA sites (red). Arrowheads 5S rDNA sites (green). Asterisks indicate chromosomes, which share 5S and 35S rDNA sites. Bar in F' represents 5 μ m.

Figure 3. Metaphase chromosomes of diploid *Cryptanthus* species ($2n = 34$), stained with CMA/DAPI (A, B, C, D, E, F) and after FISH with rDNA probes (A', B', C', D', E', F') in *C. lutherianus* (A, A'), *C. pseudopetiolatus* (B, B'), *C. reisii* (C, C'), *C. sergipensis* (D, D'), *C. walkerianus* (E, E'), and *C. zonatus* (F, F'). Arrows indicate CMA⁺ bands (yellow) and 35S rDNA sites (red). Arrowheads 5S rDNA sites (green). Asterisks indicate chromosomes that share 5S and 35S rDNA sites. Bar in F' represents 5 μ m.

Figure 4. Metaphase chromosomes *Cryptanthus* species ($2n = 32$) stained with CMA/DAPI fluorochromes (A, C, E) and after FISH with rDNA probes (B, D, F) in *C. diana* (A, B), *C.*

warren-loosei (C, D), and *Rokautskyia pseudoglazioui* (= *C. pseudoglaziovii*) (E, F). Arrows indicate CMA⁺ bands (yellow) and 35S rDNA sites (red). Arrowheads indicate 5S rDNA sites (green). Asterisks indicate chromosomes, which share 5S and 35S rDNA sites. Bar in F represents 5 μ m.

Figure 5. Schematic representation of *Cryptanthus* and *Rokautskyia* chromosomes carrying rDNA sites (35S and 5S) evidencing position and sizes considering the diploid chromosome complement of each indicated species. Light green blocks indicate 5S rDNA sites, and dark green blocks indicate 5S rDNA sites co-localized with CMA⁺ bands. Blocks in red indicate 35S rDNA sites co-localized with CMA⁺ bands. The species *Rokautskyia pseudoglazioui* in D corresponds to the previous *C. pseudoglaziovii*.

Figure 6. Main phylogenetic relationships among genera of the Cryptanthoid complex (based on Leme *et al.*, 2017) along with chromosome numbers (present work and literature data), ploidy level, and number of analyzed species.

TABLE LEGENDS

Table 1. Analyzed taxa with provenance, voucher numbers, occurrence, and karyological data (present work), together with a review of all previously studied chromosome counts of the Cryptanthoid complex (under “Previous Reports”). Possible chromosome miscounts from previous studies are presented between parentheses.