

JAILSON GITAÍ DOS SANTOS FRAZÃO

**Contribuição de Características
Citogenéticas e Moleculares à Sistemática
de Bromeliaceae**

**Recife, PE
Abril de 2006.**

JAILSON GITAÍ DOS SANTOS FRAZÃO

Contribuição de Características Citogenéticas e Moleculares à Sistemática de Bromeliaceae

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal, na área de concentração Citogenética e Citotaxonomia de Plantas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Maria Benko-Iseppon
Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal,
Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

**Recife, PE
Abril de 2006**

JAÍLSON GITAÍ DOS SANTOS FRAZÃO

“CONTRIBUIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS
CITOGENÉTICAS E MOLECULARES À
SISTEMÁTICA DE BROMELIACEAE”

BANCA EXAMINADORA:



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



Profª. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal - UFPE



Profª. Dra. Neide Santos - UFPE



Profª. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho - UFPE



Profª. Dr. André Luís Laforga Vanzela - UEL

Recife-PE.
2006

Frazão, Jailson Gitaí dos Santos
Contribuição de Características Citogenéticas e Moleculares à
Sistemática de Bromeliaceae / Jailson Gitaí dos Santos Frazão. – Recife:
O Autor, 2006.

115 folhas : il., fig., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB.
Biologia vegetal, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bromélias – Análise citotaxonômica 2. Análise molecular AFLP 3.
Bandeamento cromossômico I. Título.

582.564
584.85

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCB – 2006-076

AGRADECIMENTOS

À minha **família** pelo apoio dado aos meus estudos durante toda minha trajetória acadêmica.

À Professora **Ana Maria Benko Iseppon**, pela amizade, confiança e suporte científico fornecidos ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos Professores **George Zizka** e **Wilfried Morawetz**, pela acolhida e disponibilização das instalações dos laboratórios em Frankfurt (Johann Wolfgang Goethe Universität) e em Leipzig (Universität Leipzig) para a realização das análises moleculares e citogenéticas.

À Família Klappich; **Hanna, Rainer** e **Julio Klappich**, pela alegre receptividade e ajuda na estadia em Frankfurt.

Ao **Rob Berenschot** pela ajuda inestimável, companheirismo, incentivo e ajuda durante toda a minha estadia na Alemanha.

Ao Sr. **Schulmeyer**, responsável pelo setor das bromélias do Palmengarten (Prefeitura de Frankfurt) e ao Jardineiro **Jörg**, que gentilmente me facilitaram as coletas durante o período de primavera e verão nas casas de vegetação.

Ao **DID Institut**, em especial às Professoras **Kerstin, Katja** e **Rima** e às amigas **Adriana Srio Rodrigues** e **Tatiana Kunsch Rocha**.

Aos amigos **Katharina Schulte, Ralf Horres** e **Marilu Huertas** pelo apoio durante o trabalho no laboratório do Instituto de Botânica em Frankfurt.

Aos amigos do Instituto de Botânica em Leipzig; **Julio Schneider, Claudia Raedig** e **Frau Schubert**, pela amizade e ajuda durante minha estadia em Leipzig.

Aos amigos da Universidade Técnica de Colônia, **Sandra Alfonso** e **Udo Nehren** pela amizade e gentileza da hospedagem na Alemanha.

Aos amigos de Frankfurt **Stefan** e **Hans Hartman, Marcela, Carsten Kreuch** (Gießen), **Christian, Andreas, Thomas Hagman, Thomas Krusel** (Bad Homburg), pela companhia e alegria durante todo o tempo que passei naquela cidade.

Aos amigos de Leipzig; **Roland Winkler, Stefan** e **Gehard** e aos amigos do “**Spritzen Buben**”.

À **Ji Woo Choi** pela grande amizade e ajuda para o aluguel do apartamento durante a minha estadia em Leipzig.

À técnica do laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, **Claudete Marques**, que tanto apoiou para o bom andamento das atividades laboratoriais.

Ao meu amigo **Prof. Reginaldo de Carvalho**, pela grande ajuda e pela disponibilização das instalações do Laboratório de Genética na Universidade Federal Rural de Pernambuco para a realização de algumas práticas.

Ao meu amigo **Edmilson “Nino” Ferreira**, que através de sua habilidade ajudou na reprodução das pranchas fotográficas.

Ao **Laurence Vichie** pelas correções e sugestões no inglês, incentivo e alegria que me proporcionou no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, **Nilmara, Fabíola, Maria Rita, Carol, Nina, Kyria e Mário** pelo convívio no Laboratório durante os trabalhos desenvolvidos.

Às senhoras **Linda Rosa da Silva e Bárbara Quaresma** do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela imprescindível ajuda prestada durante os processos de formalização e implementação do doutorado-sanduíche.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, em especial aos coordenadores **Iva Carneiro Leão e Marccus V. Alves**, pelo excelente acompanhamento e constantes esclarecimentos, bem como ao Prof. **Marcelo Guerra**, pelas sugestões construtivas ao projeto inicial do qual o presente trabalho derivou.

Ao **Instituto de Botânica, ao Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, ao Museu Botânico Seckenberg da Johann Wolfgang Goethe Universität e ao Palmengarten der Stadt Frankfurt** pela disponibilização de suas coleções, infra-estrutura e pelo apoio logístico durante a estadia na Alemanha.

Ao **CNPq, ao DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) e à UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization)** pelas bolsas e demais recursos concedidos para a realização do presente estudo.

A todos meu
Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	7
Lista de Figuras	8
1. Introdução	9
2. Revisão da literatura:	10
2.1. Caracterização Taxonômica da Família Bromeliaceae	10
2.1.2. Distribuição Geográfica	11
2.1.3. Importância Econômica	13
2.2. Citogenética em Sistemática e Evolução	14
2.3. Estudos Citogenéticos em Bromeliaceae	15
2.3.1. Números Cromossômicos	15
2.3.2. Cromossomos B	26
2.3.3. Tamanho Cromossômico	28
2.3.4. Quantidade de DNA	29
2.3.5. Bandeamento Cromossômico	30
2.4. Marcadores Moleculares	31
2.4.1. Evolução Molecular e Análises Cladísticas	33
3. Referências bibliográficas	37
4. Manuscritos de Artigos Científicos	44
4.1. Evolução cromossômica e padrões de bandeamento em Bromeliaceae	45
4.2. Relações filogenéticas entre membros do subgênero <i>Ortgiesia</i> (gênero <i>Aechmea</i> , Bromeliaceae) com base em marcadores AFLP	71
5. Conclusões	87
6. Anexos	88
6.1 Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae	89
6.2. Instruções para Autores	106
6.2.1. Revista <i>Plant Systematics and Evolution</i>	107
6.2.2. Revista <i>Taxon</i>	111
7. Resumo	113
8. Abstract	114

LISTA DE TABELAS

Página

Revisão da Literatura

1. Números cromossômicos e espécies estudadas na família Bromeliaceae. 17
2. Números cromossômicos em gêneros de Bromeliaceae previamente analisados incluindo sua distribuição e tipo ecológico predominante. 27

Manuscrito 1

1. Lista de espécies analisadas incluindo procedência, coletor, números de exsicata e números cromossômicos. 60
2. Características citogenéticas de Bromeliaceae analisadas com coloração convencional, fluorocromos (CMA/DAPI) e AgNO₃. 62

Manuscrito 2

1. Material vegetal usado nas análises de AFLP, incluindo procedência e número de acesso com os respectivos hábitos e altitude. 82

Apêndice - Manuscrito 3

1. List of analyzed species including provenance, collector, voucher number and chromosome numbers. 92
2. Cytogenetic features of the Bromeliaceae analyzed with conventional, fluorochrome (CMA/DAPI) and AgNO₃ staining. 95

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Revisão da Literatura	
1. Distribuição geográfica das famílias Bromeliaceae e Rapateaceae.	13
2. Modelo proposto para a evolução cromossômico-numérica em Bromeliaceae.	26
Manuscrito 1	
1. Cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos de algumas espécies de Bromelioideae.	64
2. Cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos de algumas espécies de Bromelioideae.	65
3. Cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos de algumas espécies de Pitcairnioideae	66
4. Cromossomos mitóticos de algumas espécies de Tillandsioideae.	67
5. Cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos de algumas espécies de Tillandsioideae.	68
6. Cromossomos metafásicos de Bromeliaceae após coloração com fluorocromos CMA ₃ .	69
7. Cromossomos metafásicos de Bromeliaceae após coloração com fluorocromos CMA ₃ .	70
Manuscrito 2	
1. Amplificação seletiva do DNA genômico de quatro diferentes espécies de <i>Aechmea</i> com cinco diferentes combinações de primers.	84
2. Gel Spreadex [®] EL 800 com produtos da reação de AFLP da combinação de primer Pk32 (HindII+CAC e MSEI+CGA) em 40 espécies de <i>Aechmea</i> .	85
3. Árvore de parcimônia incluindo 40 espécies de <i>Aechmea</i> do subgênero <i>Ortigiesia</i> e uma espécie não identificada de Bromelioideae (Gen. spec. 1), após análise UPGMA.	86
Apêndice - Mansucrito 3	
1. Mitotic chromosomes and interphase nuclei in Bromeliaceae with conventional staining (Bromelioideae).	97
2. Mitotic chromosomes and interphase nuclei in Bromeliaceae with conventional staining (Pitcairnioideae and Tillandsioideae).	98
3. Methaphase chromosomes of bromeliaceae after sequential staining with the fluorochromes DAPI/CMA ₃ .	

1. Introdução

A família Bromeliaceae possui cerca de 56 gêneros e aproximadamente 2.000 a 3000 espécies distribuídas em regiões neotropicais, com exceção de *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed, espécie nativa da região oeste da África (Leme e Marigo, 1993; Kubtzki, 1998). Segundo Cronquist (1988) a família subdivide-se em três subfamílias: Pitcarnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae.

Os diferentes tipos de hábitos, epifítico, terrestre e rupícola contribuíram para a diversificação e adaptação aos diferentes tipos de ambientes, possibilitando a sua ampla distribuição que abrange desde matas neotropicais úmidas até áreas secas como savanas, campos rupestres e regiões semi-áridas (Kubtzki, 1998; Benzing 2000).

A maior parte de seu valor econômico se deve ao exotismo de suas flores, diversamente explorado para fins comerciais através do cultivo de espécies ornamentais, embora sua exploração comercial seja menos significativa que a da espécie frutífera cultivada, o abacaxi, que certamente representa a cultura mais importante e popular dentre as Bromeliaceae (Leme e Marigo, 1993; Kubtzki, 1998).

Análises taxonômicas compreensivas da família Bromeliaceae têm revelado associações entre características morfológicas e os mecanismos da poliploidia e disploidia (por vezes referido como aneuploidia). Os trabalhos cariológicos têm demonstrado diferentes níveis de ploidia, bem como cromossomos de tamanho pequeno (Brown e Gilmartin, 1986; Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000). Segundo Sharma (1984) tais características sugerem uma posição evolutiva avançada, resultante de processos de aneuploidia (disploidia) e hibridização entre os números $x=9$ e $x=8$, provavelmente a partir de entidades taxonômicas da ordem Commelinales.

Poucos trabalhos cariológicos reportam a aplicação de técnicas mais refinadas, como a quantificação de DNA, a geração de marcadores cromossômicos por hibridização *in situ*, ou caracterização do padrão de condensação nuclear e do tipo de núcleo interfásico em Angiospermas. Tais ferramentas são ainda pouco empregadas, sendo a morfologia e o número cromossômico os parâmetros mais utilizados nas análises cariosistemáticas (Guerra, 2000). Também em Bromeliaceae, tais análises têm se restringido na sua maioria a contagens cromossômicas, com poucas informações cariomorfológicas.

Adicionalmente, as técnicas moleculares, associadas a análises cladísticas e fenéticas com inferências em nível intergenérico e subfamiliar, têm revelado discrepâncias em relação ao modelo de posicionamento clássico das subfamílias pelos diferentes tipos de seqüências utilizadas (Benzing, 2000).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar espécies selecionadas da família Bromeliaceae, sob o ponto de vista citogenético (coloração convencional e bandeamento

cromossômico) e molecular (marcadores AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos Amplificados), colaborando para um melhor entendimento das estratégias evolutivas e das relações taxonômicas entre os membros selecionados, comparando os dados obtidos aos existentes na literatura.

2. Revisão da Literatura

2.1.1. Caracterização Taxonômica da família Bromeliaceae

As bromélias são plantas herbáceas – raramente arbustivas – e perenifólias (Leme e Marigo, 1993), caracterizadas por apresentarem folhas em roseta, formando um recipiente central, que retém água e nutrientes. As flores possuem três pétalas, um ovário trilocular e inflorescência situada na posição central da roseta (Kubitzki, 1998; Benzing, 2000).

A família Bromeliaceae tem sido tradicionalmente dividida em três subfamílias: Bromelioideae (31 gêneros e 724 espécies), Pitcairnioideae (16 gêneros e 946 espécies), sendo a Tillandsioideae (nove gêneros e aproximadamente 1100 espécies) a maior subfamília, enquanto a subfamília Bromelioideae destaca-se por possuir o maior número de gêneros (Cronquist 1988; Smith e Till, 1998; Kubitzki, 1998).

A classificação das subfamílias de Bromeliaceae tem se baseado tradicionalmente em características morfológicas clássicas, com destaque para o tipo de semente e a posição do ovário em relação ao perianto. Em Bromelioideae, a maioria das espécies apresenta ovário ínfero; em Tillandsioideae, ovário súpero e nas Pitcairnioideae ocorrem ambas as formas (Barfuss, 2005).

Segundo Cronquist (1988) a família classifica-se como a única da ordem Bromeliales na subclasse Zingiberideae, juntamente com a ordem Zingiberales (composta por oito famílias), destacando-se uma possível relação entre a citada classe e as Commelinideae e Liliidae, respectivamente.

Em sua classificação das angiospermas Takhtajan (1997) relacionou as famílias Bromeliaceae e Velloziaceae em duas ordens distintas (Bromeliales e Velloziales, respectivamente) agrupando-as, porém, na superordem Bromelianaes.

A subfamília Bromelioideae, com o maior número de gêneros, carece de uma análise mais aprofundada, devido à grande variabilidade floral e ao elevado número de espécies e gêneros existente (Benzing, 2000). O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav com 220 espécies, pertence a esta subfamília, sendo encontrado na região Amazônica e na Mata Atlântica. Possui ambas as formas, terrestres e epifíticas, sendo sua delimitação infragenérica ainda mal resolvida. Proença e Sajo (2004) estudaram oito espécies do citado gênero com base na estrutura anatômica das folhas, incluindo representantes dos subgêneros *Ortgiesia*, *Macrochordion*, *Pothuava* e *Platyaechmea*.

Como resultado foi desenvolvida uma chave de identificação para os representantes estudados, revelando a aplicabilidade deste caráter na distinção interespecífica.

Os gêneros *Navia* Schult.f., *Brocchinia* Schult.f., *Glomeropitcairnia* Mez e *Catopsis* Griseb. apresentam controvérsias em relação às afinidades e ao posicionamento em nível de subfamília. Sugere-se, por exemplo, que o gênero *Navia* deveria ser incluído em uma subfamília isolada das Pitcairnioideae, especialmente considerando-se suas características em comum com as Rapateaceae. Diferentes combinações de características posicionam o gênero *Brocchinia* na subfamília Pitcairnioideae, embora se observe a presença de diversas características das Tillandsioideae. Fato semelhante ocorre com os gêneros *Glomeropitcairnia* e *Catopsis*, reconhecidos como Tillandsioideae mas com algumas características típicas das Pitcairnioideae (Gilmartin e Brown, 1986; 1987; Benzing, 2000).

No caso do gênero *Glomeropitcairnia*, com apenas duas espécies, destacam-se o ovário semi-inferior e a estrutura do pólen, características que lembram as espécies do gênero *Guzmania* Ruiz & Pav (Gilmartin e Brown, 1987; Terry *et al.*, 1997a; Benzing, 2000) da subfamília Pitcairnioideae. Estas características sugerem que *Glomeropitcairnia* (tal como *Catopsis*) tenha divergido precocemente na evolução da subfamília Tillandsioideae (Barfuss *et al.*, 2005). Por divergirem quanto às características morfológicas típicas de suas respectivas subfamílias, estudos adicionais tem sido demandados para ambos os gêneros, bem como análises cladísticas abrangentes (Gilmartin e Brown, 1987).

Visando elucidar os problemas taxonômicos infragenéricos dos gêneros *Nidularium* Lem. e *Neoregelia* L.B. Sm., Moreira *et al.* (2005) realizaram um estudo de caracterização da morfologia polínica em seis espécies de *Nidularium* pertencentes aos subgêneros *Nidularium* e *Canistropis*, bem como de uma espécie do gênero *Neoregelia* por vezes apontada como relacionada a este último subgênero. Os padrões polínicos encontrados sugerem uma maior proximidade entre os gêneros *Neoregelia* e *Nidularium* e levantam dúvidas quanto à delimitação taxonômica de *Canistropis* como subgênero.

2.1.2. Distribuição Geográfica

As bromélias são nativas das regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo desde a América do Norte (estados da Virgínia e Texas), até a América do Sul nas regiões centrais da Argentina e do Chile. Assim como a família Bromeliaceae, a Rapateaceae, possui um nível de distribuição similar (Fig. 1), tendo a América do Sul como centro de diversidade de suas espécies, assim como, ambas apresentam espécies endêmicas encontradas na região oeste da África Leme e Marigo, 1993; Kubitzki, 1998; Givnish *et al.*, 2004).

Os centros de distribuição e dispersão da família abrangem desde os Andes, com o gênero *Tillandsia* L. – local onde se concentram também as espécies mais primitivas pertencentes à

subfamília Pitcairnioideae – até o Planalto das Guianas, com representantes do gênero *Navia*. Considera-se que no Brasil ocorram 73% dos gêneros de Bromeliaceae e que, por sua vez, o leste brasileiro apresentaria a maior concentração de espécies da subfamília Bromelioideae com aproximadamente 11 gêneros exclusivos (Leme e Marigo, 1993), tais como *Aechmea*, *Billbergia* Thunberg, *Canistrum* E. Morren, *Crypthanthus* Otto & A.Dietr., *Nidularium*, *Orthophytum* Beer, *Quesnelia* Gaudich. e *Norelegia*, o maior representante com mais de 90 espécies (Benzing, 2000).

Segundo um levantamento taxonômico das Bromeliaceae do estado de São Paulo, realizado por Wanderley *et al.* (1998), a região compreende 17 gêneros e 120 espécies: *Acanthostachys* Klotzsch (1); *Aechmea* (11); *Ananas* Miller (3); *Billbergia* (6); *Bromelia* L. (2); *Canistrum* (6); *Dyckia* Schult. f. (4); *Hohenbergia* Schult. f. (2); *Nidularium* (19); *Norelegia* (4); *Pitcairnia* L'Héritier (1); *Pseudoananas* Hassl. ex Harms (1); *Quesnelia* Gaudich. (5); *Racinea* Spencer et L.B. Smith. (2); *Tillandsia* (15); *Vriesea* Lindl. (34) e *Wittrockia* Lindl. (4).

Souza e Wanderley (2000) realizaram um levantamento das *Aechmea* do estado de Pernambuco, observando a ocorrência de 10 espécies com quatro padrões diferentes de distribuição, comparativamente aos dados existentes para o restante do país: (a) ampla distribuição [*A. lingulata* (L.) Baker e *A. mertensii* (G. Mey.) Schult. f.]; (b) do nordeste ao sudeste [*A. fulgens* Brongn e *A. equilega* Salisb.]; (c) exclusivamente no nordeste [*A. eurycorymbus* Harms, *A. mulfordii* L. B. Smith, *A. stelligera* L.B. Smith e *A. tomentosa* Mez] e (d) endêmicas do estado de Pernambuco [*A. muricata* (Arruda) L.B. Smith e *A. werdemannii* Harms].

Com base em seus padrões de distribuição geográfica (Figura 1) agregados a caracteres moleculares (seqüenciamento da porção *ndhF* de cloroplasto) e morfológicos, Givnish *et al.* (2004) efetuaram uma análise cladística, concluindo que as Bromeliaceae e as Rapateaceae seriam grupos monofiléticos com estratégias de radiação semelhantes no continente americano, bem como no que tange às suas espécies africanas (*Pitcairnia feliciana* e *Maschalocephalus dinklagei* Gilg & K. Schum, respectivamente). Com base no grau de conservação das seqüências analisadas, os autores sugeriram que a ocorrência de ambas espécies disjuntas no oeste da África seja resultante de dispersão de longa distância e não um resquício do processo de deriva continental.

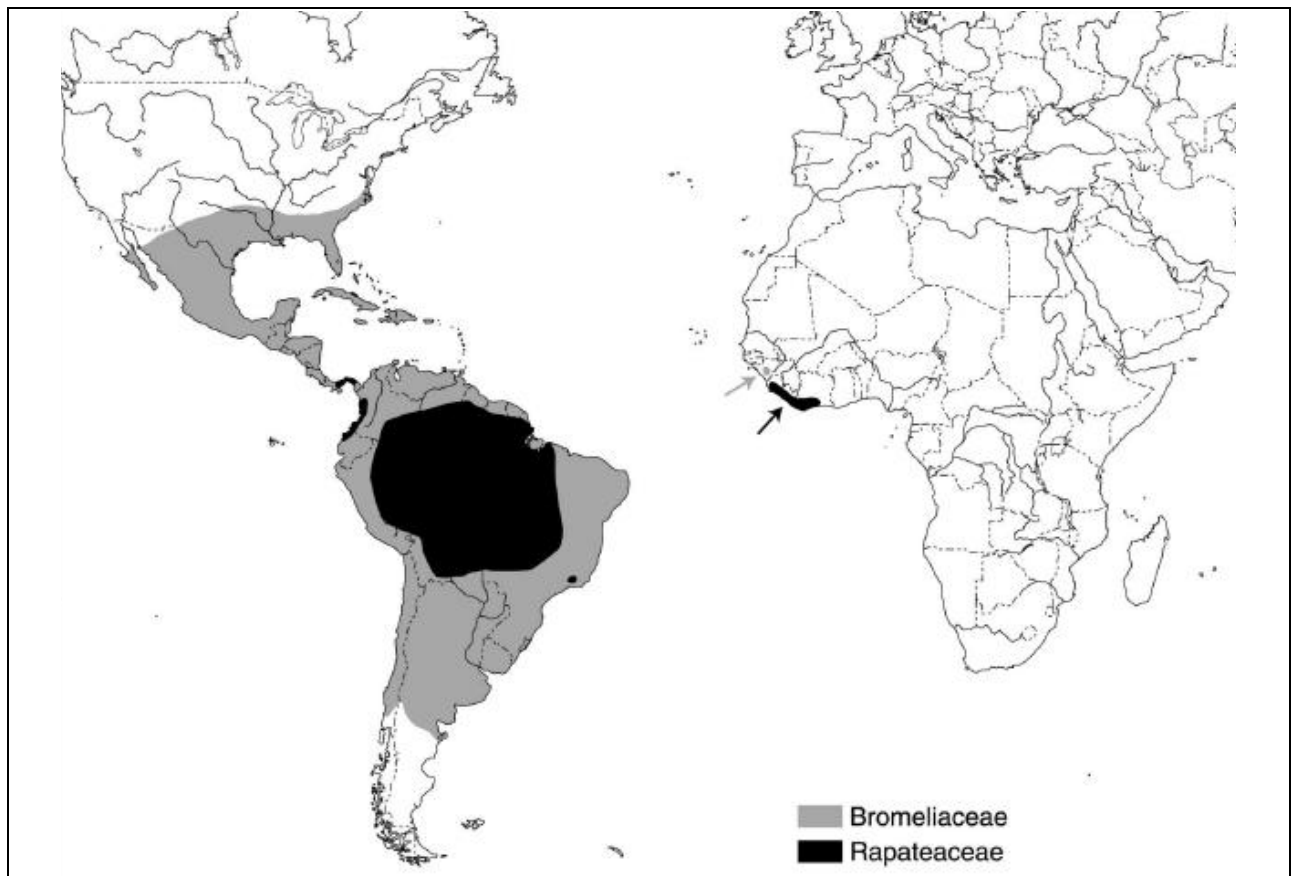


Figura 1. Distribuição geográfica das famílias Bromeliaceae e Rapateaceae (Fonte: Givnish *et al.*, 2004).

2.1.3. Importância Econômica

Apreciadas pelo exotismo de suas flores, as bromélias têm sido bastante cultivadas para fins ornamentais, sendo o abacaxi (*Ananas comosus*), o representante mais popular e importante das regiões tropicais. Além do desenvolvimento da cultura para o consumo do fruto, a enzima bromelina, extraída da citada fruta tem sido utilizada para fins farmacêuticos e industriais (Kubtzki, 1998).

No Brasil, outro representante, o caroá (*Neoglaziovia variegata* (Arruda Camara) Mez), tem mostrado uma certa importância econômica (Kubtzki, 1998). Desta espécie pode-se extrair uma fibra semelhante ao sisal, servindo para a confecção de vários utensílios, como também para a alimentação humana e do gado.

Dentre as bromélias cultivadas para fins ornamentais, destacam-se espécies dos gêneros *Guzmania*, *Vriesea* Lindl. e *Aechmea*, bem como seus híbridos. Cerca de 40 espécies e inúmeras variedades hortícolas desses materiais foram introduzidas nos EUA (Estados Unidos da América do Norte), sendo tradicionalmente cultivadas em regiões propícias como Califórnia, Flórida e Havaí para vendas em vasos ou na forma de flores de corte para confecção de arranjos. Apenas para o estado da Flórida estima-se que o comércio resultante do cultivo de bromeliáceas atinja a cifra de 20 milhões de dólares por ano (Cathcart, 1995).

Vale destacar que por sua popularidade e uso pelos indígenas, muitas designações tribais de bromeliáceas originaram nomes de cidades brasileiras como Caraguatatuba (SP), Gravatá (PE) e Gravataí (RS). Porém, no nordeste brasileiro, é muito comum designá-las de “macambiras” (Leme e Marigo, 1993).

2.2. Citogenética em Sistemática e Evolução

Em plantas superiores, os estudos cariológicos tem demonstrado que os processos evolutivos de mudanças estruturais cromossômicas como trocas de segmentos, inversões para-e-pericêntricas constituem os principais elementos na geração de isolamento reprodutivo e especiação. Adicionalmente, os diferentes efeitos resultantes do mecanismo da poliploidia têm sido revelados em vários grupos taxonômicos, podendo ser analisados mais detalhadamente face aos avanços das metodologias no estudo da estrutura cromossômica (Sharma e Sharma, 1984).

Os principais efeitos relacionados à poliploidia referem-se ao aumento do volume nuclear e celular, à duração do ciclo celular e à quantidade de genes. Estas características diretamente associadas a fatores específicos de transcrição celular proporcionam uma diferenciação fenotípica como conseqüência da reestruturação genômica (Greilhuber, 1995). O desenvolvimento deste processo evolutivo ocorre de forma rápida e extensiva, seja por diploidização ou através de cruzamentos entre híbridos interespecíficos, com subsequente silenciamento de parte dos genes duplicados (Soltis e Soltis, 1999).

Segundo Guerra (2000), a variação cromossômica numérica pode surgir de diferentes mecanismos, mas as suas conseqüências evolutivas estão confinadas à origem de novos citótipos com números múltiplos do número haplóide original (poliploidia) ou ainda pelo acréscimo ou decréscimo de um ou poucos cromossomos ao número diplóide original (disploidia).

Em Orchidaceae, diferentes números cromossômicos foram encontrados no gênero *Habenaria* Willd. ($2n=42, 50, 80, 84$), indicando a poliploidia e a disploidia como os principais eventos na evolução cromossômica da família (Félix e Guerra, 1998).

Similarmente, a citoevolução do gênero *Xyris* L. (Xyridaceae) parece estar baseada em uma combinação de poliploidia e disploidia a partir do número básico $x=8$ (Benko-Iseppon e Wanderley, 2002). No caso deste gênero, destaca-se a provável importância da anfiploidia como evento gerador de variação cromossômico-numérica, uma vez que foram reportados híbridos alopólíides ($2n\cong 108$) ocorrendo simpatricamente com os parentais diplóides ($2n=54$). Pode-se supor que este pode ser também o caso de algumas Bromeliaceae, uma vez que estudos recentes em polinização de diferentes populações de *Pitcairnia* demonstraram que a recombinação

genética ocorre através da hibridização natural, favorecendo o aparecimento de novos números cromossômicos em espécies híbridas (Wendt *et al.*, 2001).

2.3. Estudos Citogenéticos em Bromeliaceae

2.3.1. Números Cromossômicos

A família Bromeliaceae apresenta apenas 10% de suas espécies com análises citogenéticas, havendo uma carência de dados cariológicos que contribuam no esclarecimento das controvérsias existentes quanto às relações taxonômicas e filogenéticas, entre gêneros e seu posicionamento nas demais subfamílias. A grande maioria dos estudos citogenéticos de Bromeliaceae está restrita a contagens cromossômicas, havendo em alguns gêneros discrepâncias entre os números mitóticos e meióticos (Brown e Gilmartin, 1986). Em recente trabalho envolvendo análises meióticas em espécies de *Vriesea* e *Aechmea*, Palma-Silva *et al.* (2004) identificaram a presença de irregularidades meióticas, tal como pareamento irregular e presença de univalentes. Entretanto, um estudo da viabilidade do pólen, feito pelos mesmos autores, indicou uma alta percentagem de pólen viável, demonstrando que as irregularidades observadas não influenciaram significativamente na fertilidade das espécies estudadas.

Vários autores reportaram dificuldades no estabelecimento de números cromossômicos para membros da citada família, na maioria dos casos justificada pelo tamanho diminuto dos cromossomos, altos números observados e dificuldade na obtenção de um bom espalhamento (Marchant, 1967; MacWilliams, 1974; Brown e Gilmartin, 1989). Muitos dos erros existentes nas contagens cromossômicas de plantas superiores, devem-se à má qualidade das preparações, ao pequeno número de indivíduos analisados ou à carência de material para reconfirmação dos dados pelos autores responsáveis, sem contar que muitos estudos datam de mais de 30 ou 40 anos, quando as técnicas de citogenéticas ainda não estavam completamente aprimoradas (Guerra, 2000).

Uma revisão dos números cromossômicos existentes para a família foi efetuada, com base em índices de números cromossômicos acrescidos de literatura recente. A lista das espécies previamente estudadas encontra-se apresentada na Tabela 1. Conforme pode ser observado no citado levantamento, há números cromossômicos para 224 espécies da família (cerca de 10% de suas espécies). A subfamília Bromelioideae apresenta um maior número de gêneros estudados, com dados para 17 gêneros e 84 espécies. O mesmo número de espécies de Tillandsioideae (91) apresenta contagens cromossômicas, estando estes, porém, restritos a apenas quatro gêneros. Para

as Pitcairnioideae, apenas 48 espécies de nove gêneros tiveram seus números cromossômicos estabelecidos (Tabela 1).

O número cromossômico mais freqüente na família foi $2n=50$ ($n=25$), predominante na subfamília Tillandsioideae. O citado número também predomina nas subfamílias Bromelioideae e Pitcairnioideae, embora outros números sejam reportados por alguns autores (Tabela 1). Alguns gêneros da subfamília Bromelioideae apresentam números que diferem destes, como é o caso, por exemplo, do gênero *Cryptanthus* Otto & A.Dietr. onde o número $2n=34$ predomina, assim como nos gêneros *Aregelia* Kuntze(=*Nidularium*) e *Billbergia*, com predominância de $2n=54$ (Lindschau, 1933; Weiss, 1965; Marchant, 1967).

Tabela 1. Números cromossômicos e espécies estudadas na família Bromeliaceae

Gênero	n	2n	Referências
SUBFAMÍLIA BROMELIOIDEAE			
<i>Acanthostachys</i> Klotzsch.			
<i>strobilacea</i> (Schult. f.) Klotzsch.		50	Lindschau, 1933
<i>Aechmea</i> Ruiz & Pav.			
<i>aquilega</i> (Salisbury) Grisebach		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>blanchetiana</i> (Baker) L.B. Smith		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>bracteata</i> (Swart) Mez		50	Lindschau, 1933
<i>confiera</i> L.B. Smith		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>calyculata</i> (Morren) Baker		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>candida</i> Morren		50	Weiss, 1965
<i>capitata</i> (Schult. F.) Baker	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>coelestis</i> (Koch) Morren		50	Lindschau, 1933
<i>comata</i> Baker		50	Lindschau, 1933
<i>conspicuiarmata</i> Baker		50	Taylor, 1925
<i>filicaulis</i> (Griseb.) Mez	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>fulgens</i> var. <i>discolor</i> Brogn.		50	Lindschau, 1933
<i>gamosepala</i> Wittmack		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>histris</i> Morren		54	Lindschau, 1933
<i>purpureo-rosea</i> (Hook) Wawra	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>tillandsioides</i> Baker	21		Marchant, 1967
<i>Ananas</i> Mill.			
<i>ananassoides</i> (Baker) L.B. Smith		48,50	Lin <i>et al.</i> , 1987
<i>ananassoides</i> (Baker) L.B. Smith var.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>ananassoides</i>			
<i>bracteatus</i> (Lindl.) Schult. F.		50	Lin <i>et al.</i> , 1987
<i>comosus</i> (L.) Merril		50,ca75	Lin <i>et al.</i> , 1987
<i>comosus</i> (L.) Merril		50, 75, 100	Collins e Kerns, 1935; 1936; 1938
<i>comosus</i> (L.) Merril		50	Chen <i>et al.</i> , 1985
<i>comosus</i> (L.) Merril cv. "Knew"	25	50	Bhowmik, 1977
<i>comosus</i> (L.) Merril cv. "Queen"	25	50	Bhowmik, 1977
<i>erectifolius</i> L.B. Smith		50	Lin <i>et al.</i> , 1987
<i>lucidus</i> Miller		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>macrodontes</i> E. Morren = <i>Pseudananas</i>		100	Lindschau, 1933
<i>macrodontes</i> (Harms) Morr			
<i>microstachys</i> Lindl.		50	Collins, 1933
<i>sativus</i> Lindl.		50	Collins e Kerns, 1931
<i>Aregelia</i> Kuntze (= <i>Nidularium</i> Lem)			
<i>binnoti</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>carolineae</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>Coriaceae</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>Mamorata</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>microps</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>princeps</i> (Baker) Mez		54	Weiss, 1965
<i>rubrospinosa</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>sarmentosa</i> (Regel) Mez		54	Weiss, 1965
<i>spectabilia</i> (Moore) Mez		54	Weiss, 1965
<i>Areococcus</i> Brongn.			
<i>flagelifolius</i> Harms		50	Brown <i>et al.</i> , 1997
<i>pectinatus</i> L.B. Smith		50	Brown <i>et al.</i> , 1997
<i>Bilbergia</i> Thunb.			
<i>bonpladiana</i> Gaudich		54	Lindschau, 1933

Tabela 1, continuação.

Gênero	n	2n	Referências
SUBFAMÍLIA BROMELIOIDEAE			
<i>Bilbergia</i> (cont.)			
<i>chlorosticta</i> Saunders Hortus		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>iridifolia</i> Lindl.		54	Weiss, 1965
<i>liboniana</i> D'Jonghe		54	Matsuura e Sutô, 1935
<i>lingulata</i> Sims		54	Lindschau, 1933
<i>minuta</i> Mez		54	Lindschau, 1933
<i>morelii</i> Brongniart		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>perrigiana</i> Wittmack		54	Lindschau, 1933
<i>pyramidalis</i> Lindl.		54	Lindschau, 1933
<i>saundersii</i> Hort. ex. C. Koch		54	Weiss, 1965
<i>speciosa</i> Thumb.		54	Lindschau, 1933
<i>Vittata</i> Brongn.		72	Lindschau, 1933
sp.		108	Matsuura e Sutô, 1935
<i>Bromelia</i> L			
<i>alta</i> L.B. Smith		48	Gadella e Kliphuis, 1964
<i>fastuosa</i> Lindl.		96	Lindschau, 1933
<i>goeldiana</i> L.B. Smith.		94	Lin <i>et al.</i> , 1987
<i>laciniosa</i> Mart. ex Schultes		ca.150	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>pinguin</i> L.		96	Collins, e Kerns, 1931
<i>plumieri</i> (E. Morren) L.B. Smith		50+1-2B	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>sagenaria</i> Arruda = <i>Pseudananas sagenarius</i> (Arruda Câmara) Camargo		98,100	Lin <i>et al.</i> , 1987
<i>Canistrum</i> E. Morren			
<i>amazonicum</i> (Linden et André)		50	Weiss, 1965
<i>aurantiacun</i> Morr.		50	Weiss, 1965
<i>roseum</i> Morr.		50	Lindschau, 1933
<i>Caraguata</i> Lindl.=Guzmania Ruiz & Pav.			
<i>zahnii</i> Hook. F.= <i>Guzmania zahnii</i> Mez		56	Lindschau, 1933
<i>Cryptanthus</i> Otto & A. Dietr.			
<i>acaulis</i> Beer.	17	34	Matsuura e Sutô, 1935
<i>acaulis</i> Beer.		36	Lindschau, 1933
<i>acaulis</i> Beer.	ca.17		Marchant, 1967
<i>acaulis</i> Beer.		34	Morrillo, 1996
<i>bahianus</i> L.B. Smith	17		Marchant, 1967
<i>bahianus</i> L.B. Smith		34+1-4B	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>beuckeri</i> Morr.		ca.34	Marchant, 1967
<i>beuckeri</i> Morr.		54	Lindschau, 1933
<i>bivittatus</i> Regel		36,54	Lindschau, 1933
<i>bivittatus</i> Regel		36	Sharma e Gosh, 1973
<i>bromelioides</i> Otto et Dietr.		34	Sharma e Gosh, 1973
<i>praetextus</i> Ed. Morr. ex Baker		34	Sharma e Gosh, 1973
<i>schwackeanus</i> Mez		34	Morrillo, 1996
<i>zonatus</i> Beer.		36	Lindschau, 1933
<i>zonatus</i> var. <i>zonatus</i>	17		Marchant, 1967
<i>zonatus</i> var. <i>zonatus</i>		34	MacWillians, 1974
<i>Hohenbergia</i> Schult. f.			
<i>catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>litorallis</i> L.B. Smith		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>stellata</i> Schultes		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
aff. <i>ulticulosa</i> Ule		50+2B	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>Lymania</i> Read			
<i>globosa</i> Leme			
<i>smithii</i> R.W. Read			
<i>Neoglaziovia</i> Mez.			
<i>variegata</i> (Arruda Câmara)		100	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000

Tabela 1, continuação.

Gênero	n	2n	Referências
SUBFAMÍLIA BROMELIOIDEAE			
Nidularium Lem.			
<i>acanthocrater</i> Morr.		54	Lindschau, 1933
<i>angustifolium</i> Ule		54	Weiss, 1965
<i>lineatum</i> Mez		50	Lindschau, 1933
<i>princeps</i> Morr.		54	Lindschau, 1933
<i>purpureum</i> Beer		54	Lindschau, 1933
Orthophytum Beer			
<i>burle-maxii</i> L.B. Smith et Rangel		100	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>maracaense</i> L.B. Smith		150	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>saxicicola</i> (Ule) L.B. Smith		50	Morrillo, 1996
Pseudananas Hassl. ex Harms			
<i>macrodontes</i> E. Morren = <i>Ananas macrodontes</i> (Harms) Morr	-	100	Lindschau, 1933
<i>sagenarius</i> (Arrud. Câmara) Camargo = <i>Bromelia sagenaria</i> Arruda	-	98,100	Lin <i>et al.</i> , 1987
Portea K. Koch.			
<i>kermesina</i> Brogn.		50	Weiss, 1965
Quesnelia Gaudich.			
<i>liboniana</i> (De Jonghe) Mez		50	Brown <i>et al.</i> , 1997
SUBFAMÍLIA PITCAIRNIOIDEAE			
Brocchinia Schult. f.			
<i>cinerea</i> (Delile) Vis.		18	Oberprieler & Vogt. 1993
Deuterocohnia Mez.			
<i>haumanii</i> Castell.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>longipetala</i> (Baker) Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>longipetala</i> Mez	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
Dyckia Schult. f.			
<i>altissima</i> Lindl.		50	Lindschau, 1933
<i>brevifolia</i> Baker	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>microcalyx</i> var. <i>microcalyx</i>	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>ragonesii</i> Castellanos	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>sulphurea</i> C. Koch		50	Lindschau, 1933
<i>tomentella</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>velascana</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
Encholirium Mart. Ex. Schult. f.			
<i>spectabile</i> Mart. ex Schult. f.		50	Cotias de Oliveira <i>et al.</i> , 2000
Fosterella L.B.Sm.			
<i>elata</i> Luther	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>penduliflora</i> (C.H. Wright) L.B. Smith	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>rusbyi</i> (Mez) L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
Hechtia Klotsch			
<i>ghiesbreghtii</i> Lem.		50	Lindschau, 1933
Lindmania Mez			
<i>penduliflora</i> Mez		100	Delay, 1947
<i>penduliflora</i> Mez		>100	Lindschau, 1933; Doutreligne, 1939
<i>macrocordion</i> De Vriese		50	Lindschau, 1933

Tabela 1, continuação.

Gênero	n	2n	Referências
SUBFAMÍLIA PITCAIRNIOIDEAE			
<i>Lindmania</i> (cont.)			
<i>tinctorium</i> De Vriese		50	Lindschau, 1933
<i>Pitcairnia</i> L'Her			
<i>andreaana</i> Linden	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>andreaana</i> Linden		50	Lindschau, 1933
<i>angustifolia</i> Sol.	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>bakeri</i> (Andre) Andre ex Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>caerulea</i> Benth. et Hook	25		Sachdeva, 1977
<i>dendroidea</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>flammea</i> Lindley	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>flammea</i> Lindley var. <i>corcovadensis</i> (Wawra) L.B. Smith.	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>heterophylla</i> (Lindley) Beer	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>integrifolia</i> Gaud.		50	Weiss, 1965
<i>maidifolia</i> (C. Morren) Decaisne	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>moritziana</i> K. Koch et Bouché	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>muscosa</i> Mast.		50	Matsuura e Sutô, 1935
<i>paniculata</i> (Ruiz et Pavon) Ruiz et Pavon	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>poortmani</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>pruinosa</i> H.B.K.	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>pulverulenta</i> Ruiz et Pav.		50	Lindschau, 1933; Doutreligne, 1939; Delay, 1947.
<i>pungens</i> Humb.	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>punicea</i> Lindl.		50	Lindschau, 1933
<i>roezlii</i> Morr.		50	Lindschau, 1933
<i>sceptrigera</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>scheideana</i> Baker		50	Varadajan e Brown, 1985
<i>undulata</i> Scheidw		50	Lindschau, 1933
<i>xanthocalyx</i> Mart.		50	Taylor 1925, Lindschau, 1933
<i>Puya</i> Molina			
<i>cardaenasii</i> L.B. Smith		50	Diers, 1961
<i>chilensis</i> Molina		48	Tschischow, 1956
<i>eryngioides</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>floccosa</i> (Linden) E. Morren	25		Varadajan e Brown, 1985
<i>lilloi</i> Castell.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>raymondii</i> Harms		50	Farvarger e Huynh, 1965
<i>spathacea</i> Mez		50	Lindschau, 1933
<i>spathacea</i> (Griseb.) Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
SUBFAMÍLIA TILLANDSIOIDEAE			
<i>Glomeropitcairnia</i> Mez.			
<i>penduliflora</i> Griseb.		50	Brown e Gilmartin, 1989
<i>Guzmania</i> Ruiz & Pav.			
<i>mitis</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>multiflora</i> (Andre) Andre ex Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>musaica</i> (Lindl. et Andre) Mez		48	Gauthé, 1965
<i>tricolor</i> Ruiz et Pav.		48	Gauthé, 1965
<i>zahnii</i> Mez in DC = <i>Caraguata zahnii</i> Hook. F.		56	Lindschau, 1933
<i>Tillandsia</i> L.			
<i>adpressiflora</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>anceps</i> Lodd		56	Gauthé, 1965
<i>baileyi</i> Rose ex Small	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>bourgaei</i> Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>capillaries</i> f. <i>hieronymii</i> (Mez) L.B. Smith	50		Brown e Gilmartin, 1989

Tabela 1, continuação.

Gênero	n	2n	Referências
SUBFAMÍLIA TILLANDSIOIDEAE			
Tillandsia (cont.)			
<i>caput-medusae</i> C.J. Morren	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>complanata</i> Benth.	20		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>complanata</i> Benth. ssp. <i>complanata</i>	22		Brown e Gilmartin, 1989
<i>compressa</i> Bertero		56	Gauthé, 1965
<i>cyanea</i> Linden		50	Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>depeana</i> Steudel	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>dianthoidea</i> Rossi		64	Gauthé, 1965
<i>diffusa</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>dodsonii</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>dudleyi</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>duratii</i> Visiani var. <i>duratii</i>	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>fascicularia</i> Swartz		56	Gauthé, 1965
<i>fascicularia</i> var. <i>fascicularia</i>	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>fendleri</i> Griseb.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>filifolia</i> Schldl. et Cham	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>fuchsii</i> f. <i>gracilis</i> W. Till	25		Kiehn, 1990
<i>humilis</i> C. Presl.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>imperialis</i> Morr. et Andre		64	Gauthé, 1965
<i>imperilais</i> C.J. Morren ex Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>incarnata</i> Kunth	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>juncea</i> (Ruiz et Pavon) Poiret	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>juncea</i> Lec.		96	Lindschau, 1933
<i>juncifolia</i> Regel		96	Gauthé, 1965
<i>kirchhoffiana</i> Wittm.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>latifolia</i> Meyen var. <i>latifolia</i>	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>latifolia</i> var. <i>divaricata</i> (Beth.) Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>leiboldiana</i> Schdl. var. <i>leiboldiana</i>	19		Brown e Gilmartin, 1989
<i>lindeliana</i> Regel		64	Lindschau, 1933
<i>lorentziana</i> Griseb.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>mexicana</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>monadelpha</i> (C.J. Morren) Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>multiflora</i> var. <i>tomensis</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>peraffinis</i> Mez		64	Gauthé, 1965
<i>plumosa</i> Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>polystachia</i> (L.) L.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>punctulata</i> cham. et Schlechtend		64	Gauthé, 1965
<i>purpurea</i> Ruiz et Pavon	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>pyramidata</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>recurvata</i> (L.) L.	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>reichenbachii</i> Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>riocreuxii</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>rodrigueziana</i> Mez	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>ropalocarpa</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>rubella</i> Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>scaligera</i> Mez et Sodiro	c.25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>scaligera</i> Mez et Sodiro	25+2-10 fragmento		Brown e Gilmartin, 1989
	s		
<i>sigmoidea</i> L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>stenoura</i> Harms var. <i>stenoura</i>	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>streptophylla</i> Scheidw.		64	Lindschau, 1933; Gauthé, 1965
<i>subulata</i> Andre	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>tenuifolia</i> L.		56	Gauthé, 1965
<i>tovarensis</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>tricholeps</i> Baker var. <i>tricholeps</i>	50		Brown e Gilmartin, 1989
<i>tricolor</i> Cham. et Schlechtend		64	Gauthé, 1965
<i>umbellata</i> Andre	18		Brown e Gilmartin, 1983; Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>unsenoides</i> L.		32	Billings, 1904
<i>utriculata</i> L.	25		Brown e Gilmartin, 1989

Tabela 1, continuação.

Gênero	n	2n	Referências
SUBFAMÍLIA TILLANDSIOIDEAE			
<i>Tillandsia</i> (cont.)			
<i>variegata</i> Schlechtend		96	Weiss, 1965
<i>venusta</i> Mez et Werckle	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>vernica</i> Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>villosea</i> Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>viridiflora</i> (Beer) Baker	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>Vriesea</i> Lindl.			
<i>carinata</i> Wawra		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>erythroactylon</i> (E. Morren) Morren ex. Mez		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>elata</i> (Baker) L.B. Smith	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>ensiformis</i> (Velloso) Beer	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>flamea</i> L.B. Smith		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>friburgensis</i> Mez		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>guttata</i> Linden et Andre		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>haematina</i> L.B. Smith	25		Brown <i>et al.</i> , 1984
<i>harmisiana</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>hieroglyphica</i> (Carr) Morr.		56	Gauthé, 1965
<i>incurvata</i> Gaudchaud		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>neoglutinosa</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>philoppo-coburgii</i> Wawra		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>Playtynema</i> Gaudchaud		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>procera</i> (Martius ex. Schultes F.) Wittmack		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>psittacina</i> (Hook.) Lindley var. <i>psittachia</i>	25		Brown e Gilmartin, 1989; Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>reitzii</i> Leme et A. Costa		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>rodigasiana</i> E. Morren		50	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2004
<i>schwabeana</i> Mez	25		Doutreligne, 1939
<i>splendens</i> (Brogn.) Lamaire		48	Weiss, 1965
<i>werckleana</i> Mez	25		Brown e Gilmartin, 1989
<i>x holscheriana</i> (híbrido, sem autor)		56	Gauthé, 1965
<i>zamorensis</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	25		Brown e Gilmartin, 1989

Compilado a partir das seguintes fontes: Fedorov, 1969; Goldblatt, 1981; 1984; 1985; 1988; Goldblatt e Johnson, 1990; 1991; 1994; 1996; Cotias de Oliveira *et al.*, 2000 e Palma-Silva *et al.*, 2004.

O número cromossômico $2n=18$, reportado apenas para o gênero *Brochinnia* (Oberprieler e Vogt, 1993) constitui-se no mais baixo número reportado para a família. Por outro lado, os números cromossômicos mais altos foram reportados para *Bromelia laciniosa* Mart. ex Schultes ($2n=ca.150$) e para *Orthophytum maracaense* L.B. Smith, representando o nível hexaplóide (Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000).

O número $2n=100$, considerado como representante do nível tetraplóide, foi reportado em algumas espécies, como no abacaxi (*Ananas comosus*; Lindschau, 1933; Collins e Kerns, 1935; 1936; 1938), e nas espécies *Lindmania penduliflora* Mez (Delay, 1947), *Bromelia sagenaria* Arruda (Lin *et al.*, 1987), *Neoglasiovia variegata* e *Orthophytum burle-marxii* L. B. Smith et Rangel (Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000).

O primeiro estudo abrangente envolvendo números cromossômicos foi realizado por Lindschau (1933), o qual reportou números cromossômicos para 47 táxons de Bromeliaceae. Porém, vários dos números reportados pelo autor não condizem com contagem posteriores, como é o caso, por exemplo, da espécie *Chryptanthus acaulis* Beer, para a qual o autor reportou $2n=36$, número diferente do observado por Matsuura e Sutô 1935, $n=17$ e $2n=34$ e por Marchant 1967

$2n=34$. O autor usou o antigo método de análise das células somáticas a partir de cortes microtômicos, o que justifica a provável existência de contagens errôneas em suas análises, conforme enfatizado por Marchant (1967) e MacWilliams (1974). Em seu estudo, Lindschau (1933) sugere que as duas subfamílias Pitcairnioideae e Tillandsioideae seriam relativamente homogêneas sob o ponto de vista citogenético, com as Bromelioideae apresentando características citológicas variáveis e ocupando uma posição intermediária entre as duas subfamílias anteriores. Este ponto de vista foi apoiado por Matsuura e Sutô (1935) que, apesar de apresentarem números cromossômicos para apenas três espécies (Tabela 1), apoiaram a hipótese de Lindschau (1933) com relação à heterogeneidade das Bromelioideae.

Análises posteriores, também a partir de cortes microtômicos de ápices radiculares, foram realizadas por Gauthé (1965) e por Weiss (1965), os quais confirmaram alguns números reportados por Lindschau (1933) e acrescentam vários outros. Os dois autores citados trabalharam no Museum National d'Histoire Naturelle em Paris e ambos usaram bromélias cultivadas nas casas de vegetação do citado museu. Porém, nenhum número de exsicata foi citado ou encontrado para os exemplares estudados e as contagens são consideradas duvidosas também devido à metodologia utilizada (MacWilliams, 1974).

Um estudo mais detalhado de Bromeliaceae, incluindo várias populações de cerca de 50 táxons das três subfamílias, foi realizado por Marchant (1967) que apresentou inúmeras ilustrações com espalhamento de boa qualidade. Com base em suas observações, o autor discorda da teoria de Lindschau (1933) de que a subfamília Bromelioideae seria heterogênea sob o ponto de vista citogenético, uma vez que todas as espécies apresentaram $2n=50$, com exceção dos representantes do gênero *Cryptanthus* (cujos membros apresentaram $2n=34$) e de *Aechmea tillandsioides* (Mart. Ex Schult. F.) Baker com $2n=42$ (número confirmado em contagens mitóticas e meióticas de vários indivíduos com 21 bivalentes). O número $2n=50$ foi observado em todas as espécies das demais subfamílias, com exceção de duas espécies do gênero *Dyckia*, que apresentaram $2n=100$ ($n=50$). Em dois indivíduos do híbrido intergenérico \times *Cryptbergia meadii* (= *Cryptanthus beuckeri* E. Morr. \times *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel) o autor observou $2n=ca.42$ cromossomos, com certa irregularidade na divisão meiótica, como presença de univalentes, pontes anafásicas e cromossomos ou fragmentos retardatários. Com base na evidência deste híbrido, o autor propôs que o número $2n=42$, com meiose estável observado em *Aechmea tillandsioides*, também poderia ter surgido por hibridização entre duas espécies, uma com $2n=50$ e outra com $2n=34$.

Uma vez que não encontrou tendências evolutivas evidentes que distinguíssem as subfamílias ou os gêneros estudados, Marchant (1967) destacou a surpreendente homogeneidade numérica cromossômica observada na família, contrastando com sua diversidade morfológica e sua capacidade ímpar de adaptação ecológica.

Marchant (1967) analisou cinco espécies de Bromeliaceae (Tabela 1), efetuando uma revisão de todos os números cromossômicos existentes até aquela ocasião. O autor destacou que os gêneros *Tillandsia* e *Vriesea* são semelhantes sob o ponto de vista citogenético, fato interessante, levando-se em conta que, segundo o autor, sob o ponto de vista morfológico, a separação dos dois gêneros está baseada apenas na presença de escamas na base das pétalas em *Vriesea*.

Brown *et al.* (1984) efetuaram análises meióticas de 18 espécies da família, sendo duas espécies de Bromelioideae, oito de Pitcairnioideae e oito de Tillandsioideae, encontrando $n=25$ para todas, com exceção de *Tillandsia umbellata* Andre, com $n=18$. Brown e Gilmartin (1986) efetuaram uma revisão dos números cromossômicos de Bromeliaceae, na qual compararam as contagens mitóticas e meióticas destacando discrepâncias entre resultados obtidos com estas duas metodologias. Os autores tentaram explicar tais discrepâncias como uma consequência do hábito epifítico, uma vez que células dos ápices radiculares estariam “estressadas” levando à existência de mutações, sugerindo mais estabilidade em tecidos somáticos de espécies terrestres do que nas epifíticas. Os autores sugeriram também que os estudos de Bromeliaceae devem restringir-se a contagens de bivalentes meióticos, porém não consideraram as dificuldades inerentes ao alto número cromossômico destas espécies, aliadas às análises a partir de cortes histológicos, realizadas pelos autores que geraram a maioria dos números conflitantes.

Um estudo envolvendo oito espécies da subfamília Pitcairnioideae também reportou $n=25$ para todos os táxons estudados (Varadarajan e Brown, 1985). Em estudo posterior, Brown e Gilmartin (1989) acrescentaram 69 novas contagens cromossômicas a seus dados anteriores, incluindo uma espécie das Bromelioideae, 14 das Pitcairnioideae e 54 Tillandsioideae. Também houve uma clara predominância do número $n=25$, com exceção de algumas espécies do gênero *Tillandsia* que apresentaram números discrepantes: *T. capillaries* f. *hieronymii* (Mez) L.B. Smith com $n=50$; *T. complanata* Benth com $n=20$; *T. complanata* Benth ssp. *complanata* com $n=22$; *T. leiboldiana* Schdl. var. *leiboldiana* com $n=19$ e *T. scaligera* Mez & Sodiro com $n= 25+2-10$ fragmentos.

Em estudo citogenético complementar, Brown *et al.* (1997) reportaram números cromossômicos para 44 táxons, observando o nível diplóide ($2n=50$) para a maioria das espécies, com exceção do triplóide *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Smith ($2n=75$), do tetraplóide *Tillandsia butzii* Mez ($2n=100$) e do hexaplóide *Fosterella villosuta* (Harms) L.B. Smith ($2n=150$).

Um recente estudo citogenético foi realizado com espécies brasileiras (Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000) apresentando contagens mitóticas para 17 espécies de nove gêneros (*Aechmnea*, *Ananas*, *Billbergia*, *Bromelia*, *Cryptanthus*, *Encholirium*, *Hohenbergia*, *Neoglaziovia*, e *Orthophytum*), todos da subfamília Bromelioideae. Também no citado estudo foi observado a

predominância do número $2n=50$, com exceção de *Bromelia laciniosa* Mart. ex. Schultes ($2n=ca.150$), *Cryptanthus bahianus* L.B. Smith ($2n=34 + 1-4B$), *Hohenbergia* aff. *ulticulosa* Ule ($2n=50 + 2B$), *Neoglaziovia variegata* Arruda Camara ($2n=100$), *Ortophytum burle-maxii* L.B. Smith & Rangel ($2n=100$) e *O. maracaense* L.B. Smith ($2n=150$).

A Tabela 2 apresenta uma análise dos números cromossômicos reportados na literatura para gêneros de Bromeliaceae, ao lado de características como distribuição geográfica, hábito predominante, informando também o número de espécies existentes e citogeneticamente analisadas. Existem dados citogenéticos para 201 espécies de 25 gêneros da família, sendo 69 espécies de 14 gêneros da subfamília Bromelioideae, enquanto as Pitcairnioidae apresentam sete gêneros e 44 espécies analisados e as Tillandsioidae apresentam quatro gêneros e o maior número de espécies (78) analisadas. O gênero mais estudado é *Tillandsia*, com 61 espécies com contagens prévias (com clara predominância de $n=25$), seguido de *Pitcairnia* com 22 espécies estudadas.

O número básico $x=25$, proposto para a família, foi relatado por diversos autores (Sharma, 1984; Brown e Gilmartin, 1986; 1989), sugerindo-se a poliploidia, associada à hibridização, como o mecanismo evolutivo mais provável para sua origem, notoriamente presente em determinados gêneros.

Dentre as subfamílias, Pitcairnioidae apresentou a maior homogeneidade de números cromossômicos. Por outro lado, em Bromelioideae verificam-se variações no gênero *Billbergia* ($2n=50, 54$), tal como em Tillandsioidae onde um maior número de taxa com discordâncias entre números cromossômicos mitóticos e meióticos foram identificados (Brown e Gilmartin, 1986).

O número incomum $n=17$, encontrado em *Cryptanthus* corresponderia teoricamente a um paleotetraplóide originado por hibridização entre parentais ancestrais $x=8$ e $x=9$ (Figura 2), números frequentes entre as Commelinoidae. Com base neste e em outros caracteres, tem-se sugerido que o gênero *Chyptanthus* deveria ser removido da subfamília Bromelioideae, sendo classificado em uma subfamília própria, Cryptanthioideae. Entretanto, os autores não descartaram a possibilidade de que o número $n=17$ tenha se originado que por um processo de aneuploidia (disploidia) decrescente a partir de $n=25$, resultando no aparecimento do número básico secundário $x=17$ (Brown e Gilmartin, 1989; Gilmartin e Brown, 1987).

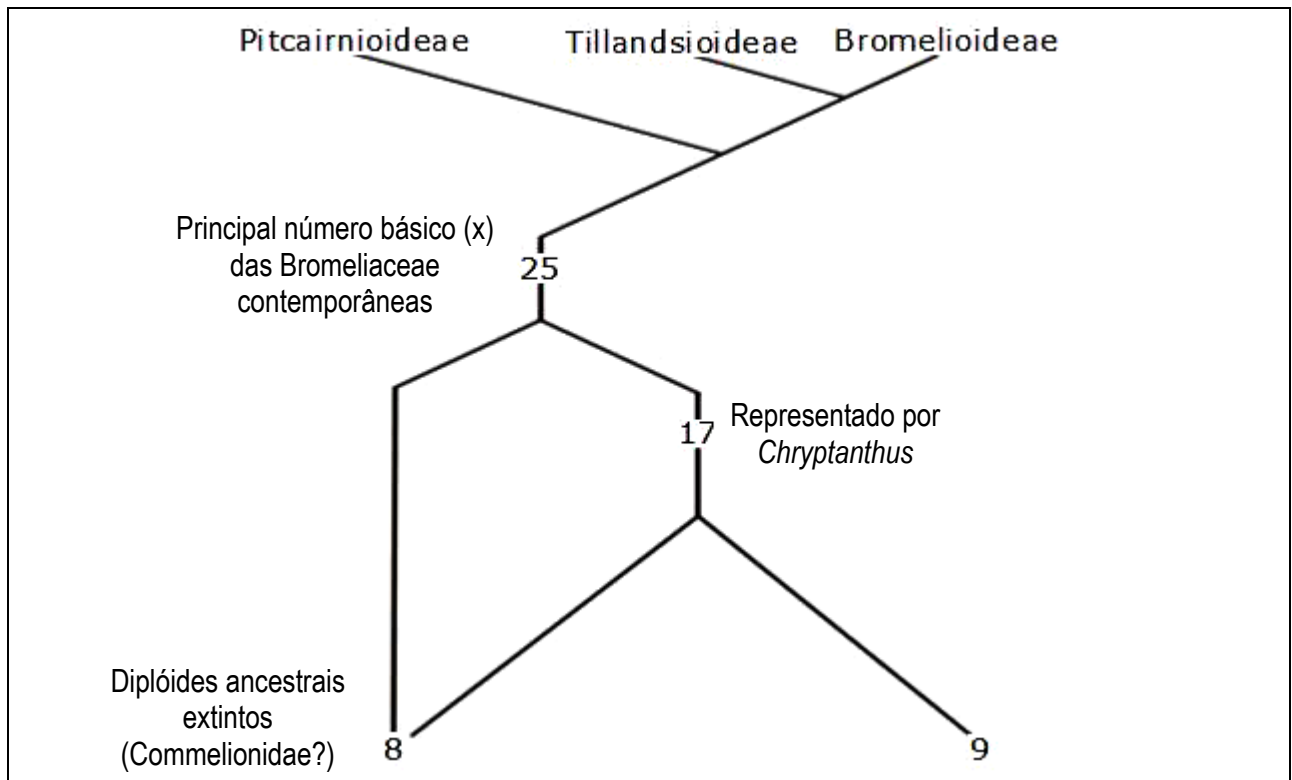


Figura 2. Modelo proposto para a evolução do número básico em Bromeliales. O número básico $x=25$ sinapomórfico seria hipoteticamente derivado de hibridização e poliploidia envolvendo um paleodiplóide ($n=8$) e um paleotetraplóide ($n=17$). O paleotetraplóide dibásico teria sido desenvolvido através da hibridização e poliploidia envolvendo paleodiplóides $n=8$ e $n=9$. (Fonte: Brown e Gilmartin, 1989; com modificações).

2.3.2. Cromossomos B

Brown e Gilmartin (1989) detectaram em Bromeliaceae a presença de cromossomos B pela primeira vez em *Tillandsia polystachia* L., espécie na qual os números cromossômicos variaram entre diferentes botões florais, assim como entre diferentes anteras de um mesmo botão floral.

Estudando bromeliáceas coletadas na Bahia, Cotias-de-Oliveira *et al.* (2000) também reportaram cromossomos B em três das 17 espécies analisadas: *Cryptanthus bahianus* ($2n=34 + 1-4 B$), *Bromelia plumieri* ($2n=50 + 1-2 B$) e *Hohenbergia* aff. *ultriculosa* ($2n=50 + 2B$).

Tabela 2. Números cromossômicos em gêneros de Bromeliaceae previamente analisados incluindo sua distribuição e tipo ecológico predominante.

Gênero	Nº cromossômicos freqüentes		Nível de ploidia	Nº de espécies		Distribuição Geográfica	Hábito Predominante
	n	2n		Existentes	Analisadas citogeneticamente		
Subfamília Bromelioideae							
<i>Acanthostachys</i>	-	50	2x	2	1	Centro oeste do Brasil	Terrestre
<i>Aechmea</i>	25	50	2x	220	16	América tropical	Epifítico e terrestre
<i>Ananas</i>	25	50	2x	7	8	América do Sul	Terrestre
<i>Areococcus</i>	-	50	2x	5	2	Sudeste do Brasil	Terrestre e epifítico
<i>Bilbergia</i>	-	54	2x	62	12	América tropical	Epifítico
<i>Bromelia</i>	-	96	2x	49	7	América tropical	Terrestre
<i>Canistrum</i>	-	50	2x	11	3	Sudeste do Brasil	Epifítico
<i>Cryptanthus</i>	17	34	2x	42	8	Sudeste do Brasil	Terrestre
<i>Lymania</i>	-	100	4x	6	2	Guiana	Terrestre
<i>Hohenbergia</i>	-	50	2x	47	4	Maior parte na Jamaica e Sudeste do Brasil	Terrestre e epifítico
<i>Neoglaziovia</i>	-	100	4x	3	1	Sudeste do Brasil	Terrestre
<i>Nidularium=Aregelia</i>	-	54	2x	54	14	Sudeste do Brasil	Terrestre e epifítico
<i>Orthophytum</i>	-	50,100,150	2x,4x, 6x	26	3	Sudeste do Brasil	Terrestre
<i>Portea</i>	-	50	2x	9	1	Sudeste do Brasil	Epifítico
<i>Pseudoananas</i>	-	98,100	2x	1	2	Sudeste do Brasil	Terrestre
<i>Quesnelia</i>	-	50	2x	15	1	Sudeste do Brasil	Epifítico
Total Bromelioideae				559	85		
Subfamília Pticarnioideae							
<i>Brocchinia</i>	-	18	2x	49	1	Guiana	
<i>Deuterocohnia</i>	25		2x	14	3	Maior parte na Bolívia e Guianas	
<i>Dyckia</i>	25	50	2x	120	7	Sudeste da América do sul	
<i>Encholirium</i>	-	50	2x	30	1	Sudeste do Brasil	Todas
<i>Fosterella</i>	25		2x	18	3	Predominante no centro oeste da América do Sul	Terrestre
<i>Hechtia</i>	-	50	2x	51	1	Predominante Mexicana	
<i>Lindmania</i>	-	50,100	2x,4x	36	3	Guiana	
<i>Pitcairnia</i>	25	50	2x	295	22	América tropical	
<i>Puya</i>	25	50	2x	194	7	Predominante dos Andes	
Total Pitcairnioideae				807	48		
Subfamília Tillandsioideae							
<i>Glomeropitcairnia</i>	-	50	2x	2	1	Pouco nas Antilhas, Trinidad e adjacente a Venezuela	Epifítico
<i>Guzmania</i>	25	48	2x	175	5	América Tropical	Terrestre
<i>Tillandsia</i>	25	50	2x	518	62	América Tropical	Epifítico
<i>Vriesea</i>	25		2x	227	23	América tropical	Epifítico e terrestre
Total Tillandsioideae				922	91		
Total Geral (3 subfamílias)				2288	224		

2.3.3. Tamanho Cromossômico

Poucas descrições da morfologia cromossômica têm sido encontradas na literatura para Bromeliaceae, justificadas pelo fato de que a maioria dos estudos prévios envolveu análises meióticas, bem como devido ao alto número cromossômico aliado a seu tamanho diminuto (Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000).

Marchant (1967) destacou que apesar da uniformidade de números básicos com predominância de $n=25$ nas três subfamílias, há uma tendência a aumento do tamanho cromossômico, com as Pitcairnioideae em uma posição mais basal, com cromossomos menores e de tamanhos semelhantes, para o grau variável de bimodalidade observado em Bromelioideae até a bimodalidade mais pronunciada característica das Tillandsioideae. Apesar dos conflitos quanto aos números cromossômicos, os desenhos apresentados nas publicações de Gauthé (1965) e Weiss (1965) também evidenciaram cariótipos bimodais, especialmente nas Tillandsioideae.

Considerando a bimodalidade como um caráter derivado, Marchant (1967) sugeriu que as Tillandsioideae epifíticas de folhas estreitas teriam se originado a partir de espécies primitivas epifíticas com fitotelmas (as chamadas bromélias-tanque). Por outro lado, McWilliams (1974) destacou que, se esta hipótese fosse válida, não haveria nas Tillandsioideae gêneros com folhas largas, como é o caso de *Vriesea*.

No híbrido intergenético *Cryptbergia* ($2n=42$), Marchant (1967) descreveu cromossomos grandes ao lado de cromossomos menores, destacando que os dois grupos cromossômicos apresentavam uma tendência a manterem-se separados durante a meiose. A separação era mais evidente durante a segregação cromossômica, uma vez que os maiores segregavam antes dos menores na anáfase.

Com base nos estudos citogenéticos de outros autores, Brown e Gilmartin (1986) sugeriram que a evolução cariotípica possa ter ocorrido a partir de espécies com cromossomos pequenos e de tamanho uniforme, característicos da subfamília Pitcairnioideae, para a bimodalidade freqüentemente encontrada em muitas Tillandsioideae.

A origem de cariótipos bimodais tem sido discutida, sugerindo-se a hibridização de táxons com cromossomos de diferentes tamanhos como um dos principais mecanismos na origem deste tipo de cariótipo em vegetais (Greilhuber, 1995).

Cotias-de-Oliveira *et al.* (2000) realizaram um estudo citogenético incluindo a medição e a contagem do número cromossômico em 17 espécies pertencentes aos gêneros: *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia*, *Bromelia*, *Cryptanthus*, *Encholirium*, *Hohenbergia*, *Neoglaziovia*, e

Orthophytum. Dentre as espécies analisadas, não foi observada uma clara presença de bimodalidade. *Aechmea*, *Encholirium* e *Neoglaziovia* mostraram uma variação cromossômica contínua de forma decrescente. Por outro lado em *Bromelia* e *Billbergia*, as espécies apresentaram um cariótipo mais uniforme.

2.3.4. Quantidade de DNA

Famílias com alto número básico podem ter origem paleopoliplóide ou a partir de ancestrais diplóides extintos ou não encontrados (Guerra, 2000). A quantificação de DNA tem sido usada na sistemática para distinguir espécies, identificar poliplóides e testar possíveis candidatos a ancestrais de híbridos interespecíficos (Bennett e Leitch, 2000).

As primeiras espécies de Bromeliaceae que tiveram seu DNA quantificado foram *Ananas bracteatus* (Lindl.) Schult. F. e *A. comosus* L. Merrill (abacaxi cultivado), para as quais Bennet e Leitch (1995) reportaram $1C=0,45$ pg e $0,55$, respectivamente.

Considerando a conservação cromossômica numérica existente em Bromeliaceae, com o claro predomínio de $2n=50$, torna-se interessante comparar espécies de mesmo número a fim de identificar outras tendências evolutivas no grupo. Porém, apenas um único resumo de congresso (Ebert e Till, 1997) foi encontrado reportando trabalho executado com esta finalidade. Os autores reportam dados obtidos a partir de análises de quantificação de DNA para 47 espécies da subfamília Pitcairnioideae, sendo 31 espécies de *Pitcairnia* e uma ou duas espécies dos gêneros *Ayensua*, *Brocchinia*, *Deuterocohnia* Mez, *Dyckia* Schult. F., *Encholirium*, *Fosterella* L.B. Smith, *Hechtia* Kotsch, *Navia* e *Puya*. A menor quantidade de DNA da amostra ($1C=0,30$ pg; $2n=ca.50$) foi observada em *Pitcairnia feliciana*, a única espécie encontrada no continente Africano. Nas demais espécies do gênero *Pitcairnia*, a quantidade de DNA variou entre $0,42$ e $0,68$ pg. Quantidades de DNA pronunciadamente maiores foram encontradas para duas espécies de *Fosterella* (ambas com $0,93$ pg), de *Encholirium* ($0,86$ e $0,87$ pg), e de *Dyckia* ($0,79$ e $0,80$ pg), bem como para uma espécie de *Navia* ($0,71$ pg). Valores $1C$ relativamente menores foram observados em *Brocchinia* ($0,38$ e $0,39$), *Deuterocohnia* ($0,37$ e $0,40$), *Ayensua* ($0,40$ pg), *Puya* ($0,44$ e $0,47$ pg) e *Hechtia* ($0,47$ e $0,48$ pg).

2.3.5. Bandeamento Cromossômico

Técnicas de bandeamento cromossômico têm sido úteis no estudo da evolução do genoma de monocotiledôneas, em alguns casos permitindo um acompanhamento da evolução numérica e morfológica, especialmente do processo de heterocromatização. Através da técnica de bandeamento C torna-se possível diferenciar a heterocromatina constitutiva através de bandas visíveis, permitindo comparações entre espécies ou táxons relacionados, como nos estudos realizados no gênero *Scilla* L. (Greilhuber, 1995), um gênero das Hyacinthaceae.

Em Bromeliaceae, apesar de existirem estudos moleculares com abordagens filogenéticas e cladísticas, é notória a inexistência de trabalhos de bandeamento cromossômico que possibilitem um maior entendimento nos processos carioevolutivos entre espécies e subfamílias.

O emprego dos fluorocromos CMA₃ (cromomicina A₃) e DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol), que coram preferencialmente regiões cromossômicas ricas em GC e AT, respectivamente, permite o reconhecimento não apenas da distribuição da heterocromatina constitutiva, mas de sua composição preferencial. A análise do padrão de bandeamento com o CMA₃ também evidencia as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) ricas em GC, que codificam genes de RNA ribossômico (RNAr) (Schweizer, 1976, Greilhuber, 1984). A coloração com fluorocromos, com apoio adicional de contracorantes como a actinomicina D (AMD) e a distamicina (AD), possibilitam um maior contraste de bandas fluorescentes através da aplicação da trílice coloração (Schweizer, 1976).

O bandeamento RON, a partir da coloração de nitrato de prata (AgNO₃) permite a visualização das RONs ativas na intérfase anterior em metáfases, evidenciando também o número de nucléolos ativos no núcleo interfásico, o que possibilita inferências sobre o possível nível de ploidia em espécies poliplóides (Hizume *et al.*, 1980).

Felix e Guerra (1999) realizaram estudos cromossômicos incluindo bandeamento C e coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI na subtribo Oncidiinae (Orchidaceae), sugerindo a ocorrência de disploidia decrescente através de translocação Robertsoniana em *Psycmorchis pussila* (L.), uma espécie que possui o menor número cromossômico (2n=12) dentre as orquídeas, diferindo do número básico proposto para a família.

Em Velloziaceae, estudos citotaxonômicos auxiliados pelas técnicas de bandeamento C e fluorocromos possibilitaram caracterizar a heterocromatina e distingui-la de blocos eucromáticos condensados na intérfase, visualizados apenas com coloração convencional (Melo *et al.*, 1997).

2.4. Marcadores moleculares

Weising *et al.* (1995) efetuaram uma ampla revisão bibliográfica dos marcadores classificados como *fingerprinting* de DNA (ou impressão genômica do DNA). Tais marcadores são considerados como altamente informativos, em vista da complexidade de locos que acessam concomitantemente, prestando-se para distinguir espécies, populações, bem como indivíduos proximamente relacionados. Os autores destacam que, além do uso de enzimas de restrição, a metodologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase), associada à hibridização de fragmentos com microsátélites, têm em muito colaborado para um refinamento das citadas análises, resultando em um considerável aumento no número de polimorfismos e em reprodutibilidade considerável.

Vários exemplos de aplicação de *Fingerprinting* de DNA na genética de populações, ecologia e sistemática têm sido descritos na literatura. Entre estes se destacam estudos com a metodologia de RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*; Polimorfismos de DNA Amplificado ao Acaso) (Weising *et al.*, 1995). Este tipo de marcador foi usado, por exemplo, para detectar as variações existentes entre indivíduos e populações de duas espécies leguminosas arbóreas nativas da América Central e do México – *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. e *G. maculata* (Jacq.) – parcialmente influenciadas pelo homem em vista de seu extrativismo e cultivo para extração de madeira (Chalmers *et al.*, 1992). Os resultados evidenciaram populações altamente monomórficas para todos os iniciadores (*primers*) avaliados na região de cultivo-extrativismo, enquanto as populações naturais apresentavam altos níveis de polimorfismo, confirmando avaliações morfológicas e estudos morfométricos previamente realizados. Aparentemente, a área que sofreu influência antrópica foi selecionada unidirecionalmente, resultando em um decréscimo da diversidade.

A análise de *fingerprinting* de DNA também pode esclarecer alguns aspectos, sobre a origem das plantas ocorrentes em alguns ambientes. Um exemplo clássico encontra-se na espécie *Microseris pygmaea* P. Bitterroot (Asteraceae) a qual ocorreria subespontaneamente no Chile, havendo a hipótese de que sua introdução tenha se dado a partir de uma única semente trazida da América do Norte. Enquanto isoenzimas revelaram apenas baixos níveis de variabilidade, hibridização pós-restrição do DNA com o microsátélite GATA resultou em *Fingerprint* altamente polimórfico entre indivíduos das populações analisadas, contrariando a hipótese anterior (Houten *et al.*, 1991).

A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado) baseia-se na obtenção de polimorfismos de fragmentos

de DNA genômico amplificados por duas reações seletivas de PCR. Esta técnica consiste em uma grande ferramenta para emprego na taxonomia, através da detecção de variabilidade genética em um grande número de locos visualizados pela presença ou não de bandas geradas em gel de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995, Mueller, 1999).

O padrão de bandas polimórficas geradas nas reações de AFLP ou de RAPD pode ser identificado visualmente, sendo os seus dados registrados em uma matriz binária (“1” para a presença e “0” para a ausência de uma banda em uma particular posição). Bandas fracas ou sem distinção são excluídas da análise e o resultado da matriz 0/1 é convertido em uma matriz de distância, baseada nos índices de similaridade Jaccard ou Dice, usando, por exemplo, o software NTSYS-pc. Como resultado, são geradas representações gráficas em forma de fenograma (árvore fenética) ou dendrograma (árvore filogenética) (Weising, 1995; Rohlf, 1993).

Em sua dissertação de mestrado, Cavallari (2004) realizou um estudo molecular em espécies endêmicas do gênero *Encholirium*: *E. biflorum*, *E. pedicellatum* e *E. subsecundum* (Bromeliaceae, subfamília Pitcairnioideae), pela metodologia de RAPD, revelando uma grande variabilidade interespecífica, bem como entre diferentes populações das espécies analisadas. O estudo permitiu o estabelecimento de relações entre espécies de taxonomia pouco resolvida, fornecendo também dados para suporte do manejo e conservação das espécies em extinção do citado grupo.

Zizka *et al.* (1999) em trabalho de revisão do gênero *Fascicularia* através de análises morfológicas e anatômicas, auxiliados pela técnica de RAPD, obtiveram uma melhor caracterização da espécie *F. bicolor* (Ruiz & Pav) separando em duas novas subespécies, proximamente relacionadas a *Greigia sphacelata* (Ruiz & Pav) Regel.

Estudos com marcadores isoenzimáticos também foram realizados com alguns membros da família, incluindo populações de *Pitcairnia gykesii* ocorrentes em diferentes *Iselbergs*. Os autores observaram uma diversidade genética relativamente grande, bem como uma elevada variabilidade nas frequências alélicas, sugerindo que o isolamento das diferentes populações e a existência de mecanismos de reprodução sexual e vegetativa contribuíram para a formação de populações polimórficas (Sarhou *et al.*, 2001).

2.4.1 Evolução Molecular e Análises Cladísticas

Análises cladísticas têm contribuído grandemente para uma melhor definição taxonômica de vários grupos vegetais, especialmente quando se leva em conta um número abrangente de caracteres claramente polarizáveis, ou seja, cuja condição derivada ou ancestral possa ser reconhecida através de comparação com um grupo externo. Tais análises ganharam novo impulso com a incorporação de marcadores de DNA, seja pela comparação de polimorfismos de tamanho de bandas, como pela análise comparativa de suas seqüências (Hillis *et al.*, 1996).

A primeira análise cladística em Bromeliaceae foi realizada com base em características morfológicas e de números cromossômicos, levando à conclusão de que as subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae constituiriam um grupo-irmão com a subfamília Pitcairnioideae em uma posição ancestral em relação às outras duas subfamílias (Gilmartin e Brown, 1987). Em nível suprafamiliar, os autores posicionaram a família Bromeliaceae próxima à família Velloziaceae. Porém, este trabalho recebeu críticas de Simpson (1988), especialista em cladística, que chama a atenção para o fato de que os autores selecionarem dez famílias de monocotiledôneas como possíveis grupos-externos, sem justificar este procedimento incomum. Tal procedimento certamente dificultou a polarização dos dados analisados, que foram usados para a determinação da classificação infra e suprafamiliar (Simpson, 1988).

Em um estudo posterior, Varadarajan e Gilmartin (1988) efetuaram uma análise cladística dos gêneros da subfamília Pitcairnioideae com dados morfológicos e números cromossômicos. Uma análise preliminar foi feita, usando dois gêneros de Velloziaceae (*Barbacenia* e *Vellozia*) como grupos externos, comparados a três gêneros de cada subfamília: Tillandsioideae (*Glomeropitcairnia*, *Guzmania* e *Vriesea*) e Bromelioideae (*Hohenbergia*, *Neoregelia* e *Orthophytum*) visando definir a polarização dos caracteres. A seguir uma análise dos gêneros da subfamília Pitcairnioideae foi realizada, revelando *Brocchinia* como um grupo ancestral. O segundo grupo monofilético reconhecido foi composto pelos gêneros *Ayensua*, *Connellia*, *Cottendorfia*, *Fosterella*, *Navia*, *Pepinia*, *Pitcairnia* e *Steyerbromelia*, enquanto o terceiro grupo monofilético compreenderia sete gêneros: *Abromeitiella*, *Brewcaria*, *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium*, *Hechtia* e *Puya*. Os autores sugerem as montanhas da Guiana Francesa como o centro de origem e dispersão da subfamília.

Uma avaliação cladística com caracteres morfológicos foi efetuada, visando identificar a posição do controverso gênero *Glomeropitcairnia* dentre as Bromeliaceae. Os resultados

evidenciaram que o citado gênero deveria posicionar-se dentre as Tillandsioideae e não dentre as Pitcairnioideae. Os gêneros *Guzmania* e *Mezobromelia* foram apontados no estudo como os mais proximamente relacionados ao citado gênero (Gilmartin *et al.*, 1989).

Baracho (2003) através de análises morfológicas e filogenéticas no gênero *Hohenbergia* permitiu delimitar uma classificação infragenérica, caracterizando padrão de distribuição geográfica dos subgêneros *Wittmackiopsis* e *Hohenbergia*. Devido ao alto grau de diversidade (96,4%) revelado no total de 27 espécies registradas de 49 espécies pertencentes ao subgênero *Hohenbergia*. O estado da Bahia foi indicado como o principal centro de diversidade no grupo.

Ranker *et al.* (1990) foram os primeiros a abordar as afinidades subfamiliares em Bromeliaceae utilizando dados moleculares. Com base em análises de fragmentos de restrição de DNA de cloroplasto obtidos em 10 espécies de bromélias (cinco Tillandsioideae, três Pitcairnioideae e duas Bromelioideae), os citados autores reconheceram as subfamílias Bromelioideae e Pitcairnioideae como grupos-irmãos, com Tillandsioideae (exceto *Glomeropitcairnia*) em uma posição basal dentro da família.

Outro estudo, envolvendo seqüências *rbcL* do DNA de cloroplasto foi realizado por Clark *et al.* (1993), no qual avaliaram a posição suprafamiliar das Bromeliaceae. Um único clado une a família Bromeliaceae às Rapateaceae, sendo que este clado, por sua vez, aparece no estudo ao lado das famílias da ordem Zingiberales. A família Velloziaceae apresenta-se em um clado distinto, não relacionado aos grupos anteriores, sugerindo-se sua remoção do complexo Bromeliiflorae-Zingiberiflorae-Commeliniflorae. Uma proximidade com as Rapateaceae também foi evidenciada no estudo de Givnish *et al.* (1999), também baseado em seqüências *rbcL*.

Um estudo abrangente foi efetuado por Terry *et al.* (1997a; b) incluindo análises de seqüências de genes *ndhF* de 30 espécies distribuídas em 29 gêneros de Bromeliaceae. Dentre os resultados importantes destaca-se o posicionamento isolado do gênero *Brocchinia*, a distinção entre as Pitcairnioideae e o gênero *Puya*. Por outro lado, nenhuma limitação clara pôde ser estabelecida entre o complexo de espécies das Tillandsioideae, incluindo os gêneros *Tillandsia*, *Guzmania*, *Vriesea* e *Mezobromelia*.

Um outro tipo de seqüência de DNA de cloroplasto (*trnL*-UAA-intron) foi utilizada por Horres *et al.* (2000), visando esclarecer as relações filogenéticas infrafamiliares de Bromeliaceae, incluindo 62 espécies de 32 gêneros. Como resultado, os gêneros *Brocchinia* e *Ayensua* agruparam-se proximamente, formando um clado basal, aparentemente formando um grupo-irmão com os demais gêneros. As demais espécies agruparam-se em três clados

distintos, sendo: (1) todos os membros da subfamília Tillandsioideae; (2) três espécies do gênero *Hechtia* e (3) todas as Bromelioideae e as demais Pitcairnioideae (exceto *Ayensua*, *Brocchinia* e *Hechtia*). Desta maneira, a monofilia das subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae foi confirmada, enquanto as Pitcairnioideae mostraram-se claramente polifiléticas.

Brown (2000) efetuou uma revisão dos estudos moleculares em Bromeliaceae, incluindo uma análise cladística a partir de seqüências *ndhF* de 16 espécies da subfamília Bromelioideae anteriormente publicadas por Terry *et al.* (1997a; b). Os resultados evidenciam a posição basal do gênero *Brocchinia* e a colocação do gênero *Puya* como grupo-irmão das Bromelioideae. Em análises posteriores com um maior número de espécies e usando o mesmo tipo de seqüência (*ndhF*), Givnish *et al.* (2000; 2004) geraram dendrogramas distintos dos apresentados por Brown (2000) posicionando as subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae como irmãs, em um clado emergindo a partir da subfamília Pitcairnioideae.

A evolução da família Bromeliaceae parece estar diretamente ligada à sua ampla adaptação radiativa, com a presença de gêneros ou até mesmo de espécies com diferentes tipos de hábitos (Benzing, 2000).

Crayn *et al.* (2004), visando relacionar os diferentes hábitos da família Bromeliaceae com os diferentes mecanismos de fotossíntese C₃ e CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), realizaram uma análise de seqüências de plastídeos *mtaK* e *prs6*, caracterizando o tipo de fotossíntese C₃ como ancestral na família, sendo que sua evolução teria duas divisões; em Tillandsioideae o ancestral seria C₃ e as espécies mais avançadas CAM, enquanto em Bromelioideae a linha evolutiva seria inversa ao estabelecimento do hábito epifítico.

A partir de uma análise cladística, agregando seqüenciamento da porção *ndhF* de cloroplasto, bem como dados morfológicos e fitogeográficos, Givnish *et al.* (2004) sugeriram que as Bromeliaceae e as Rapateaceae constituiriam um grupo monofilético, fato confirmado pelas semelhanças nos padrões de distribuição das duas famílias. Com base nos polimorfismos observados nas seqüências geradas, os autores sugeriram que a ocorrência das espécies disjuntas de ambas famílias ocorrentes no oeste da África (*P. feliciana* e *M. dinklagei*, respectivamente) não seria resultado da deriva continental, como proposto anteriormente, mas sim de processos de dispersão de longa distância.

Em recente estudo filogenético na subfamília Tillandsioideae, Barfuss *et al.* (2005) utilizaram a análise de máxima parcimônia com emprego de sete seqüências de regiões não codificantes de plastídios (*trnK* íntron, *rps6* íntron, *trnL* íntron, espaçador intergênico *trnL-trnL* e espaçador intergênico *atpB-rcbL*) e duas seqüências codificantes (*rbcL* e *matK*) em um

total de 104 espécies e cultivares representados pelos seguintes gêneros: *Alcantarea*, *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Guzmania*, *Mezobromelia*, *Racinea*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Viridantha* e *Werauhia*, sugerindo uma nova classificação para a subfamília e formando quatro tribos: Catopsidae, Glomeropitcairnioideae, Vrieseae e Tillandsieae.

3. Referências Bibliográficas

- Baracho G. S. (2003) Revisão taxonômica de *Hohenbergia* Schult. & Schult. f. subg. *Hohenbergia* (Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, pp.189.
- Barfuss M. H. J; Samuel R., Till W., Stuessy T.F. (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Amer. J. Bot.* 92: 337-351.
- Benko-Iseppon A. M., Wanderley M. G. L. (2002) Cytogenetic studies on Brazilian *Xyris* species (Xyridaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 138: 245-252.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 76: 113-176.
- Bennet M. D., Leitch I. J. (2000) Variation in nuclear DNA amount (c-value) in monocots and its significance. In: Wilson K. L., Morrison D. A. (eds.) *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne, pp. 137-146.
- Benzing D. H. (2000) *Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bhowmik G. (1977) Meiosis in two varieties of pineapple. *Indian J. Genet. Pl. Breed* 37:1-4.
- Billings F.W. (1904) A study of *Tillandsia uenoides*. *Bot. Gaz.* 38: 99-121.
- Brown G. K. (2000) Dados moleculares em Bromeliaceae. In: Pereira M. V., Jakobsson A. (eds.) *Nidularium-Bromélias da Mata Atlântica*. Hamburg Donneley Gráfica Ltda, Rio de Janeiro, pp. 201.
- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1983) Chromosomes of bromeliads. *J. Bromeliad Soc.* 33: 171-172.
- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1986) Chromosomes of the Bromeliaceae. *Selbyana* 9: 88-93.
- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1989) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Amer. J. Bot.* 76: 657-665.
- Brown G. K., Varadarajan G. S., Gilmartin A. J. (1984) Bromeliaceae. In: Löve A. (ed.) *Chromosome numbers reports LXXXV*. *Taxon* 33: 756-760.
- Brown G. K., Palací, C. A., Luther, H. E. (1997) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Selbyana*, 18: 85-88.
- Cathcart D. J. (1995) The importance of maintaining bromeliads imports. *Florida Entomol.* 78: 16-21.

- Cavallari M. M. (2004) Estrutura Genética de Populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba, pp. 92.
- Chalmers, K. J.; Waugh, R.; Sprent, J. I.; Simom, A. J.; Powell, W. 1992. Detection of genetic variation between and Within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, Oxford, v. 69, p. 465-472, 1992.
- Chen R. Y., Li X. L., Song W. Q., Lin S. H. (1985) Studies on chromosome of tropical fruit trees in China. *J. Wuhan Bot. Res. (Wuhan Zhiwuxue Anjou)* 3: 423-428.
- Clark W. D., Gaut B. S., Duvall M. R., Clegg M. T. (1993) Phylogenetic relationships of the Bromeliiflorae - Commeliniflorae - Zingiberiflorae complex of monocots based on *rbcL* sequence comparisons. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 987-998.
- Collins J. L. (1933) Morphological and cytological characteristics of triploid pineapples. *Cytologia* 3: 248-256.
- Collins J. L., Kerns K. R. (1931) Genetic studies in pineapples. I. A preliminary report upon the chromosome number and meiosis in seven pineapples varieties. (*Ananas sativus* Lindl.) and in *Bromelia pinguin* L. *J. Heredity* 225: 139-142.
- Collins J. L., Kerns K. (1935) (unt no Darlington, wylie. 1965) *Proc Hawaiian Acad. Sci.*, 10: 10.
- Collins J. L., Kerns K. R. (1936) Origin and nature of tetraploid pineapples. *Amer. Nat.* 726: 45.
- Collins J. L., Kerns K. R. (1938) The origin and breeding characteristics of polyploid pineapples *Ananas comosus* (L.) Merr. *Gen.* 23: 145.
- Cotias-de-Oliveira A. L. P., Assis J. G. A., Bellintani M. C., Andrade J. C. S., Guedes M. L. S. (2000) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Gen. Mol. Biol.* 23: 173-177.
- Crayn D. M., Winter K., Smith A. (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. *PNAS* 101: 3703-3708.
- Cronquist A. (1988) The evolution and classification of flowering plants. 2^a ed. New York Botanic Garden, New York.
- Delay C. (1947) Recherches sur la structure des noyaux quiescences chez les Panérogames. *Rev. Cytol. et Cytophysiol. Vég.* 9, 1-4: 169-222; 10, 1-4: 103-229.
- Diers L. (1961) Der Anteil an polyploiden in den Vegetationsgürteln der westkordillere Perus. *Zeitschr. Bot.* 5: 437-488.
- Doutreligne J. (1939) Les diver types de structure nucléaire et de mitose somatique chez les Phanerógames. *Cellule* 2: 191-212.

- Ebert I., Till W. (1997) Nuclear genome size in Pticairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus *Pticairnia*. In: Abstracts Value C: Angiosperm genome size discussion meeting. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 15.
- Farvarger C. (1965) Notes de caryologie ailpine. IV. Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat. 88: 5-60.
- Fedorov A. A. (1969) Chromosome number of flowering plants. Komarov Botanical Institute. Leningrad.
- Felix L. P., Guerra M. (1998) Cytogenetic studies on species of *Habenaria* (Orchidoideae: Orchidaceae) occurring in the northeast of Brazil. Lindleyana 13: 224-230.
- Felix L. P., Guerra M. (1999) Chromosome analysis in *Psycmorchis pussilla* (L.) Dodson & Dressler: the smallest chromosome numbers known in Orchidaceae. Caryologia 52: 165-168.
- Gadella T. W. J., Kliphuis E. (1964) Chromosome numbers of some flowering plants collected in Surinam. Acta Bot. Neer. 3: 432-433.
- Gauthé J. (1965) Contribution a l'étude caryologique des Tillandsiées. Mém. du Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot 1: 39-59.
- Gilmartin A. J., Brown G. K. (1986) *Glomeropitcairnia*, an enigmatic genus. J. Bromeliad Soc. 36: 17-19.
- Gilmartin A. J., Brown G. K. (1987) Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies. Syst. Bot. 12: 193-500.
- Gilmartin A. J., Brown G. K., Varadarajan G. S., Neighbours M. (1989) Status of *Glomeropitcairnia* within evolutionary history of Bromeliaceae. Syst. Bot. 14: 339-348
- Givnish T. J., Evans T. M., Pires J. C., Sytsma K. J. (1999) Pholyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinideae: evidence from *rbcL* sequence data. Molec. Phylog. Evol. 12: 360-385.
- Givnish T. J., Evans M., Zjhra M. L., Patterson T. B., Berry P. E., Sytsma K. J. (2000) Molecular evolution, adaptative radiation, and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapataceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology. Evolution 54: 1915-1937.
- Givnish T. J., Millam K. C., Evans M., Hall J. C., Pires J. C., Berry, P. E., Systsma K. J. (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. Int. J. Plant Sci. 165: 35-54.
- Goldblatt P. (1981) Index to Plant chromosome Numbers 1975-1978. Missouri Botanical Garden. 5°. pp 553.

- Goldblatt P. (1984) Index to Plant chromosome Numbers 1979-1981. Missouri Botanical Garden. 8°. pp 427
- Goldblatt P. (1985) Index to Plant chromosome Numbers 1982-1983. Missouri Botanical Garden. 13°. pp 224.
- Goldblatt P. (1988) Index to Plant chromosome Numbers 1984-1985. Missouri Botanical Garden. 23°. pp 264.
- Goldblatt P., Johnson D. E. (1990) Index to Plant chromosome Numbers 1986-1987. Missouri Botanical Garden. 30°. pp 243.
- Goldblatt P., Johnson D. E. (1991) Index to Plant chromosome Numbers 1988-1989. Missouri Botanical Garden. 40°. pp 237.
- Goldblatt P., Johnson D. E. (1994) Index to Plant chromosome Numbers 1990-1991. Missouri Botanical Garden. 51°. pp.267.
- Goldblatt P., Johnson, D. E. (1996) Index to Plant chromosome Numbers 1992-1993. Missouri Botanical Garden. 58°. pp. 276.
- Greilhuber J. (1984) Chromosomal evidence in taxonomy In: Systematics Association. Academic Press, London, Special Vol. 25, pp. 157-177.
- Greilhuber J. (1995) Chromosomes of the monocotyledons (General aspects). In: Monocotyledons: Systematics and Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 379-414.
- Guerra M. (2000) Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson K. L., Morrison D. A. (eds.) Monocots: systematics and evolution. CSIRO, Melbourne, pp. 127-136.
- Hillis D. M., Montz C., Mable, B. K. (1996) Molecular Systematics. Massachusetts, USA.
- Hizume M., Sato S., Tanaka A. (1980) A highly reproducible method for nucleolus organizing regions staining in plants. Stain Technol. 55: 87-90.
- Horres R., Zizka G., Kahl G., Weising K. (2000) Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. Plant Biol. 2: 306-315.
- Houten W., Raamsdonk L, Bachmann, K (1994) Intraspecific evolution of *Microseris pygmaea* (Asteraceae, Lactuceae) analyzed by cosegregation of phenotypic characters (QTLs) and molecular markers (RAPDs). Pl. Syst. Evol. 190: 49-67.
- Kiehn M. (1990) Altbekannt-und trotzdem neu: *Tillandsia fuchsii*, spec. nov. In W. Till (ed.) Bromelie 2:30-33.

- Kubitzki K. (1998) The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except gramineae). Springer Verlag, Berlin, pp. 511.
- Leme E. M. C., Marigo L. C. (1993) Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda., Rio de Janeiro, pp.183.
- Lin B. V., Ritschel P. S., Ferreira F. R. (1987) Número cromossômico de exemplares da família Bromeliaceae. Rev. Bras. Frutic. 9: 49-55
- Lindschau M. (1933) Beiträge zur Zytologie der Bromeliaceae. Planta 3: 506-530.
- Macwillians E. (1974) Chromosome number and evolution. In: Smith L., Downs J. (eds.) Flora Neotropica Monographs (Ptilacarioideae) 14: 33-39.
- Marchant C. J. (1967) Chromosome evolution in the Bromeliaceae. Kew Bull. 21: 161-168.
- Matsuura H., Sutô H. (1935) Contributions to the idiogram study in phanerogamous plants. I.- J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. 5: 33-75.
- Melo N. F., Guerra M., Benko-Iseppon A. M., Menezes N. L. (1997) Cytogenetics and cytotaxonomy of Velloziaceae. Pl. Syst. Evol. 204: 257-273.
- Mueller U.G., Wolfenbarger, L. L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. Tree 14: 389-394.
- Moreira B.A., Cruz-Barros M. A. V., Wanderley M. G. L. (2005) Morfologia de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* L.B. Sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. Acta Bot. Bras. 19: 61-70.
- Morillo I. M. R. (1996) Systematics, phylogeny and chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). Thesis of Doctor of philosophy. Graduate School of the University of Missouri, St. Louis.
- Oberprieler C., Vogt R. (1993) Chromosome numbers of north African phanerogams. II. Willdenowia 23: 211-238.
- Palma-Silva C., Santos D. G., Kaltchuk-Santos E., Bordanese-Zaettini M. H. (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brasil. Amer. J. Bot. 91: 804-807.
- Proença S. L., Sajo M. G. (2004) Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz& Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. Acta Bot. Bras. 18: 319-331.
- Ranker T. A., Soltis D. E., Pamela S. S., Gilmartin A. J. (1990) Subfamilial phylogenetic relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast Dna restriction site variation. Systematic Botany 15: 425-434.

- Rohlf F. J. (1993) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter, New York.
- Sachdeva S. K. (1977) In IOPB chromosome number reports LVI. *Taxon* 26:257-274.
- Sarthou C., Samadi S., Boisselier-Dubayle M. (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *Amer. J. Bot.* 88: 861-868.
- Schweizer D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- Sharma A. K. (1984) Chromosome evolution in the monocotyledons - an overview. In: Sharma A. K., Sharma A. (eds.) *Chromosome evolution in eukaryotic groups*. CRC Press, Florida, pp.169-186.
- Sharma A. K., Gosh I. (1973) Cytotaxonomy of the family Bromeliaceae. *Cytologia* 36: 237-247.
- Sharma A. K., Sharma A. (1984) Trends of chromosome evolution in the plant kingdom. In: Sharma A. K., Sharma A. (eds.) *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups*. CRC Press, Florida, pp. 227-239.
- Simpson M. G. (1988) A critique of "Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies". *Systematic Botany* 13: 610-619.
- Smith L. B, Till W. (1998) The families and genera of vascular plants. In: Kubitzki K. (ed.) *Bromeliaceae*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 74-99.
- Soltis D. E., Soltis P. S. (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree* 14: 348-352.
- Souza G. M., Wanderley M. G. L. (2000) O gênero *Aechmea* Ruiz & Pavon (Bromeliaceae) em Pernambuco. *Acta Bot. Bras.* 14: 77-99.
- Taylor W. R. (1925) Chromosome constrictions as distinguishing characteristics in plants. *Amer. J. Bot.* 4: 238-244.
- Terry R.G., Brown G. K., Olmstead R.G. (1997a) Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *Amer. J. Bot.* 84: 664-670.
- Terry R. G., Brown G.K., Olmstead, R. G. (1997b). Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) using *ndhF* sequences. *Amer. J. Bot.* 22: 333-345.
- Tschischow N.T. (1956) Número de cromosomas de algunas plantas chilenas. *Bol. Soc. Biol. Concepción* 31: 145-147
- Varadarajan G. S., Brown G. K. (1985) Chromosome number reports LXXXIX. *Taxon* 34: 727-730.

- Varadarajan G. S., Gimartin A. J. (1988) Phylogenetic relationships of groups of genera within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Syst. Bot.* 13: 283-293.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M, Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA Fingerprinting. *Nucl. Ac. Res.* 23: 4407-4414.
- Wanderley M. G. L., Costa A., Proença S. L., Moreira B. A., Ogawa, K., Forzza R. C. (1998) Bromeliaceae of São Paulo State, Brazil. In: Abstracts Monocots II. Royal Botanic Garden, Sydney, pp. 89.
- Weiss H. E. (1965) Étude caryologique et cyto-taxonomique de quelques Broméliacées. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot.* 1: 9-38.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton.
- Wendt T., Canela M. B. F., Faria A. P. G., Rios, R. I. (2001) Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Amer. J. Bot.* 88: 1760-1767.
- Zizka G., Horres R., Nelson E.C., Weising, K. (1999) Revision of the genus *Fascicularia* Mez (Bromeliaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 129: 315-332.

4. Manuscritos de Artigos Científicos

4.1 Evolução Cromossômica e padrões de bandeamento em Bromeliaceae

Trabalho a ser submetido à revista **Taxon**.

Evolução cromossômica e padrões de bandeamento em Bromeliaceae

A ser submetido à revista Taxon

Gitai J.¹, Morawetz W.², Zizka G.³ e Benko-Iseppon A.M.¹

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Botânica Sistemática, Leipzig, Alemanha.

³Departamento de Botânica e Evolução Molecular, Instituto de Pesquisa Senckenberg & Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt am Main, Alemanha.

Sumário

Bromeliaceae compreendem uma grande família neotropical representada por 2.000 a 3.000 espécies, distribuídas em três subfamílias Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae. Apesar da existência de contagens para aproximadamente 220 espécies (cerca de 7-10% de seus membros), a maioria dos dados cariológicos encontra-se restrito às contagens de números cromossômicos, existindo poucos relatos sobre a morfologia cromossômica, os padrões de bandeamento e características nucleares. O presente estudo reportou o número cromossômico para 55 espécies da referida família, sendo 33 contagens inéditas representando as primeiras contagens para quatro gêneros. A maioria das espécies apresentou cromossomos diminutos de tamanhos similares, observando-se em algumas espécies de Tillandsioideae uma tendência à bimodalidade. Um total de 49 espécies apresentou o nível diplóide com prevalência de $2n=50$ em Bromelioideae e Pitcairnioideae e $2n=48$ em Tillandsioideae. Poliploidia foi encontrada em apenas três espécies: *Aechmea eurycorymbus* ($2n=ca.88$), *Bromelia atiacantha* ($2n=ca.100$) e *Neoglaziovia variegata* ($2n=ca.100$). Indivíduos mixoplóides (com dois níveis de ploidia diferentes) foram observados em três espécies de *Pitcairnia* analisadas: *P. flammea* com $2n=50$ e 100; *P. scepstrigera* com $2n=50$ e 100; *P. undulatossepala* com $2n=48$ e ca. 94. Os tamanhos cromossômicos variaram de 0.5 a 3.0 μm , sendo os maiores cromossomos encontrados em Tillandsioideae, enquanto que os menores em Pitcairnioideae. Todas as espécies apresentaram comportamento de condensação cromossômica proximal e núcleos interfásicos semi-reticulados. A coloração com fluorocromos CMA/DAPI foi realizada em *Aechmea aquilega*, *Ananas comosus*, *A. nanus*, *Puya coerulea* e em *Tillandsia bourgaei* revelando bandas CMA⁺/DAPI⁻ em um par cromossômico nas espécies analisadas. As implicações dos dados obtidos para a sistemática de Bromeliaceae foram discutidas.

Palavras chave

Cariótipo bimodal, Coloração com Fluorocromos, Heterocromatina, Mixoploidia, Poliploidia

Introdução

A análise citológica de espécies vegetais tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta para o entendimento de inúmeras questões evolutivas, através da identificação de variação no número e morfologia cromossômica, bem como pelo reconhecimento de diferentes marcadores que contribuam para uma melhor compreensão das relações filogenéticas.

A família neotropical Bromeliaceae compreende 56 gêneros e, aproximadamente, 2.000 a 3.000 espécies distribuídas nos climas tropical e subtropical, com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed a qual ocorre fora do continente americano (Cronquist, 1988; Kubitzki, 1998; Givnish & al., 2004). A família possui uma rica diversidade de espécies, possuindo hábito epifítico ou terrestre associados a uma ampla adaptação radiativa em diferentes habitats (Crayn & al., 2004).

Esta família é constituída por três subfamílias: Bromelioideae (31 gêneros e 724 espécies), Pitcairnioideae (16 gêneros e 946 espécies) e Tillandsioideae (nove gêneros e cerca de 1.100 espécies). A subfamília Bromelioideae apresenta o menor número de espécies, entretanto, é a que possui maior diversidade por apresentar o maior número de gêneros (Cronquist, 1988; Kubitzki, 1998; Smith & Till, 1998).

Estudos citogenéticos têm sido desenvolvidos em apenas cerca de 7-10% da família. Contudo, uma parte significativa dos números cromossômicos existentes devem ser reavaliados pelo fato de existirem erros que possam conduzir a circumscrições errôneas entre gêneros e espécies nas três diferentes subfamílias. Este deve ser o caso dos números relatados por alguns autores (Lindschau, 1933; Gauthé, 1965; Weiss 1965) que usaram a técnica clássica de secção microtômica para contagens cromossômicas. A maioria desses números diferiu do número básico $x=25$, sendo alguns destes não confirmados por estudos posteriores (Marchant, 1967; McWilliams, 1974), devendo ser considerados com cautela (Brown & Gilmartin, 1986; Gitaí & al., 2005).

Os estudos recentes com informações citológicas adicionais e de bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI têm sido reportados, revelando um baixo conteúdo de heterocromatina em todas as espécies analisadas, com apenas um ou dois pares de bandas $CMA^+/DAPI^-$ associadas à RON (Gitaí & al., 2005).

Na maioria das contagens cromossômicas prévias, o número cromossômico $2n=50$ foi observado, com diferentes níveis de ploidia, estando associado a pequenos cromossomos. Vários autores concordam com o número básico $x=25$ para a família, sugerindo que a sua evolução está caracterizada pela prevalência de poliploidia e por alguns

números acrescidos putativamente, às vezes referidos como aneuploidias (Marchant, 1967; Brown & Gilmartin, 1986; Gitai & *al.*, 2005).

O presente estudo traz novas evidências citológicas para alguns membros selecionados de Bromeliaceae incluindo o número e a morfologia cromossômica, a estrutura dos núcleos interfásicos, o comportamento de condensação cromossômica através da técnica de coloração convencional, bem como, a composição da heterocromatina (hc) e o número de cromossomos associados à RON, utilizando o bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI e a coloração com AgNO₃, respectivamente.

Materiais e Métodos

As espécies analisadas encontram-se listadas na Tabela 1 com as respectivas procedências, números de exsiccatas e números cromossômicos previamente reportados. Raízes coletadas foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 2 mM de 20 a 24 horas ou colchicina 0.05 a 0.1% de 3 a 6 horas, de 5 a 8°C. Após o tratamento, foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol/ ácido acético) a 15°C por um período variando de 2 a 24 horas e posteriormente estocadas em freezer a -20°C na mesma solução. As preparações cromossômicas com HCl/Giemsa foram procedidas de acordo com a metodologia de Guerra (1983) com pequenas modificações descritas por Benko-Iseppon & Morawetz (2000).

A coloração com os fluorocromos CMA/DAPI foi realizada segundo Deumling e Greilhuber (1982) de acordo com a metodologia desenvolvida por Schweizer (1976). A coloração com AgNO₃ seguiu Hizume & *al.* (1980), enquanto que a técnica de bandeamento C foi desenvolvida de acordo com Schwarzacher & *al.* (1980).

As medições dos tamanhos cromossômicos foram baseadas em desenhos de 2-4 metáfases de cada espécie apresentada após comparação com uma escala micrométrica. Devido ao fato das espécies apresentarem cromossomos diminutos, foram analisadas no mínimo oito metáfases ou prometáfases para a identificação do número cromossômico correto.

As fotos das análises convencionais foram tiradas com Kodak Technical Pan e com Kodak T-Max 400 para coloração com fluorocromos.

Resultados

Todos os números cromossômicos e características cariológicas adicionais das espécies investigadas são apresentados na Tabela 2 e ilustrados nas Figuras 1-7. No presente estudo foram analisadas 55 espécies de Bromeliaceae. Dados citológicos são descritos pela primeira vez para 33 espécies das três subfamílias, sendo 16 Bromelioideae: *Aechmea barleei*, *A. caudata*, *A. eurycorymbus*, *A. fendleri*, *A. ornata*, *Alcantarea brasiliiana*, *Bilbergia horrida* var. *tigrina*, *B. gigantea*, *B. oaxacana*, *B. pallidiflora*, *B. rosea*, *Bromelia antiacantha*, *Canistrum lindenii*, *Cryptanthus marginatus*, *Portea petropolitana* e *Quesnelia arvensis*; quatro Pitcairnioideae, *Pitcairnia chiapensis*, *P. macrochlamys*, *P. undulatosepala* e *Puya coerulea*; e 13 Tillandsioideae; *Catopsis morreniana*, *Guzmania monostachia* var. *variegata*, *Racinea ropalocarpa*, *Tillandsia argentina*, *T. brachycaulos*, *T. erubescens*, *T. streptophylla* x *brachycaulos* (hibrid), *T. lajensis*, *T. latifolia*, *T. pohliana*, *T. stricta* var. *Stricta*, *T. xiphioides* e *Werauhia viridiflora*. Para os gêneros *Alcantarea*, *Quesnelia*, *Racinea* e *Werauhia*, o presente estudo apresenta as primeiras evidências citológicas.

O número cromossômico diplóide $2n=50$ foi predominante em 33 espécies analisadas (Tabela 2), seguido pelo número diplóide $2n=48$, encontrado em 12 espécies de Tillandsioideae (*Tillandsia brachycaulos*, *T. cyanea* (Fig. 4C), *T. humilis*, *T. latifolia*, *T. pohliana*, *T. stricta*, *T. ultriculata*, *T. xiphioides*, *T. sp. 6212*, *T. sp. 6431*, *T. sp. 8809* (Fig. 5D), *Vriesea splendens* (Fig. 5F) e em uma única Bromelioideae (*Bilbergia pallidiflora*). O número diplóide $2n=44$ foi observado em uma única espécie (*Tillandsia sp. 9714*).

Os menores números cromossômicos foram encontrados em três espécies do gênero *Cryptanthus* (Bromelioideae): *C. bahianus* com $2n=34$ (Fig. 2C); *C. marginatus* e *C. praetextus* ambas com $2n=32$ (Fig. 2D e 2E, respectivamente). Em ambas as espécies *C. bahianus* e *C. praetextus* foram encontrados cromossomos B (1-3 e 1-2, respectivamente), estrutura não encontrada nas espécies restantes.

Poliploidia foi observada nas seguintes espécies: *Aechmea eurycorymbus* ($2n=ca.88$, Fig.1E), *Bromelia antiacantha* ($2n=ca.100$, Fig. 2A) e *Neoglaziovia variegata* ($2n=100$, Fig. 2F), todas pertencentes à subfamília Bromelioideae.

Algumas células meristemáticas de uma mesma lâmina apresentaram dois números cromossômicos diferentes em um mesmo indivíduo, sendo estas observadas em três espécies de Pitcairnioideae: *Pitcairnia flammea* com $2n=50$ e $ca.100$ (Fig. 3B); *P. sceptrigera* com $2n=50$ e $ca.100$ (Fig. 3D e E); *P. undulatosepala* (Fig. 3F e G), com $2n=ca.48$ e $2n=ca.94$.

As espécies analisadas exibiram comportamento de condensação cromossômica proximal. Entretanto, uma característica particular de condensação tardia em parte do

complemento cromossômico pôde ser observada em algumas Tillandsioideae: *Tillandsia erubescens* (Fig. 4D), *T. hib. streptophylla* x *T. brachycaulos* (Fig. 4E) e *T. mollis* (Fig. 4F), não sendo esta uma característica evidente em outras espécies.

Em todas as espécies, os núcleos interfásicos foram caracterizados como semi-reticulados. A cromatina apresentou coloração mais clara e difusa nos cromocentros das espécies pertencentes às subfamílias Bromelioideae e Pitcairnioideae, enquanto que em Tillandsioideae observou-se uma cromatina mais granulada. As espécies de Tillandsioideae apresentaram na sua maioria cromocentros grandes, alongados a esferóides (Fig. 4B), diferindo de Bromelioideae (Fig. 1D, 2D) e Pitcairnioideae (Fig. 3D) que exibiram cromocentros menores alongados a puntiformes. Por outro lado, a distribuição dos cromocentros não foi padronizada, sendo classificada como irregular ou regular espécies das três subfamílias. Algumas espécies com núcleos polarizados (Fig. 3H) foram visualizadas em Pitcairnioideae (Tabela 2).

Os tamanhos cromossômicos variaram de 0.5 a 3.0 μm . Os menores cromossomos foram observados em *Pitcairnia sceptrigera* (Fig. 3D), cujo tamanho variou entre 1.5 e 0.5 μm enquanto que a espécie com os maiores cromossomos foi *Tillandsia mollis* (Fig. 4F), com tamanho variando entre 3.0 e 1.3 μm . Em geral, as subfamílias Tillandsioideae e Pitcairnioideae apresentaram os maiores e os menores cromossomos, respectivamente, enquanto as espécies de Bromelioideae apresentaram uma maior diversidade de tamanhos (Tabela 2).

Mesmo a maioria das espécies apresentando um pequeno tamanho cromossômico, em alguns casos, foi possível identificar as constrições secundárias, a fim de refinar a análise da morfologia cromossômica. A presença de um par de constrições secundárias (dado não mostrado) foi visualizada em três espécies de Bromelioideae (*Aechmea ornata*, *Billbergia gigantea* e *B. rosea*), em quatro Pitcairnioideae (*Encholirium spectabile*, *Pitcairnia flammea*, *P. macrochlamys* e *P. sceptrigera*) e em seis Tillandsioideae (*Racinea ropalocarpa*, *T. cyanea*, *T. streptophylla* x *brachycaulos*, *T. stricta*, *T. sp. 6431* e *T. sp. 6509*). Neste último grupo de espécies, a morfologia de alguns pares cromossômicos foi caracterizada como meta ou submetacêntrica, sendo facilitada pelo maior tamanho cromossômico.

A maioria das espécies apresentou cromossomos com tamanhos similares, especialmente os membros de Bromelioideae e Pitcairnioideae (Tabela 2). Em Tillandsioideae algumas espécies analisadas mostraram cromossomos com tamanho decrescente como em *Catopsis morreniana*, *Guzmania monostachia*, *Racinea ropalocarpa*, *Tillandsia erubescens*, *T. streptophylla* x *brachycaulos*, *T. polystachia*, e *T. sp. 9004*. Por outro lado, tamanhos cromossômicos contrastantes dentro de um mesmo complemento cromossômico foram detectados em algumas Tillandsioideae: *Tillandsia argentina*, *T. bourgaei*, *T. brachycaulos*, *T. cyanea* (Fig. 4C), *T. hib. streptophylla* x *brachycaulos* (Fig. 4E),

T. humilis, *T. latifolia*, *T. molis*, *T. ultriculata*, *T. sp.* 6509 (Fig. 5B), *T. sp.* 8809 (Fig. 5D) e *Vriesea splendens* (Fig. 5F), caracterizando neste grupo uma tendência a bimodalidade.

A coloração com AgNO₃ realizada em três espécies revelou o número máximo de quatro nucléolos em *Pitcairnia scepstrigera* (2n=50/100) e apenas dois em *P. undulatosepala* (2n=50/100) e *Tillandsia sp.* 9714 (2n=ca.44).

O bandeamento cromossômico com CMA/DAPI foi realizado em três espécies de Bromelioideae: *Ananas comosus* (Figs. 6A e B), *A. nanus* (Figs. 6C e D) e *Aechmea aquilega* (Figs. 7A e B); em uma Pitcairnioideae: *Puya coerulea* (Figs. 7C e D) e em uma Tillandsioideae: *Tillandsia bourgaei* (Figs. 7E e F). Todas as espécies apresentaram um par de bandas terminais CMA⁺/DAPI. Em *T. bourgaei*, o padrão de bandas CMA⁺ evidenciou heteromorfismo quanto ao tamanho dos blocos no par cromossômico. Visando uma melhor caracterização deste resultado, a técnica de bandeamento C foi realizada confirmando a presença de heteromorfismo (resultado não mostrado).

Discussão

Nas três subfamílias Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae, as principais estruturas dos núcleos interfásicos e o comportamento de condensação foram uniformes (Tabela 2), confirmando a suposição de Gitaí & al. (2005) que, ao considerar estas características, afirmou que a família Bromeliaceae seria um grupo natural.

Devido a essa conservação, algumas características nucleares distintas foram reconhecidas, como uma cromatina difusa com uma clara coloração associada a pequenos cromocentros em Bromelioideae e em Pitcairnioideae, enquanto que em Tillandsioideae, esta cromatina apresentou uma granulação mais difusa e os cromocentros maiores.

A maioria das espécies analisadas apresentou 2n=50 (33 espécies), dentre as quais 25 foram estudadas pela primeira vez. Os resultados apresentam o primeiro relato de contagem cromossômica para representantes de dois gêneros da subfamílias Bromelioideae (*Alcantarea brasiliana* e *Quesnelia arvensis*) e de duas Tillandsioideae (*Racinea ropalocarpa* e *Wherauhia viridifolia*).

Das espécies estudadas com 2n=50, oito foram estudadas anteriormente e os resultados confirmam dados previamente reportados. Este é o caso de *Pitcairnia chiapensis*, *P. scepstrigera*, *T. bourgarej*, *T. mollis* e *T. polysthachia*, analisadas por Brown & Gilmartin (1989) que contaram 25 bivalentes meióticos. Este número também foi relatado para duas espécies de *Ananas* (*A. comosus* e *A. nanus*) e confirmados através de contagem mitótica (Gitaí & al., 2005) e meiótica (Brown & Gilmartin, 1989). Para *Encholirium spectabile*, uma contagem prévia realizada por Cotias-de-Oliveira & al. (2000) em uma população coletada no estado de Bahia (nordeste brasileiro) apresentou o mesmo número aqui relatado (2n=50).

O segundo número mais freqüente no nível diplóide foi $2n=48$, encontrado em 13 espécies, 12 delas pertencentes à subfamília Tillandsioideae (*T. brachycaulos*, *T. cyanea*, *T. humilis*, *T. latifolia*, *T. pohliana*, *T. stricta*, *T. ultriculata*, *T. xiphioides*, *T. sp. 6212*, *T. sp. 6431*, *T. sp. 8809* e *Vriesea splendens*) e em única espécie de Bromelioideae (*Bilbergia pallidiflora*). O referido número foi relatado por outros autores em algumas espécies de Tillandsioideae, como *Guzmania musaica* (Lindl. et Ere) Mez, *G. tricolor* Ruiz et Pav. (Gauthé, 1965) e em *Vriesea splendens* (Brogn.) Lemaire (Weiss, 1965). No caso desta última espécie, a contagem apresentada pelo autor foi confirmada neste estudo para o taxon relacionado *V. splendens* var. *formosa*.

Nas espécies *Tillandsia cyanea*, *T. humilis* e *T. ultriculata*, o complemento cromossômico $2n=48$ diferiu do número $n = 25$ previamente relatado na literatura e baseado em contagens de bivalentes (Brown & al., 1984; Brown & Gilmartin, 1989). Discrepâncias entre contagens mitóticas e meióticas foram reportadas anteriormente por Brown & Gilmartin (1986). Palma-Silva & al. (2004) visualizaram irregularidades meióticas nas espécies de *Vriesea* e *Aechmea* incluindo o pareamento irregular e a observação de univalentes, o que facilitaria a ocorrência de interpretações errôneas quanto ao número de bivalentes, principalmente em espécies que apresentam cromossomos pequenos, como no caso da família Bromeliaceae.

A observação do número $2n=48$ em muitas espécies de Tillandsioideae (especialmente no gênero *Tillandsia*) indica que uma diminuição do número cromossômico através de disploidia possa representar uma importante tendência neste grupo, originando o número básico secundário $x=24$ no nível diplóide nesta subfamília.

O número $2n=ca. 48$ foi encontrado em uma única espécie de Bromelioideae (*Bilbergia pallidiflora*) e representa o primeiro relato deste número para a subfamília. É interessante observar que outros números que diferiram do número básico $x=25$ estiveram relatados para o gênero *Bilbergia*, como $2n=54$, 72 e 108 (Lindschau, 1933; Matsuura & Sutô, 1935; Weiss, 1965). Algumas destas contagens (Lindschau, 1933; Weiss, 1965) foram geradas pela técnica clássica de cortes microtômicos e devem conseqüentemente ser considerados com precaução. Por outro lado, este não é o caso dos resultados apresentados por Matsuura & Sutô (1935) que relataram $2n=54$ para o *B. liboniana* e $2n=108$ para *Bilbergia* sp, o que poderia indicar a existência de disploidia (aliada à poliploidia) neste gênero.

O número $2n=48$ foi encontrado também em outras Bromeliaceae, incluindo membros de Bromelioideae como *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Smith (Lin & al., 1987) e *Bromelia alta* L.B. Smith (Gadella & Kliphuis, 1964); Pitcairnioidade com *Puya chilensis* Molina (Tschischow, 1956) e em espécies do gênero *Guzmania* (Tillandsioideae) discutidas acima. Considerando a existência de um número ainda limitado de espécies de

Bromeliaceae cariologicamente estudadas, podemos supor que a baixa representatividade deste número deverá aumentar à medida que houver um maior número de espécies cariologicamente analisadas.

A espécie do gênero *Bilbergia* aqui estudada (*B. horrida* var. *tigrina*, *B. oaxacana*, *B. pallidiflora* e *B. rosea*) apresentaram $2n=50$, número previamente relatado para o gênero, como a espécie *B. morelii* Brongniart estudada por Cotias-de-Oliveira & al. (2000).

No caso de *Tillandsia* sp. 9714, um número diplóide incomum ($2n=44$) foi observado. O mesmo número ($n=22$) foi observado em *T. complanata* Benth. ssp. *complanata* por Brown & Gilmartin (1989), havendo sido relatados números similares para o gênero, como $n=18$ para *T. umbellata* Ere e $n=20$ para *T. complanata* Benth. (Brown & al., 1984), levando a suposição que surgiram através de disploidia.

A poliploidia foi encontrada em três espécies da subfamília Bromelioideae: *Aechmea eurycorymbus* ($2n=ca. 88$), *Bromelia atiacantha* ($2n=ca.100$) e *Neoglaziovia variegata* ($2n=ca.100$). Considerando os dados do presente estudo e da literatura, a ocorrência de poliploidia prevalece na subfamília Bromelioideae e foi previamente relatada para os gêneros *Ananas* (Collins & Kerns, 1938), *Bilbergia* (Matsuura & Sutô 1935), *Bromelia* (Collins & Kerns, 1931; Lin & al., 1987; Cotias-de-Oliveira & al., 2000; Gitaí & al., 2005), *Deinacathon* (Gitaí & al., 2005), *Lindmania* (Lindschau, 1933; Doutreligne, 1939; Delay, 1947), *Neoglaziovia* e *Orthophytum* (Cotias-de-Oliveira & al., 2000). Nenhum caso de poliploidia foi relatado na literatura para Pitcairnioideae (exceto alguns casos de mixoploidia discutidos posteriormente). Para Tillandsioideae somente três espécies poliplóides foram relatadas com $2n=96$ (*T. juncea* (Ruiz et Pavon) Poiret; *T. juncifolia* Regel e *T. variegata* Schlechtend; estudadas por Lindschau, 1933; Gauthé, 1965 e Weiss, 1965, respectivamente). Brown & Gilmartin (1989) relataram $n=25$ para *T. Juncea*, discordando do resultado observado por Lindschau (1933).

A prevalência de poliploidia em Bromelioideae é consistente com o fato de tratar-se da subfamília mais diversificada (e taxonomicamente complexa) de Bromeliaceae, possuindo também o maior número de gêneros. No caso de alguns gêneros, a poliploidia parece estar associada com a ocupação de circunstâncias ambientais extremas como a vegetação do cerrado brasileiro, as savanas (campos rupestres) e a ocupação do semi-árido, onde alguns membros poliplóides desta subfamília ocorrem, como é o caso, por exemplo, dos gêneros *Bromelia* e *Orthophytum* estudados por Gitaí & al. (2005).

Dois diferentes níveis de ploidia encontrados em células de raízes foram observados em três espécies de *Pitcairnia*: *P. flammea* ($2n=50/100$); *P. scepstrigera* ($2n=50/100$); *P. undulatosepala* ($2n=48/ca. 94$). Avaliações adicionais deverão ser realizadas em outras células meristemáticas a fim de avaliar se este fenômeno está restrito as pontas de raízes ou não. Um evento comparável foi observado por Gitaí & al. (2005) em outra espécie de

Pitcairnioideae (*Deuterocohnia lorentziana*), porém, neste caso, indivíduos morfológicamente indistinguíveis crescendo lado a lado no mesmo vaso apresentavam níveis de ploidia diferentes ($2n=50$ e 150).

A presença de cromossomos B foi observada em duas espécies de *Cryptanthus*, em *C. bahianus* ($2n=34+1-3B$) e em *C. praetextus* ($2n=32+1-2B$). Marchant (1967) realizou uma análise meiótica em *C. Bahianus*, encontrando o número haplóide $n=17$. Posteriormente, Cotias-de-Oliveira & al. (2000) relataram o número cromossômico $2n=34+1-4B$. No caso de *C. praetextus*, Sharma & Gosh (1973) relataram $2n=34$, sem a observação de cromossomos B, sendo este o único relato para a referida espécie. Para *C. marginatus*, aqui estudado pela primeira vez, o número $2n=32$ foi observado sem nenhuma evidência de cromossomos B.

O gênero *Cryptanthus* ocupa supostamente a posição basal dentro da família Bromeliaceae, sendo na maioria das vezes classificado na subfamília Bromelioideae (Kubitzki, 1998; Smith & Till, 1998). Suportados em evidências morfológicas e citológicas alguns autores sugerem que o referido gênero deveria ser posicionado em uma nova subfamília, *Cryptanthioideae* (Brown & Gilmartin, 1987, 1989). O presente estudo confirma o número $2n=34$ para este gênero e também a presença de populações com os cromossomos de B em algumas espécies.

Apesar das dificuldades inerentes as características citológicas de Bromeliaceae, como cromossomos numerosos e o tamanho diminuto, o presente estudo enfatiza algumas novas evidências a respeito do tamanho cromossômico e características gerais do cariótipo. Em geral, os maiores cromossomos foram observados na subfamília Tillandsioideae e os menores em Pitcairnioideae, enquanto que Bromelioideae apresentou alguma diversidade nos tamanhos cromossômicos, quando comparado com as demais subfamílias.

Em Bromelioideae, bem como em Pitcairnioideae, a arquitetura cariotípica foi relativamente uniforme, com cromossomos de tamanhos similares e apresentando tamanho ligeiramente decrescente.

A presença de cariótipos com discreta bimodalidade em Bromeliaceae foi observada no presente estudo em 12 espécies do gênero *Tillandsia*. Esta característica foi também evidenciada em algumas espécies analisadas por outros autores (Marchant, 1967; Brown & Gilmartin 1986; 1989; Gitaí & al., 2005), sendo sua presença mais evidente em Tillandsioideae (gêneros *Tillandsia* e *Vriesea*), embora esta tendência tenha sido também observada em algumas Bromelioideae (Brown & Gilmartin 1986; 1989). Em estudo recente, uma discreta bimodalidade foi observada também em duas espécies de Pitcairnioideae (*Deuterocohnia lorentziana* e *Puya mirabilis*), sugerindo que esta característica provavelmente não é exclusiva para apenas uma subfamília (Gitaí & al., 2005).

A origem dos cariótipos bimodais tem sido discutida e sugere-se que a hibridização entre parentais com cromossomos de tamanho contrastante possa ter originado bimodais,

sugerindo-se ser este o principal mecanismo associado a estes carótipos em plantas superiores (Greilhuber, 1995). Analisando os cromossomos do híbrido intergenérico *Cryptbergia meadii* (= *Cryptanthus beuckeri* E. Morr. X *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel), com $2n=42$, Marchant (1967) reconheceu dois grupos de cromossomos com tamanhos contrastantes e observou que estes apresentaram uma tendência de permanecerem separados durante a meiose. Esta separação era mais evidente durante a segregação cromossômica, pelo fato dos maiores cromossomos migrarem antes dos menores durante a anáfase. Baseado nesta observação, o autor propôs que o número $2n=42$ observado em *Aechmea tillandsioides* (espécie com meiose estável) poderia também ter sido originado através da hibridização entre duas espécies com $2n=34$ e $2n=50$, respectivamente.

Brown & Gilmartin (1989) consideraram que o número $x=17$ (apresentado exclusivamente no gênero *Cryptanthus*) poderia corresponder a um paleotetraploide originado pela hibridização entre os parentais com $x=8$ e $x=9$, números observados freqüentemente em Commelionidae. Um segundo processo de hibridização entre um parental com $x=8$ e uma espécie relacionada a *Cryptanthus* (com $x=17$) originaria o número $x=25$, prevalente para a família. Atualmente a bimodalidade está presente nos membros de todas as três subfamílias, podendo ser considerado uma evidência desta hibridização, considerando-se assim, como uma evidência a favor da teoria apresentada por Brown & Gilmartin (1989). Por outro lado, a ocorrência de disloidias decrescente em alguns gêneros de Bromeliaceae (especialmente nas subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae, como discutido anteriormente) pode ser considerado também como a responsável pela gênese dos baixos números cromossômicos encontrados no gênero *Cryptanthus*.

Uma das espécies analisadas, *Catopsis morreniana*, foi posicionada na subfamília Tillandsioideae, mas as presentes características morfológicas e moleculares indicam que esta deve ser posicionada em uma nova tribo (Catopsidae) dentro de Pitcairnioideae, como sugerido recentemente por Barfuss & al. (2005). Considerando as características cariológicas observadas nesta espécie, com $2n=50$, cromossomos pequenos com tamanhos que variam entre 1.78 e 0.71 μm , e cromatina nos núcleos interfásicos claramente corada, pode-se sugerir que esta espécie seria mais similar às demais Pitcairnioideae analisadas. Contudo, considera-se que estas evidências cariológicas não são conclusivas para propor uma nova classificação.

A coloração com nitrato de prata em núcleos interfásicos revelou um número máximo de dois (*Pitcairnia undulatosepala*) e quatro nucléolos (*P.septigera*), similar aos resultados obtidos por Gitaí & al. (2005) que analisaram duas espécies (*Aechmea bromeliifolia* e *Pitcairnia atrorubens*, ambas com $2n=50$) observando um número máximo de quatro nucléolos na primeira e nos dois na segunda espécie. O bandeamento com fluorocromos realizado em *Aechmea aquilega*, *Ananas comosus*, *A. nanus*, *Puya coerulea* e *Tillandsia*

bourgaei revelou um par cromossômico com bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ (rica em GC) em todas as espécies analisadas. A tríplice coloração com CMA/Actinomicina/DAPI foi utilizada por Gitaí & al. (2005) em três membros de Bromelioideae (*Aechmea bromeliifolia*, *Greigia sphacelata* e *Ochagavia litoralis*) revelando apenas um par de bandas CMA⁺/DAPI⁻ nas últimas duas espécies e dois pares em *A. bromeliifolia*, espécie com cromossomos maiores.

A presença de heteromorfismo foi notada entre cromossomos homólogos das espécies analisadas, mesmo com cromossomos pequenos e numerosos, como no caso de Bromeliaceae. Na espécie *T. bourgaei*, foi apenas possível devido aos diferentes tamanhos de bandas CMA⁺/DAPI⁻ quando comparado aos homólogos. Uma explicação plausível seria a ocorrência de *crossing over* desigual durante a meiose I, evento também observado em outros taxa de monocotiledôneas, como na Iridaceae *Eleutherine bulbosa*, também incluindo uma região CMA⁺ do cromossomo. A observação de cromossomos meióticos e a avaliação da biologia reprodutiva nesta espécie podem trazer as evidências adicionais a respeito da estabilidade deste heteromorfismo e suas possíveis conseqüências para a biologia das espécies.

Considerando o presente estudo e as avaliações prévias (Gitaí & al., 2005) sugere-se que as bandas ricas em GC reveladas pela coloração com fluorocromos correspondem à heterocromatina associada à RON, indicando uma pobreza de heterocromatina em Bromeliaceae e sugerindo que este tipo de seqüência tenha um papel secundário na evolução do grupo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dr^a Maria das Graças Wanderley, pela identificação de algumas espécies e discussões interessantes, ao Dr^o Reginaldo de Carvalho, a Dr^a Katharina Schulte e ao Dr^o Ralf Horres pelas discussões e interessantes indicações da literatura. À Claudete Marques da Silva, agradecemos pela sua ajuda técnica. Agradecemos ao Palmengarten da cidade de Frankfurt, por permitir a coleta do material biológico em suas estufas. Este estudo foi parcialmente suportado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil, Grant no. 478895/2003-8) e pela bolsa de Biologia Molecular cedida pela UNESCO (Nações Unidas Educacionais, Científico e Cultural).

Literatura Citada

- Barfuss, M. H. J., Samuel, R., Till, W. & Stuessy, T. F.** 2005. Phylogenetic relationships in subfamily Tilandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven platid regions. *Amer. J. Bot.* 92: 337--351.
- Benko-Iseppon, AM. & Morawetz, W.** 2000. *Viburnales*---cytological features e a new circumscription. *Taxon* 49: 5--16.
- Brown, G. K. & Gilmartin, A. J.** 1986. Chromosomes of the Bromeliaceae. *Selbyana* 9: 88--93.
- Brown, G. K. & Gilmartin, A. J.** 1987. Bromeliales, related monocots, e resolutionb of relationships among Bromeliaceae subfamilies. *Systematic Botany* 12: 493--500.
- Brown, G. K. & Gilmartin A. J.** 1989. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Amer. J. Bot.* 76: 657--665.
- Brown, G. K., Varadarajan, G. S. & Gilmartin, A. J.** 1984. Bromeliaceae. in: Löve, A. (ed.) *Chromosome numbers reports LXXXV*. *Taxon* 33: 756--760.
- Collins, J. L. & Kerns, K. R.** 1931. Genetic studies in pineapples. I. A preliminary report upon the chromosome number e meiosis in seven pineapples varieties. (*Ananas sativus* Lindl.) e in *Bromelia pinguin* L. *J. Heredity* 225: 139--142.
- Collins, J. L. & Kerns, K. R.** 1938. The origin e breeding characteristics of polyploid pineapples *Ananas comosus* (L.) Merr. *Genetics* 23: 145.
- Cotias-de-Oliveira, A. L. P., Assis, J. G. A., Bellintani, M. C., Erade, J. C. S. & Guedes, M. L. S.** 2000. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Gen. Molec. Biol.* 23: 173--177.
- Cronquist, A.** 1988. *The evolution e classification of flowering plants*. Botanic Garden, New York.
- Crayn, D. M., Winter, K. & Smith, A.** 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism e the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. *PNAS* 101: 3703--3708.
- Delay, C.** 1947. Recherches sur la structure des noyaux quiescences chez les Panérogames. *Rev. Cytol. et Cytophysiol. Vég.* 9, 1--4: 169--222; 10, 1-4: 103--229.

- Deumling, B. & Greilhuber, J.** 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs e fluorochrome being. *Chromosoma* 84: 535--555.
- Doutreligne, J.** 1939. Les divers types de structure nucléaire et de mitose somatique chez les Phanerógames. *Cellule* 2: 191--212.
- Gadella, T. W. J. & Kliphuis, E.** 1964. Chromosome numbers of some flowering plants collected in Surinam. *Acta Bot. Neerleica* 3: 432--433.
- Gauthé, J.** 1965. Contribution a l'étude caryologique des Tillesiées. *Mém. du Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot* 1: 39--59.
- Gitaí, J., Horres, R. & Benko-Iseppon AM.** 2005. Chromosome features e evolution of Bromeliaceae. *Plant Syst. Evol.* 253: 65--80.
- Givnish, T. J., Millam, K. C., Evans, M., Hall, J. C., Pires, J. C., Berry, P. E. & Systma, K. J.** 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny e South American-African disjunctions in Rapateaceae e Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *Int. J. Plant Sci.* 165: 35--54.
- Guerra, M.** 1983. O uso de Giemsa na citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o beeamento. *Ciên. e Cult.* 35: 190--193.
- Greilhuber, J.** 1995. Chromosomes of the monocotyledons (General aspects). Pp. 379--414 in: Cribb, P.J., Cutler, D.F. & Humphries, C. J.(Eds.), *Monocotyledons: Systematics e Evolution*, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hizume, M., Sato, S. & Tanaka, A.** 1980. A highly reproducible method for nucleolus organizing regions staining in plants. *Stain Technol.* 55: 87--90.
- Kubitzki, K.** 1998. *The families e genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons. Alismatanae e Commelinanae (except gramineae)*. Spring Verlag, Berlim.
- Lin, B. V., Ritschel, P. S. & Ferreira, F. R.** 1987. Número cromossômico de exemplares da família Bromeliaceae. *Rev. Bras. Frutic.* 9: 49--55
- Lindschau, M.** 1933. Beiträge zur Zytologie der Bromeliaceae. *Planta* 3: 506--530.
- Macwillians, E.** 1974. Chromosome number e evolution. In: Smith L., Downs J. (eds.) *Flora Neotropica Monographs (Pticairnioideae)* 14: 33--39.
- Marchant, C. J.** 1967. Chromosome evolution in the Bromeliaceae. *Kew Bull.* 21: 161--168.

- Matsuura, H. & Sutô, H.** 1935. Contributions to the idiogram study in phanerogamous plants. I. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. 5*: 33--75.
- Palma-Silva, C., Santos, D. G., Kaltchuk-Santos, E. & Bordanese-Zaettini, M. H.** 2004. Chromosome numbers, meiotic behavior, e pollen viability of species of *Vriesea* e *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Gree do Sul, Brasil. *Amer. J. Bot.* 91: 804--807.
- Schwarzacher, T., Ambros, P. & Schweizer, D.** 1980. Application of Giemsa being to orchid Cariótipo analysis. *Plant Syst. Evol.* 134: 293--297.
- Sharma, A. K. & Gosh, I.** 1973. Cytotaxonomy of the family Bromeliaceae. *Cytologia* 36: 237--247.
- Smith, L. B & Till, W.** 1998. The families e genera of vascular plants. Pp. 74--99 in: Kubitzki, K. (ed.), *Bromeliaceae*. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Schweizer, D.** 1976. Reverse fluorescent chromosome being with chromomycin e DAPI. *Chromosoma* 58: 307--324.
- Tschischow, N.T.** 1956. Número de cromosomas de algunas plantas chilenas. *Bol. Soc. Biol. Concepción* 31: 145--147
- Weiss, H. E.** 1965. Étude caryologique et cyto-taxonomique de quelques Broméliaceés. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot.* 1: 9--38.

Tabela 1. Lista de espécies analisadas incluindo procedência, números de coletor e de exsicata, números cromossômicos (dados presentes e estudos prévios) e referências. Identificações taxonômicas seguidas por “*” estão sendo avaliadas taxonomicamente pelo Prof. G. Zizka, Frankfurt.

Taxon	Procedência, coletor e números de exsicata	Números cromossômicos		Referências
		Presente estudo	Estudos prévios	
Bromelioideae				
<i>Aechmea aquilega</i> (Salisbury) Grisebach	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16872.	2n=50	—	Cotias-de-Oliveira & al. 2000;
<i>A. barleei</i> Baker	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 21586.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>A. caudata</i> Lindman var. <i>caudata</i>	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16872.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>A. eurycorymbus</i> Harms	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16942.	2n=ca.88	—	Primeiro estudo
<i>A. fendleri</i> Ere ex Mez	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 14217.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>A. ornata</i> Baker	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. 9816929-0	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Alcantarea brasiliiana</i> (L.B.Smith) J.R.Grant	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. F001	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrel	Cultivado, Recife, Pernambuco, Brasil, mercado local, Benko-Iseppon, A.M. Nr. BRO-1246	2n=50	2n=48 ^a , 50 ^{a,b} , 75 ^{a,b} , 100 ^b , n=25 ^c	^a Lin & al., 1987; ^b Collins & Kerns, 1931, 1935, 1936, 1938; ^c Brown & Gilmartin, 1989; Gitai & al., 2005
<i>A. nanus</i> (L.B. Smith.) L.B. Smith.	Cultivado, Recife, Pernambuco, Brasil, Campus UFPE; Gitai, J., BRO-001.	2n=50	2n=50 ^a	Gitai & al., 2005
<i>Bilbergia gigantea</i> *	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 19145.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>B. horrida</i> Regel var. <i>tigrina</i> Hort. ex Baker	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16800.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>B. oaxacana</i>	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. (open).	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>B. pallidiflora</i> Liebmann	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16810.	2n=ca.48	—	Primeiro estudo
<i>B. rosea</i> Hortus ex Beer	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16813.	2n=ca.50	—	Primeiro estudo
<i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni	Nativo, Sao Paulo, Brasil Leg. Nr. Bro-003.	2n=ca. 100	—	Primeiro estudo
<i>Canistrum lindenii</i> (Regel) Mez	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 16988.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Cryptanthus bahianus</i> L.B.Smith	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. F008.	2n=34+1-3B	2n=34+1-4b ^a , n=17 ^b	^a Cotias-de-Oliveira & al. 2000; ^b Marchant 1967
<i>C. marginatus</i> L.B.Smith	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 14242.	2n=32	—	Primeiro estudo
<i>C. praetextus</i> E.Morren ex Baker	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 15191.	2n=ca. 32+1-2B	2n=34	Sharma & Gosh 1973
<i>Neoglaziovia variegata</i> (Arruda da Camara) Mez	Nativo, Camocim de São Félix, Pernambuco, Brasil, Bro-1121.	2n=100	2n=100	Cotias-de-Oliveira & al. 2000
<i>Portea petropolitana</i> L.B. Smith	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 1800.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Quesnelia arvensis</i> (Vellozo) Mez	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. ZG 245100.	2n=50	—	Primeiro estudo
Pitcairnioideae				
<i>Encholirium spectabile</i> Martius ex Schultes f.	Nativo, Petrolina, Pernambuco, Brasil, Leg. Bro-1304.	2n=50	50	Cotias-de-Oliveira & al. 2000
<i>Pitcairnia chiapensis</i> Mirea	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 19495.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>P. flammea</i> Lindley	Nativo, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil, Leg. Nr. Bro-1413.	2n=50/ca.100	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>P. macrochlamys</i> Mez	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 12596.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>P. sceptrigera</i> Mez	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. F009.	2n=50/ca.100	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>P. undulatosepala</i> L.B. Smith	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. 52598.	2n=48/ca.94	—	Primeiro estudo
<i>Puya coerulea</i> Lindley	Cultivado, Alemanha, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Leg. Nr. F012.	2n=50	—	Primeiro estudo

Tabela 1 (continuação).

Taxon	Procedência, colector e números de excicata	Números cromossômicos		Autor
		Presente estudo	Estudos prévios	
Tillandsioideae				
<i>Catopsis morreniana</i> Mez	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 2891. Originalmente coletado no México.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Guzmania monostachia</i> var. <i>variegata</i> Hort. ex Nash	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 1502.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Racinea ropaloca.rpa</i> (Eré) M.A.Spencer & L.B. Smith	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 2652.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>Tillandsia argentina</i> C.H. Wright	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 6322.	2n=ca.50	—	Primeiro estudo
<i>T. bourgaei</i> Baker	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 9962.	2n=50	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>T. brachycaulos</i> Schlechtendal	Cultivado, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Alemanha, Leg. Nr. AD 158/01.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>T. cyanea</i> Linden ex K.Koch	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 12612.	2n=48	n=25	Brown & al., 1984
<i>T. erubescens</i> Schlechtendal	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 12596. Originalmente coletado no México.	2n=ca.78	—	Primeiro estudo
<i>T. humilis</i> Presl.	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 867.	2n=ca.48	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>T. lajensis</i> Ere	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 1435.	2n=ca.50	—	Primeiro estudo
<i>T. latifolia</i> Meyen	Cultivado, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Alemanha, Leg. Nr. 6263.	2n=ca.48	—	Primeiro estudo
<i>T. mollis</i> H.Hromadnik & W.Till	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 872.	2n=50	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>T. pohliana</i> Mez	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 2046.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>T. polystachia</i> (L.) L.	Nativo, Reserva do IPA, Caruaru, Pernambuco, Brasil, Leg. Nr. Bro-1287.	2n=50	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>T. streptophylla</i> Scheidweiler ex E. Morren x <i>T. brachycaulos</i> Schlechtendal	Cultivado, Jardim Botânico da Universidade de Leipzig, Alemanha, Leg. Nr. AD 216/01.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>T. sp.</i> 6212*	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 6212.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>T. sp.</i> 6431*	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 6431.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>T. sp.</i> 6509*	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 6509.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>T. sp.</i> 8809*	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 8809.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>T. sp.</i> 9004*	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 9004.	2n=50	—	Primeiro estudo
<i>T. sp.</i> 9714*	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 9714.	2n=ca.44	—	Primeiro estudo
<i>T. stricta</i> var. <i>stricta</i> Soleer ex Sims	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 1481.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>T. utriculata</i> Linnaeus	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 2786. Originalmente coletado Guatemala.	2n=48	n=25	Brown & Gilmartin, 1989
<i>T. xiphioides</i> Ker-Gawler	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 8473.	2n=48	—	Primeiro estudo
<i>Vriesea splendens</i> var. <i>formosa</i> Suringar ex Witte	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 10796.	2n=48	2n=48	Weiss, 1965
<i>Werauhia viridiflora</i> (Regel)	Cultivado, Palmengarten da cidade de Frankfurt, Alemanha, Leg. Nr. 10757.	2n=ca.50	—	Primeiro estudo

Tabela 2. Características citogenéticas de Bromeliaceae analisadas com coloração convencional, fluorocromos (CMA/DAPI) e AgNO₃.

Taxon	2n	Tamanho crom.(µm)	Cromocentros dos Núcleos Interfásicos		Número de Pares Cromossômicos com Bandas CMA+/DAPI-Terminais	Número Máx. de Nucléolos após Coloração com AgNO ₃	Arquitetura Cariotípica
			Forma	Distribuição			
BROMELIOIDEAE							
<i>Aechmea aquilega</i>	50	1,78-0,71	Pequenos, esferóides	Regular	1	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>A. barleei</i>	50	2.24-0.71	Pequenos, esferóides	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>A. caudata</i>	50	1.78-0.17	Pequenos, esferóides	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>A. eurycorymbus</i>	ca.88	1.92-0.76	Pequenos, esferóides	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>A. fendleri</i>	50	1.78-0.17	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>A. ornata</i>	50	1.25-0.71	Pequenos, esferóides	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Alcantarea brasiliana</i>	50	1.71-0.86	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Ananas comosus</i>	50	1.38-0.83	Pequenos, maioria esferóides	Regular	1	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>A. nanus</i>	50	1.60-1.10	Pequenos, esferóides a puntiformes	Regular	1	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Billbergia horrida</i> var. <i>tigrina</i>	50	2.14-0.17	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>B. gigantea</i>	50	2.14-0.89	Pequenos esferóides ou bastoniformes	Irregular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>B. oaxacana</i>	50	1.78-0.71	Pequenos, esferóides a puntiformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>B. pallidiflora</i>	48	1.78-0.71	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>B. rosea</i>	ca.50	2.50-0.71	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Irregular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Bromelia antiacantha</i>	ca.100	1.07-0.53	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Irregular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Canistrum lindenii</i>	50	2.14-1.07	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Irregular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Cryptanthus bahianus</i>	34+1-3B	1.78-0.71	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>C. marginatus</i>	32	1.78-0.17	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Irregular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>C. praetextus</i>	ca.32+1-2B	1.96-1.07	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Irregular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Neoglaziovia variegata</i>	100	2.24-0.71	Pequenos esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Portea petropolitana</i>	50	1.75-0.75	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Quesnelia arvensis</i>	50	2.14-0.71	Pequenos, puntiformes a bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
PITCAIRNOIDEAE							
<i>Encholirium spectabile</i>	50	1.25-1.00	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Polarizado	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Pitcairnia chiapensis</i>	50	1.50-0.75	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>P. flammea</i>	50/ca.100	1.25-0.75	Pequenos, esferóides ou filamentosos	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>P. macrochlamys</i>	50	1,75-1,00	Pequenos, esferóides ou filamentosos	Regular	—	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>P. sceptrigera</i>	50/ca.100	1.50-0.50	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	4	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>P. undulatosepala</i>	48/ca.94	1.50-0.75	Pequenos, esferóides a puntiformes	Regular	—	2	Cromossomos com tamanho ± homogêneo
<i>Puya coerulea</i>	50	1.50-0.75	Pequenos, esferóides a puntiformes	Polarizado	1	—	Cromossomos com tamanho ± homogêneo

Tabela 2. (continuação).

Taxon	2n	Tamanho crom.(µm)	Cromocentros dos Núcleos Interfásicos		Número de Pares Cromossômicos com Bandas CMA+/DAPI- Terminais	Número Máx. de Nucléolos após Coloração com AgNO ₃	Arquitetura Cariotípica
			Forma	Distribuição			
TILLANDSIOIDAE							
<i>Catopsis morreniana</i>	50	1.78-0.71	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	tamanho decrescente
<i>Guzmania monostachia</i> var. <i>variegata</i>	50	1.75-1.25	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>Racinaea ropalocarpa</i> (= <i>Tillandsia ropalocarpa</i>)	50	2,00-1,00	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>Tillandsia argentina</i>	ca.50	1.50-0.50	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Irregular	—	—	bimodal (6 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. bourgaei</i>	50	2.50-1.07	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Irregular	1	—	bimodal (6 pequenos e 19 pares grandes)
<i>T. brachycaulos</i>	48	2.50-1.23	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Irregular	—	—	bimodal (6 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. cyanea</i>	48	3.00-1.25	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Irregular	—	—	bimodal (6 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. erubescens</i> (= <i>T. benthamiana</i>)	ca.78	2.00-1.00	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Irregular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>T. hib. streptophylla</i> x <i>brachycaulos</i>	50	2.00-1.00	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (7 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. humilis</i>	ca.48	2.50-1.23	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (6 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. lajensis</i> (= <i>T. arcuans</i>)	ca.50	1.50-0.75	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	tamanho decrescente
<i>T. latifolia</i>	ca.48	2.50-1.25	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (6 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. mollis</i>	50	3.00-1.30	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (7 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. pohliana</i>	48	1.17-0.86	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>T. polystachia</i>	50	1.50-0.75	Pequeno, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	tamanho decrescente
<i>T. sp. 6212</i>	48	2.00-1.00	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>T. sp. 6431</i>	48	2.00-1.25	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>T. sp. 6509</i>	50	2.00-1.00	Pequenos, esferóides ou bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (6 pequenos e 19 pares grandes)
<i>T. sp. 8809</i>	48	1.75-0.75	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (10 pequenos e 14 pares grandes)
<i>T. sp. 9004</i>	50	2.60-1.07	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>T. sp. 9714</i>	ca.44	2.00-1.00	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	2	tamanho decrescente
<i>T. stricta</i> var. <i>stricta</i>	48	2.50-1.00	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>T. utriculata</i>	48	2.50-1.30	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (6 pequenos e 18 pares grandes)
<i>T. xiphioides</i>	48	2.40-1.07	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo
<i>Vriesea splendens</i> var. <i>formosa</i>	48	2.50-1.20	Grande, filamentosos ou bastoniformes	Regular	—	—	bimodal (7 pequenos e 17 pares grandes)
<i>Werauhia viridiflora</i> (= <i>Vriesea viridiflora</i>)	ca.50	1.75-1.25	Grande, esferóides a bastoniformes	Regular	—	—	± tamanho homogêneo

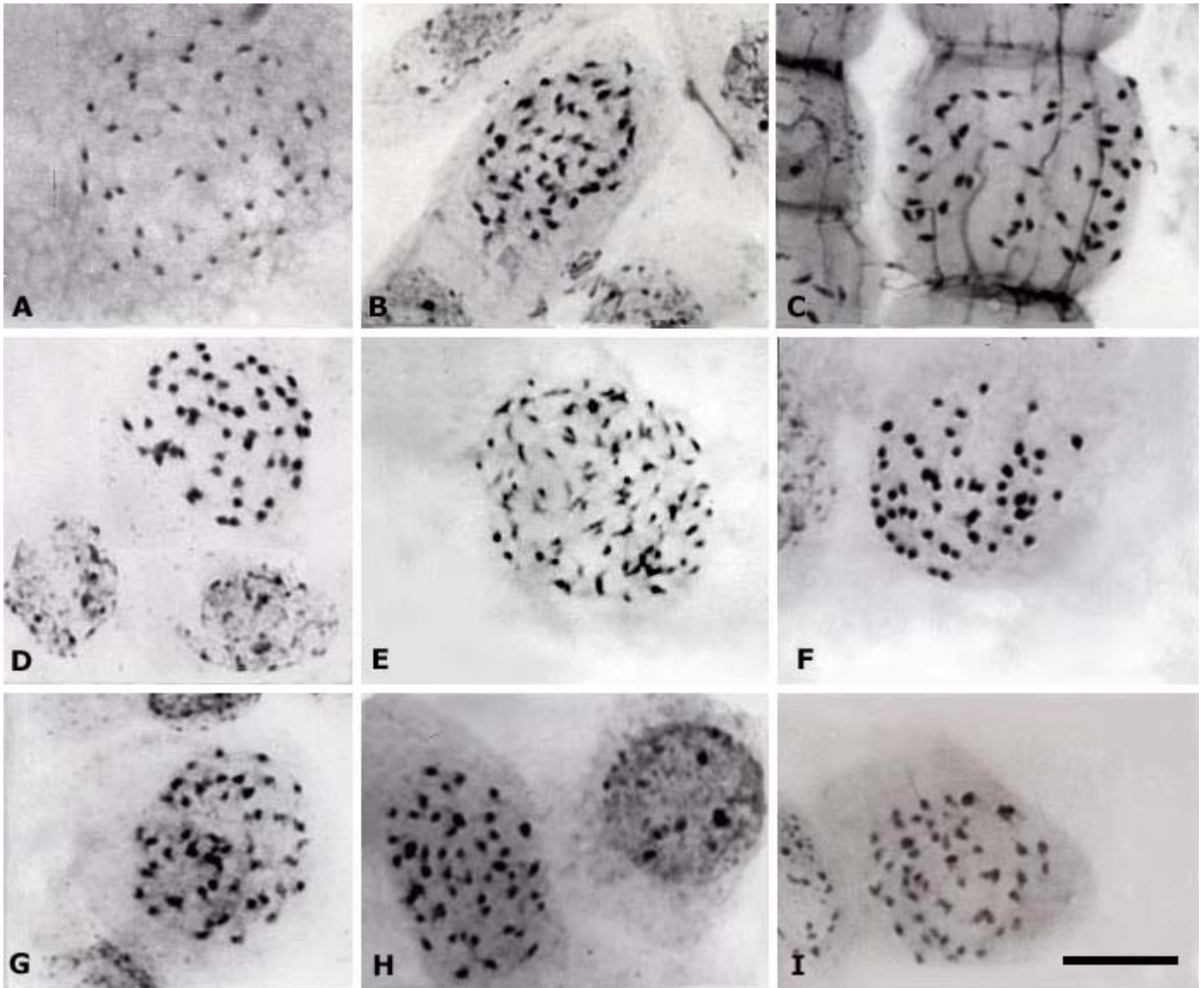


Figura 1. Cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos de algumas espécies de Bromelioideae. **A.** *Aechmea barleei*; **B.** *A. caudata*; **C.** *A. fendleri*; **D.** *A. ornata*; **E.** *A. eurycorymbus*; **F.** *Billbergia gigantea*; **G.** *B. horrida* var. *tigrina*; **H.** *B. oaxacana* e **I.** *B. rosea*. Todos com $2n=50$, exceto em **E**, $2n=ca88$. Barra (em **I**) corresponde a $10\ \mu\text{m}$.

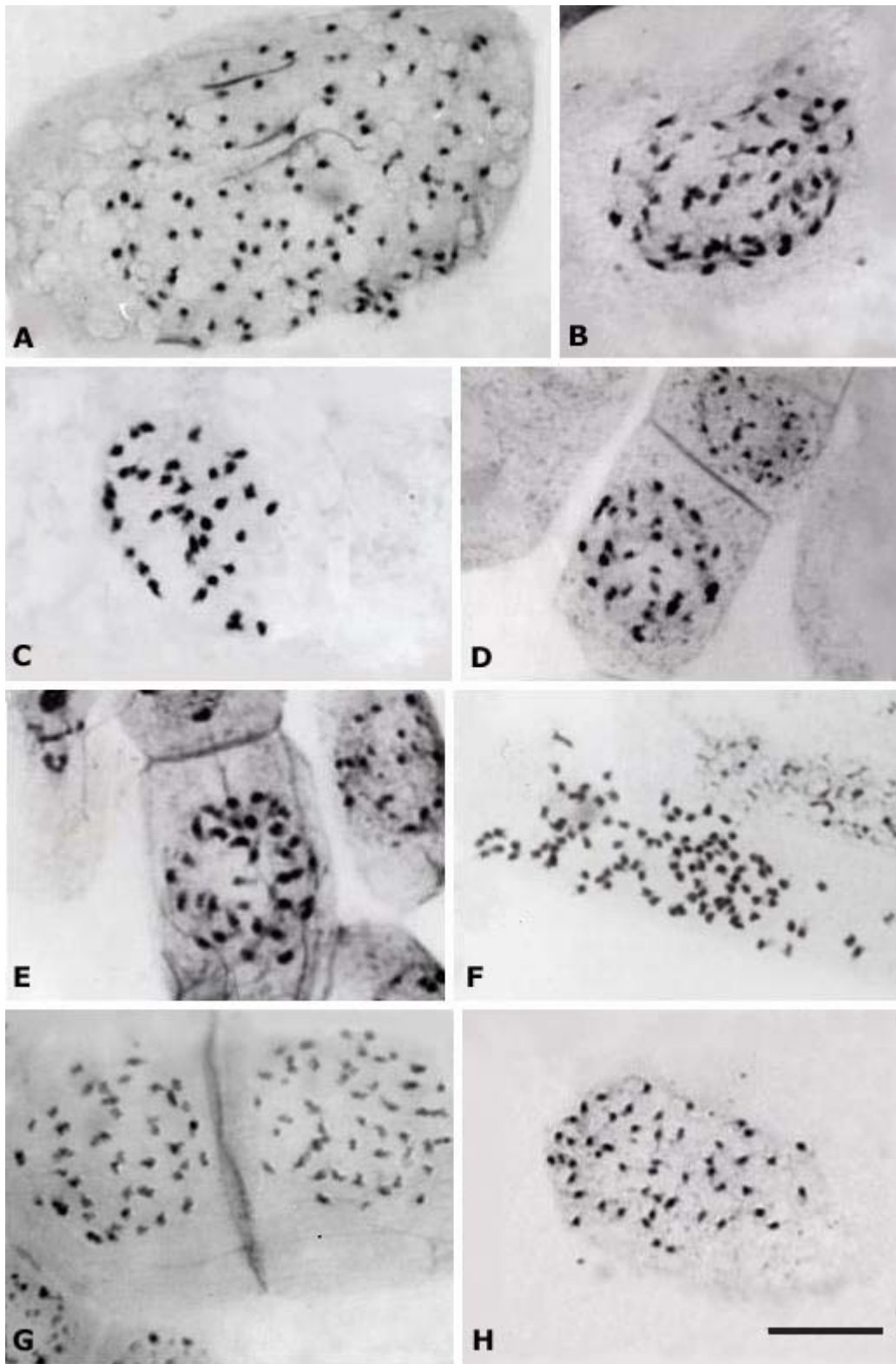


Figura 2. Cromossomos mitóticos de algumas espécies de Bromelioideae. **A.** *Bromelia antiacantha*; **B.** *Canistrum lindenii*; **C.** *Cryptanthus bahianus*; **D.** *C. marginatus*; **E.** *C. praetextus*; **F.** *Neoglaziovia variegata*; **G.** *Portea petropolitana* e **H.** *Quesnelia arvensis*. Barra (em **H**) corresponde a 10 μm .

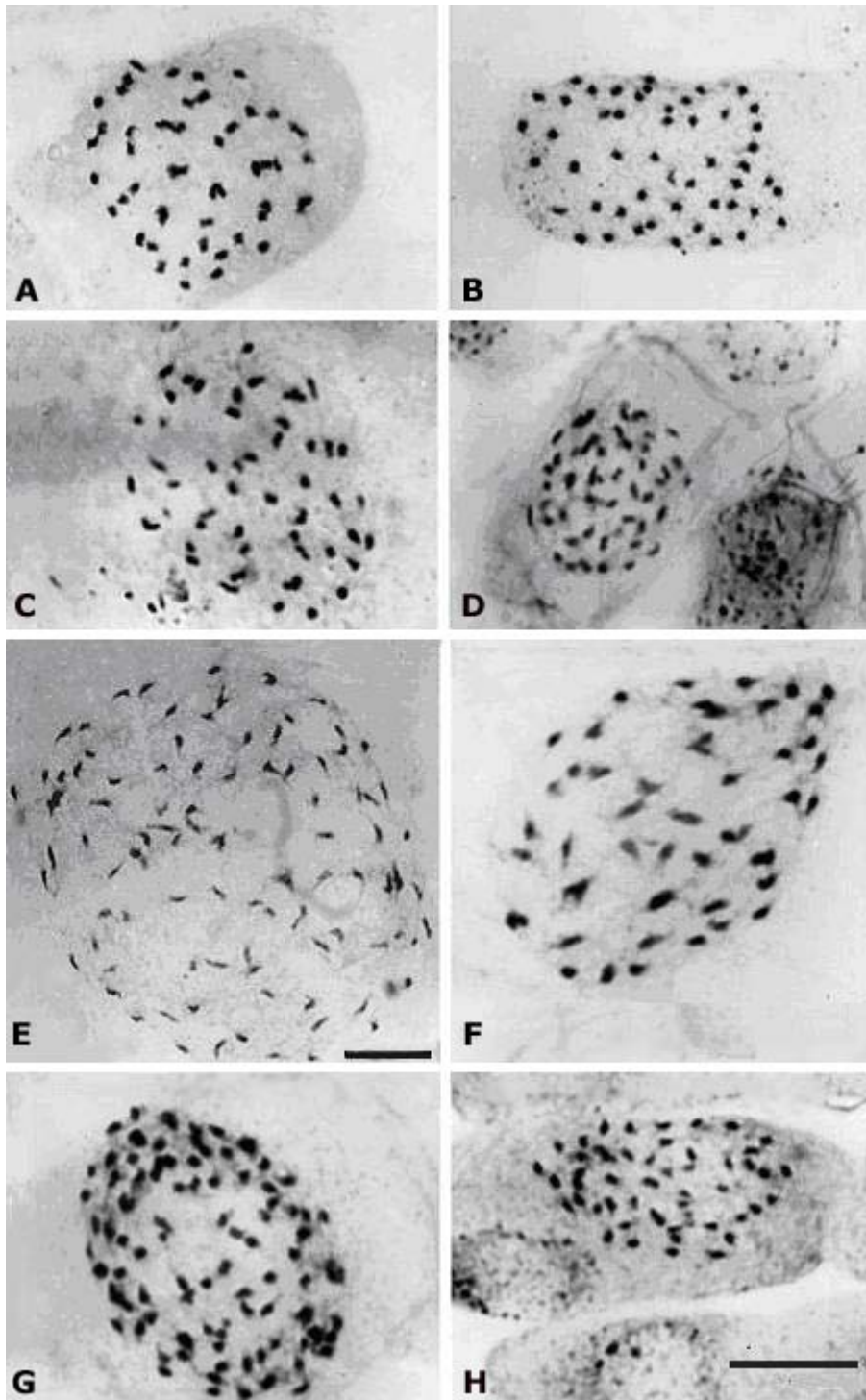


Figura 3. Cromossomos mitóticos de algumas espécies de Pitcairnioideae. **A.** *Encholirium spectabile*; **B.** *Pitcairnia flammea*; **C.** *P. macrochylamys*; **D-E** *P. sceptrigera*; **F-G** *P. undulatosepala* e **H.** *Puya coerulea*. Barra (em H para A-G e em E) corresponde a 10 μm .

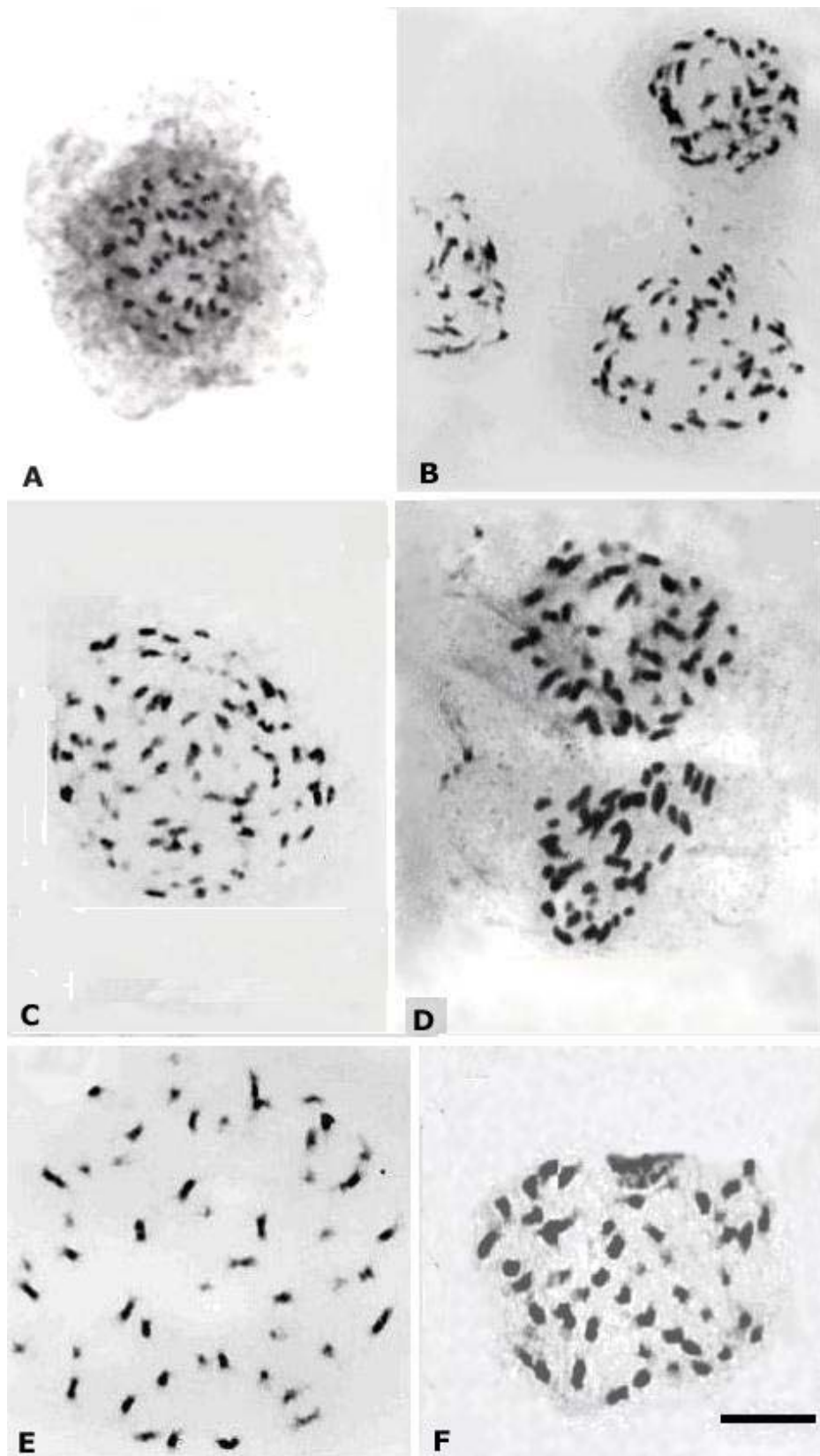


Figura 4. Cromossomos mitóticos de algumas espécies de Tillandsioideae. **A.** *Catopsis morreniana*; **B.** *Guzmania monostachia* var. *variegata*; **C.** *T. cyanea*; **D.** *T. erubescens*; **E.** *T. hib. streptophylla* x *brachycaulos* e **F.** *T. mollis*. Barra (em F) corresponde a 10 μ m.

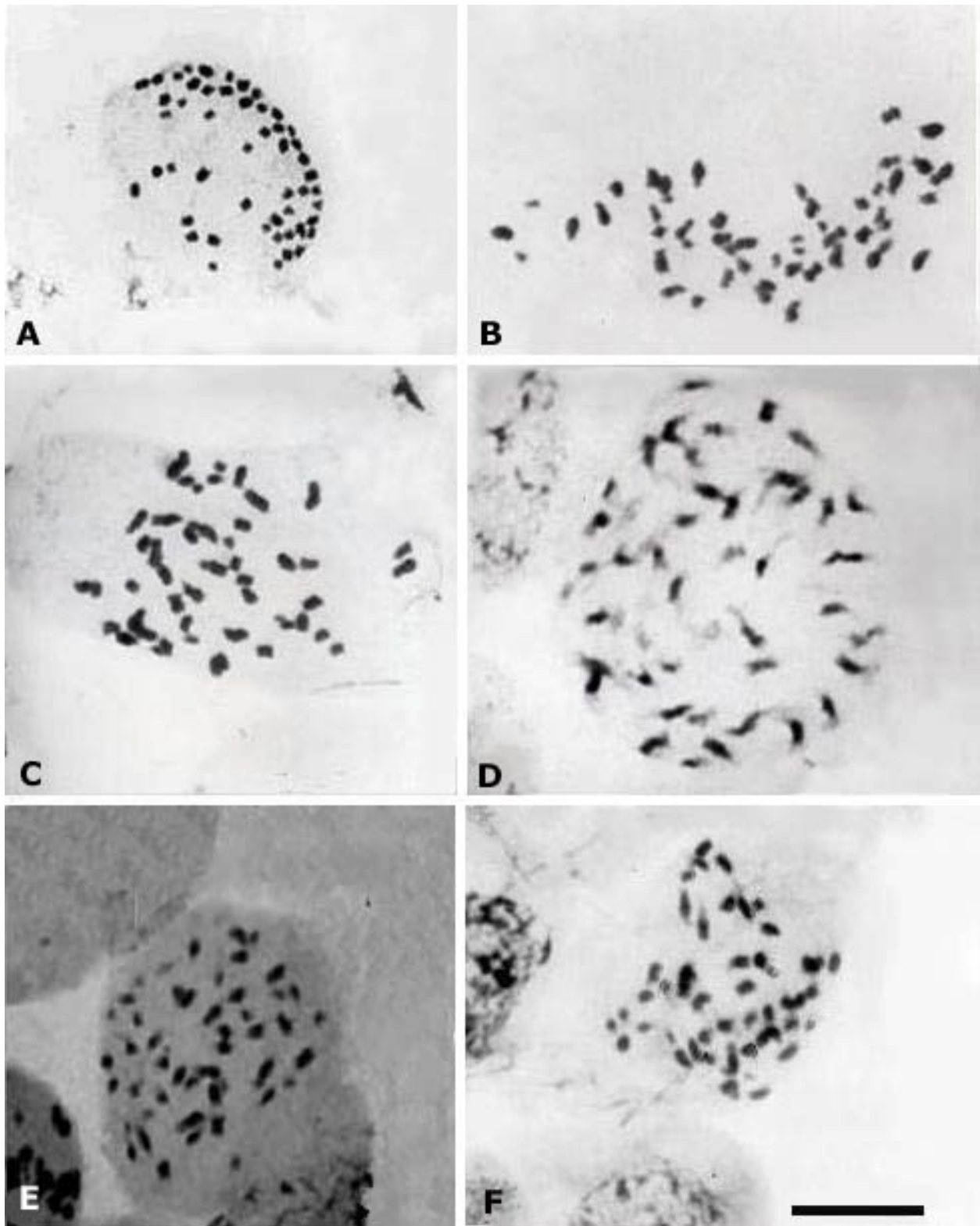


Figura 5. Cromossomos mitóticos de algumas espécies de Tillandsioideae. **A.** *Tillandsia polystachia*; **B.** *T.* sp. 6509; **C.** *T.* sp. 8750; **D.** *T.* sp. 8809; **E.** *T.* sp. 9004 e **F.** *Vriesea splendens* var. *formosa*. Barra (em **F**) corresponde a 10 μ m.

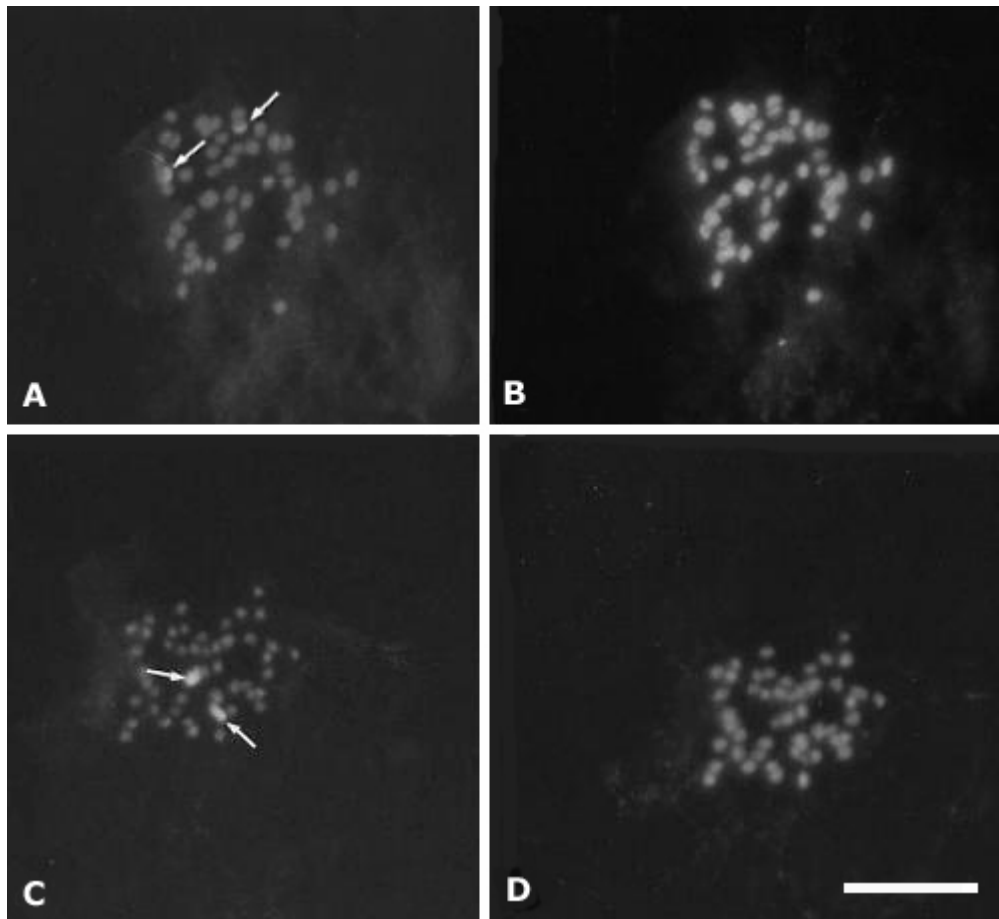


Figura 6. Cromossomos metafásicos de Bromeliaceae após coloração com fluorocromos CMA₃. (A e C) e DAPI (B e D). **A-B** *Ananas comosus*; **C-D** *A. nanus*. Barra (em **D**) corresponde a 10 µm.

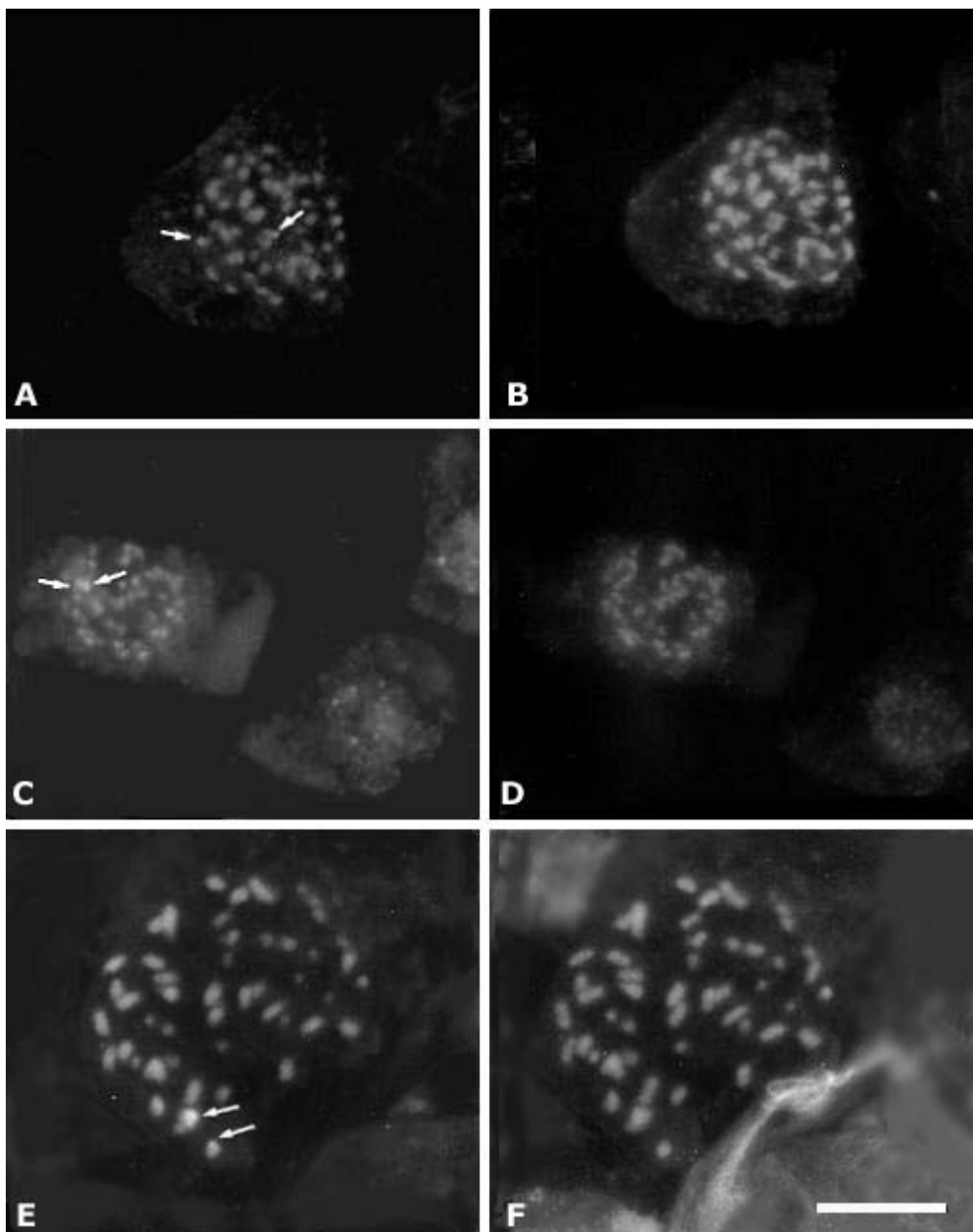


Figura 7. Cromossomos metafásicos de Bromeliaceae após coloração com fluorocromos CMA₃ (A, C, E) e DAPI (B, D, F). **A-B** *Aechmea aquilega*; **C-D** *Puya coerulea*; **E-F** *Tillandsia Bourgarei*. Barra (em F) corresponde a 10 µm.

4.2 Relações filogenéticas entre membros do subgênero *Ortgiesia* (gênero *Aechmea*, Bromeliaceae) com base em marcadores AFLP

Trabalho a ser submetido à revista **Plant Systematics and Evolution**.

Relações filogenéticas entre membros do subgênero *Ortgiesia* (subgênero *Aechmea*, Bromeliaceae) com base em marcadores AFLP

A ser submetido ao periódico *Plant Systematics and Evolution*

J. Gitaí¹, K. Schulte², A.-M. Benko-Iseppon¹ e G. Zizka²

¹Laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Botânica e Evolução Molecular, Instituto de Pesquisa Senckenberg & Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt am Main, Alemanha.

Abstract

O gênero *Aechmea* pertence à subfamília Bromelioideae (família Bromeliaceae) e compreende cerca de 220 espécies. Apresenta-se distribuído principalmente no Brasil, com ênfase na Mata Atlântica e no estado do Amazonas, apresentando ambas as formas, terrestre e epifítica. A delimitação infragenérica deste gênero é ainda controversa, havendo necessidade de informações adicionais. Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foram usados para caracterizar 40 membros do subgênero *Ortgiesia* de *Aechmea*. Múltiplas árvores de máxima parcimônia foram combinadas para formar uma árvore consenso. Os níveis de sustentação para as espécies foram testados através de 1000 réplicas de *bootstrap*. Os dendrogramas foram gerados usando a opção de UPGMA de NTSYS-PC, revelando um clado basal incluindo as espécies do complexo *A. cândida* - *A. coelestris* (composto por quatro entidades taxonômicas relacionadas), do qual dois clados distintos emergiram, dando forma aos subgrupos das espécies parcialmente consistentes com as evidências fitogeográficas e taxonômicas previamente conhecidas. Os resultados gerados são discutidos e comparados a informações taxonômicas e fitogeográficas existentes.

Palavras chave: Bromelioideae, *Aechmea*, *Ortgiesia*, Polimorfismo de DNA.

Introdução

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente entre 2.000 a 3000 espécies e 56 gêneros distribuídos em três subfamílias; Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae. A subfamília Bromelioideae é a maior com 31 gêneros e 724 espécies (Cronquist 1988; Kubitzki 1998).

O número básico $x=25$ é reconhecido em Bromeliaceae, havendo uma dominância do número cromossômico $2n=50$. Postula-se que a família tenha sido derivada através de hibridização e disploidia dos ancestrais do complexo Zingiberiflorae-Commeliniflorae (Gilmartin e Brown 1987; Brown e Gilmartin 1989). Considerando os dados existentes (por exemplo, Brown e Gilmartin 1989; Gitaí et al. 2005) espécies do gênero *Aechmea* são principalmente diplóides, com a maioria das espécies apresentando $2n=50$.

O gênero *Aechmea* pertence à subfamília Bromelioideae e estima-se que inclua 222 espécies. Sua distribuição predomina nas regiões de Mata Atlântica e Amazônica, incluindo formas de vida epifítica e terrestre, cobrindo uma área geográfica do México central à costa brasileira e até o sul da Argentina (Benzing 2000).

A delimitação infragenérica do gênero é ainda controversa, fazendo-se necessárias informações adicionais que apoiem questões sistemáticas, evolutivas e ecológicas (Wendt 1997; Benzing 2000). Apesar das controvérsias sobre o relacionamento infragenérico, a maioria dos autores concorda que o gênero é monofilético, especialmente com base em estudos com diferentes seqüências de DNA (Barfuss et al. 2005; Crayn et al. 2004; Givnish et al. 2004; Terry et al. 1997).

Um estudo realizado por Proença e Sajo (2004) avaliou a anatomia foliar em oito espécies de *Aechmea*, incluindo os representantes dos subgêneros *Ortgiesia*, *Macrochordion*, *Pothuava* e *Platyaechmea*, levando à conclusão que as características geradas são informativas para apoiar a delimitação em nível de subgênero, com exceção de poucos casos, foi possível uma delimitação clara entre as espécies com os caracteres gerados.

Souza et al. (1997) realizaram análises da morfologia polínica de dez espécies de *Aechmea*, confirmando a diversidade do gênero, reforçando a classificação proposta para subgêneros e enfatizando o subgênero *Aechmea* como um táxon artificial por apresentar maiores diferenças nos padrões de inflorescência e caracteres florais, como também nos padrões da morfologia polínica bastante heterogênea.

Espécies do gênero *Aechmea*, assim como os seus híbridos, estão entre as bromeliáceas mais cultivadas para comercialização como plantas ornamentais. Estima-se que *A. fasciata*

(Lindl.) Baker tenha sido introduzida na Europa em 1826. Desde então, muitas outras espécies do gênero têm sido comercializadas, sendo muitas delas atualmente cultivadas em diferentes países. Crescem em nível do mar até altas montanhas. Desenvolvem-se ao sol, sombras, rochas, árvores e, o que é melhor, em casas, jardins e em estufas por todo o mundo. A maioria é cultivada devido às suas inflorescências vistosas, mas algumas apresentam folhas coloridas que aumentam seu valor ornamental, mesmo quando estas não florescem. Nos Estados Unidos espécies do gênero têm sido cultivadas na Califórnia, na Flórida e no Havaí. Considerando apenas o estado da Flórida, o mercado de comércio de bromélias é estimado em 20 milhões de dólares/ano (Cathcart, 1995).

A técnica de AFLP é mais laboriosa que o método de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), contudo é também considerada como mais confiável, devido à sua reprodutibilidade e por detectar um maior número de polimorfismos em uma única corrida. Apesar da inabilidade em distinguir heterozigotos de homozigotos, devido à sua característica dominante (marcador binário onde se detecta apenas presença e ausência da característica), Gerber et al. (2000) sugeriram que o elevado número de loci polimórficos revelados pelo método de AFLP contrabalançam a perda de informação resultante da dominância, enquanto Garcia-Mas et al. (2000) mostraram que a técnica possui uma maior eficiência em detectar polimorfismos do que os marcadores de RAPD ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Também se sabe que a técnica possui custo inicial mais baixo e é mais transferível entre espécies do que outros tipos de marcadores (Zimnoch-Guzowska et al., 2000).

O presente estudo visa contribuir para o conhecimento da taxonomia e evolução do subgênero *Ortgiesia*, do gênero controverso *Aechmea*, usando marcadores moleculares de AFLP, comparando os resultados àqueles da literatura, contribuindo para uma melhor visão e compreensão de sua evolução.

Materiais e Métodos

Material Vegetal e Extração de DNA

O material vegetal para a extração do DNA genômico das espécies do gênero *Aechmea* foi obtido nas coleções vivas sob cultivo no Palmengarten, Frankfurt/Main e no Jardim Botânico da Universidade de Heidelberg (Tabela 1). O procedimento de extração seguiu o protocolo de Doyle e Doyle (1987; 1990), usando-se folhas liofilizadas a frio e secas em câmara de vácuo. As

concentrações do DNA extraído foram estimadas por eletroforese comparativamente a padrões conhecidos.

Procedimentos para AFLP

Um total de 60 a 65 ng do DNA genômico foi digerido com *MseI* e *HindIII* em um volume total de 10 µL. Os adaptadores foram ligados com a T4-DNA-Ligase aos fragmentos de restrição em um volume final de 30 µL. A amplificação por PCR com os primers contendo três (+3) nucleotídeos seletivos em sua extremidade 3' foi realizada em um Eppendorf Mastercycler, seguindo essencialmente as instruções do fabricante.

Para a pré-amplificação, um décimo da alíquota da restrição-ligação foi usada como um molde usando-se primers desenhados para as regiões *MseI+C/HindIII+A*. A eficiência da pré-amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo verificada em gel corado com brometo de etídio. As amplificações seletivas foram executadas a partir do produto da pré-amplificação diluído 1:20 e com diversas combinações dos primers *MseI+3/HindIII+3*. Os produtos de AFLP foram separados em gel Spreadex® EL-800, corado com brometo de etídio, sendo visualizados e fotografados sob luz-UV. Somente os fragmentos de AFLP que puderam ser identificados inequivocamente foram incluídos na análise.

Análise de dados

Os resultados da matriz 0/1 foram convertidos em uma matriz de distância usando o índice de similaridade de Jaccard ou Dice do pacote de software NTSYS-PC (Rohlf 1993). As múltiplas árvores de parcimônia foram combinadas para dar forma a uma única árvore *strict consensus* (50% Majority-Rule-Consensus). Os níveis de sustentação para as espécies foram testados com 1000 réplicas de *bootstrap*. Dendrogramas foram gerados por análise clusterizada usando a opção UPGMA do pacote NTSYS-pc. Os dados de AFLP foram adicionalmente sujeitos a análise pelo método NJ (*Neighbour Joining*) baseada no coeficiente Nei-Li usando o programa PAUP versão 4.0 beta 10 (Swofford and Begle 1993).

Resultados

A fim de selecionar as melhores combinações de primers na geração de polimorfismos, um subconjunto de quatro genótipos foi selecionado para submissão a uma amplificação seletiva via PCR, incluindo quatro espécies de *Aechmea* (J001 *A. cândida*; J002 *A. gamosepala* var *gamosepala*; J003 *A. caudata* for. *variegata* e J004 *A. cylindrica*) selecionadas a partir daquelas listadas na Tabela 1. Para esta finalidade, as alíquotas pré-amplificadas foram diluídas em uma proporção de 1:20 e sujeitas à amplificação com total de 81 diferentes combinações de primers. Após análise pelo sistema de gel de Spreadex EL-800, selecionou-se as combinações consideradas mais informativas, adequadas para uma análise remanescente. O número de bandas amplificadas variou entre 10 (combinações de primers Pk34-H+AAG/M+CGA) e cinco (Pk37-H+CGA/M+AGC), enquanto o número dos polimorfismos foi entre seis (caso que das combinações de primers Pk9-H+CGA/M+ACC e Pk33-H+CAG/M+AGC) e cinco (combinações de primers Pk34-H+AAG/M+CGA, Pk37-H+CGA/M+AGC e Pk51-H+AGC/M+CGA). O produto das cinco combinações de primers está apresentado na Figura 1, enquanto a Figura 2 apresenta uma amplificação incluindo todos os 40 genótipos com a combinação primer Pk32 (HindII+CAC e MSEI+CGA).

Após a aplicação das combinações de primers mais informativas usando os 40 acessos de *Aechmea* subg. *Ortgiesia*, foi efetuada uma análise visual dos produtos da AFLP, a qual gerou uma matriz de dados, composta de 1360 caracteres. Desta foram excluídas 118 bandas (designadas por "n"), uma vez que sua presença ou ausência não estava clara. O dendrograma gerado (software NTSYS-pc, *bootstrap*, 1000 réplicas) encontra-se apresentado na Figura 3, com as respectivas entidades taxonômicas.

Os resultados revelaram cinco genótipos unidos em um clado basal (Clado I = *A. cândida* populações 1 e 2; *A. coelestris* var. *albo marginata* 1; *A. coelestris* e *A. coelestris* var. *albo marginata* 2) do qual emergiu um novo clado (II) incluindo *A. candida*, população 3 e duas populações de *A. winkleri*. Desta última ramificação, dois cladogramas principais (III e IV) derivam-se, dando forma a subgrupos de taxa com diferentes níveis de relacionamento, como pode ser comparado pela escala na base do dendrograma (Figura 3).

Discussão

Um maior entendimento sobre o relacionamento entre espécies nativas está entre os principais objetivos de taxonomistas, sistematas e conservacionistas, considerando-se que marcadores moleculares podem ser bastante úteis para esta finalidade. Dentre os marcadores mais informativos está o AFLP, um tipo de marcador em geral polimórfico, que tem sido usado extensamente para acessar relacionamento, diversidade, e padrões de segregação gênica nas populações. O método de AFLP é comparável ao RAPD (Welsh e McClelland 1990) desde que ambos os métodos geram marcadores anônimos e codominantes, com o segundo tipo de marcador sendo considerado mais informativo e reprodutivo, como também mais eficiente em detectar o polimorfismo (Mas et al. 2000).

Apesar das vantagens do método de AFLP a sensibilidade do método não atingiu às expectativas na análise do subgênero *Ortgiesia*, aqui estudado. Apesar da sensibilidade da técnica e da capacidade de gerar elevados níveis de polimorfismo, os produtos de AFLP aqui amostrados revelaram baixos níveis de polimorfismo no grupo *Ortgiesia*, com muitas bandas monomórficas entre os taxa analisados. Uma possível explicação pode estar relacionada ao sistema do gel adotado para esta finalidade, desde que muitas bandas não puderam ser visualizadas pelo sistema do gel de Spreadex EL-800 adotado no presente estudo, podendo-se supor que melhores resultados seriam obtidos com o uso do tradicional sistema do gel vertical de PAA (poliacrilamida), não disponível quando ocorreram os procedimentos deste estudo.

Durante a seleção das 81 combinações de primers mais informativas, quatro genótipos de *Aechmea* (J001 *A. cândida*; J002 *A. gamosepala* var. *gamosepala*; J003 *A. caudata* for. *variegata* e J004 *A. cylindrica*) foram avaliados. Desta seleção inicial, um subconjunto de cinco primers mais informativos foram selecionados, considerando os polimorfismos em nível interespecífico. Os primers selecionados apresentaram bandas claras e amplificação altamente reprodutível quando transpostos para repetição nos 40 genótipos selecionados, confirmando a reprodutibilidade dos marcadores AFLP.

Analisando o dendrograma gerado, observou-se um clado basal (I) incluindo quatro taxa: *A. cândida* (população 1 e 2); *A. coelestris* var. *albo marginata* 1; *A. coelestris* e *A. coelestris* var. *albo marginata* 2. Ambas as espécies (*A. cândida* e *A. coelestris*) vem sendo frequentemente indicadas como proximamente relacionadas, apresentando inflorescências ramificadas basalmente (Butcher e Franklin 2005), um caráter que também está presente em *A. winkleri*, incluída no clado II, mais proximamente relacionado, o qual inclui também uma terceira população de *A. cândida*. Esta posição basal do grupo sugere que este tipo de inflorescência

poderia ser identificado como um caráter primitivo, devendo-se porém, levar em consideração que o mesmo caráter está também presente em *A. gracilis* e *A. organensis*, que aparecem em clados distintos (III e IV) na presente avaliação.

Destes grupos basais, dois principais clados emergiram, sendo um deles (clado III) dividido em quatro grupos principais, um deles composto por um sub-clado incluindo *A. gamosepala* var. *gamosepala* junto com *A. gamosepala* 1 e por um outro sub-clado incluindo *A. gracilis* e *A. coelestris* var. *coelestris*. A unificação de *A. gamosepala* var. *gamosepala* com *A. gamosepala* 1 era esperada, mas sua separação da população de *A. gamosepala* 2 é surpreendente, pelo fato desta estar agrupada em um ramo inferior juntamente com *A. lindenii* e *A. kertezinae*. Ambas as espécies compartilham com *A. gamosepala* a presença de inflorescências simples, o que tem sido considerado pelos taxonomistas como um caráter informativo no grupo *Ortgiesia* (Butcher e Franklin 2005).

O grupo seguinte é composto por *A. blumenavii* e pelas populações 1 e 2 de *A. recurvata* var. *ortgiesii*. A espécie *A. recurvata* foi considerada como relacionadamente próxima a *A. pimentii-velosoi*, pela presença das folhas triangulares e eretas. De fato, em mais de um clado ambas entidades (*A. pimentii-velosoi* 2 e *A. recurvata*) permaneceram juntas, reforçando esta relação. A espécie *A. blumenavii* foi classificada proximamente a *A. cylindrica* (Butcher e Franklin 2005), uma espécie que encontra-se incluída em um diferente sub-clado no presente estudo.

O clado III também inclui espécies fortemente relacionadas como *A. lindenii* var. *lindenii* juntamente com *A. weilbachii*, *A. weilbachii* var. *weilbachii* e *A. caudata* var. *caudata*. Estes últimos quatro taxa compartilham a mesma área de distribuição e a presença de folhas coriáceas e liguladas (Butcher e Franklin 2005).

A segunda principal ramificação (clado IV) inclui um primeiro ramo com *A. gracilis* 2, *A. calyculata*, *A. conata* var. *mackoyama*, Gen. spec. 2 (espécie não descrita), um segundo sub-clado *A. organensis*, *A. recurvata*, *A. pimentii velosoi* e um terceiro sub-clado incluindo o *A. lindenii*, *A. gamosepala* 2 e *A. kertezinae*. Com respeito ao primeiro ramo, *A. calyculata* e *A. conata* têm em comum a presença de folhas liguladas e coriáceas, bem como a presença de inflorescências simples e densas. Por outro lado, enquanto *A. organensis* e *A. pimentii velosoi* são similares e estão relacionadamente próximas, *A. recurvata* não vem sendo considerada como proximamente relacionada a ambas espécies (Butcher e Franklin 2005). O terceiro ramo, formado por *A. lindenii*, *A. gamosepala* 2 e *A. kertezinae* inclui três espécies que são endêmicas do Sul do Brasil, ocorrendo simpatricamente no estado de Santa Catarina (Bert e Luther 2005),

com as últimas duas espécies apresentando os inflorescências simples, sendo frequentemente posicionadas no mesmo grupo em *Ortgiesia* (Butcher e Franklin 2005).

Nenhuma correlação entre o hábito (considerando as descrições de Bert e Luther, 2005) e o agrupamento no dendrograma gerado pôde ser reconhecida, sugerindo que a adaptação ao hábito terrestre e epifítico apareceu independentemente nos distintos grupos do subgênero. Uma relação entre a altitude de ocorrência das espécies analisadas e as relações reveladas pelo método de AFLP não pôde ser observada.

Avaliações adicionais, incluindo os marcadores aqui gerados e caracteres morfométricos estão sendo analisadas pelos autores, devendo-se supor que a sua inclusão e a aplicação de métodos de análises cladística serão mais informativas, resolvendo algumas questões que permaneceram abertas ou incertas no presente estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Ralf Horres e a Ms. Marilu Huertas pelas instruções técnicas e por interessantes discussões durante o trabalho laboratorial. Agradecemos ao Palmengarten da cidade de Frankfurt am Main, pela permissão para a coleta do material biológico nas casas de vegetação. Este estudo foi parcialmente suportado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil, Grant no. 478895/2003-8) e UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) pela bolsa e auxílio financeiro para os estudos de biologia molecular.

Literatura Citada

- Barfuss M. H. J., Samuel R., Till W., Stuessy T. F. (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven platid regions. *American Journal of Botany* 92: 337-351.
- Benzing D. H. (2000) *Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bert, T. M., Luther H. E. (2005). *Aechmea* information. Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota, Florida. Release Date: Jan. 2005. Accessed in: Dec. 2005. Pp. 53. Online publication: http://fcb.org/articles/Aechmea_spp_table.pdf.
- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1989) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Amer. J. Bot.* 76: 657-665.
- Butcher D., Franklin P. (2005). *Ortgiesia* - A subgenus of *Aechmea* - Notes from a continuing project. Release date: Feb. 2005. Accession Date: Jan. 2006. Pp. 6. Online publication: <http://fcb.org/articles/Ortgiesia.htm>.
- Cathcart D. J. (1995) The importance of maintaining bromeliads imports. *Florida entomologist* 78: 16-21.
- Crayn D. M., Winter K., Smith A. (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epifitica habit in the neotropical family Bromeliaceae. *PMNAS* 101: 3703-3708.
- Cronquist A. (1988) *The evolution and classification of flowering plants* 2^a ed. New York Botanic Garden, New York.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Garcia-Mas J., Oliver M., Gómez-Paniagua H., De Vicente M. C. (2000) Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.* 101: 860-864.
- Gerber S., Mariette S., Streiff R., Bodénès C., Kremer A. (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol. Ecol.* 9: 1037-1048.
- Gilmartin A. J., Brown G. K. (1987) Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies. *Systematic Botany* 12: 193-500.

- Gitaí J., Horres, R., Benko-Iseppon A M. (2005) Chromosome features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Syst. Evol.* 253: 65-80.
- Givnish T. J., Millam K. C., Evans M., Hall J. C., Pires J. C., Berry, P. E., Systsma K. J. (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. *Int. J. Plant Sci* 165: 35-54.
- Kubitzki K. (1998) The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except gramineae). Springer Verlag, Berlin, pp. 511.
- Mas G. J., Oliver M., Gómez-Paniagua H., de Vicente M.C. (2000) Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. Springer Verlag, Berlin, pp. 860-864
- Proença S. L., Sajo M. G. (2004) Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18: 319-331.
- Rohlf F. J. (1993) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter, New York.
- Souza G. M. , Wanderely M. G. L., Cruz-Barros, M. A. V. (1997) Morfologia polínica de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pavon. (Bromeliaceae) de Pernambuco, Brasil. *Bol. Bot. Univ.São Paulo*, 16: 21-30.
- Swofford D. L., Beagle D. P. (1993) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 3.1. Champaign, Illinois: Smithsonian Institute.
- Terry R. G., Brown G. K., Olmstead R. G. (1997) Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany* 84: 664-670.
- Welsh J., McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Wendt T. (1997) A review of the subgenus *Pothuava* (Baker) Baker of *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) in Brasil. *Bot. J. Linn. Soc.* 125: 245-271.
- Zimnoch-Guzowska E., Marczewski W., Lebecka R., Flis B, Schäfer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C. (2000) QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci.* 40: 1156-1167.

Tabela 1. Material vegetal usado nas análises de AFLP, incluindo procedência e número de acesso com os respectivos hábitos e altitude. Todas as espécimens foram coletadas no seu habitat natural e estão sob cultivo no Palmengarten, Frankfurt am Main (indicado como PFM) ou no Jardim Botânico da Universidade de Heidelberg (BGH). As entidades taxonômicas estão em ordem alfabética. Os números empregados aos correspondentes taxonômicos para números dados no dendrograma. (Figura 1). Hábito, distribuição e altitude estão de acordo com Bert e Luther (2005). As espécies ao quais as informações em respeito ao hábito, distribuição ou altitude não estão presentes estão designadas com “—”.

Lab-Nº	Táxon e Autor	Hábito	Distribuição	Altitude	No. de Acesso
J028	<i>A. blumenavii</i> Reitz.	Epifítica	Brasil, Blumenau, Santa Catarina.	300-850 m	Heid-104588 (BGH).
J034	<i>A. calyculata</i> (E. Morren) Baker - 1	Epifítica, terrestre	Brasil, Bahia.	100-1,200 m	Heid-103296 (BGH).
J015	<i>A. calyculata</i> (E. Morren) Baker - 2	Epifítica, terrestre	Brasil, Bahia.	100-1,200 m	FRP s.n./Z-1161/LLZ 844/KS-030703-03 (PFM).
J001	<i>A. candida</i> E. Morren ex Baker - 1	Epifítica, terrestre	Brasil, Região Sul.	—	FRP 90- 1685600/KS 030703-6 (PFM).
J030	<i>A. candida</i> E. Morren ex Baker - 2	Epifítica, terrestre	Brasil, Região Sul.	—	Heid-103594 (BGH).
J006	<i>A. candida</i> E. Morren ex Baker - 3	Epifítica, terrestre	Brasil, Região Sul.	—	FRP 88-10485-3/KS 030703-7 (PFM).
J037	<i>A. caudata</i> Lindman	Epifítica, saxícola	Brasil, Espírito Santo ao Rio de Janeiro.	0-900 m	Heid-1030412 (BGH).
J003	<i>A. caudata</i> form. <i>variegata</i> M.B.Foster	Epifítica	Brasil, Espírito Santo ao Rio de Janeiro.	—	FRP 95-14279-0/KS030703-9 (PFM).
J041	<i>A. caudata</i> var. <i>caudata</i> Lindman	Epifítica, saxícola	Brasil, Espírito Santo ao Rio de Janeiro.	0-900 m	Heid-104589 (BGH).
J018	<i>A. coelestris</i> (K.Koch) E. Morren	Epifítica	Brasil, Espírito Santo ao Paraná.	650-880 m	FRP s.n. /KS 030703-08 (PFM).
J007	<i>A. coelestris</i> var. <i>albo marginata</i> M.B.Foster - 1	—	Brasil, Espírito Santo ao Paraná.	—	FRP 90-1152400/KS 030703 (PFM).
J039	<i>A. coelestris</i> var. <i>albo marginata</i> M.B.Foster - 2	Epifítica, saxícola	Brasil, Espírito Santo ao Paraná.	650-880 m	Heid-103297 (BGH).
J031	<i>A. coelestris</i> var. <i>coelestris</i> (K.Koch) E. Morren	Epifítica, saxícola	Brasil, Espírito Santo ao Paraná.	650-850 m	Heid-102979 (BGH).
J011	<i>A. comata</i> var. <i>lindenii</i> (Gaudichaud) Baker	—	Brasil, Região Sul.	—	FRP 9313595-2/KS 030703-14 (PFM).
J008	<i>A. comata</i> var. <i>mackoyana</i> (Mez) L.B.Smith	—	Brasil, Região Sul.	—	FRP 99-18817-0/KS 030703-15 (PFM).
J004	<i>A. cylindrica</i> Lindman	Epifítica ou raramente terrestre	Brasil, Serra do Mar, estado de São Paulo	0-1,200 m	FRP 98-16937-0/KS 030703-12 (PFM).
J025	<i>A. fulgens typica</i> Brongniart	—	Brasil, Pernambuco.	—	FRP s.n./H 144 LLZ 727 (PFM).
J024	<i>A. fulgens</i> var. <i>discolor</i> (C. Morren) Brongniart	Epifítica	Brasil, Pernambuco.	—	FRP 98-16936-0/LLZ 867 (PFM).

Tabela 1. Continuação.

Lab-Nº	Taxon e Autor	Hábito	Distribuição	Altitude	Nr. de Acesso
J012	<i>A. gamosepala</i> Wittmack 2	Epifítica, rupícola ou terrestre	Brasil, São Paulo ao Rio Grande do Sul.	0-250 m	FRP 98-16960-3/KS 030703-10 (PFM).
J002	<i>A. gamosepala</i> var. <i>gamosepala</i> Wittmack	Epifítica, rupícola ou terrestre	Brasil, São Paulo ao Rio Grande do Sul.	0-250 m	FRP 88-10490-3/KS 030703-11 (PFM).
J032	<i>A. gamosepala</i> Wittmack – 1	Epifítica, terrestre	Brasil, São Paulo ao Rio Grande do Sul.	0-250 m	Heid-130384 (BGH).
J021	<i>A. glomerata</i> Hort. ex Beer	—	—	—	FRP 98-16961-3/LLZ 744 H 272 (PFM).
J005	<i>A. gracilis</i> Lindman – 1	Epifítica	Brasil, Rio de Janeiro a Santa Catarina.	0-1,000 m	FRP 98-16949-3/H 043 (PFM).
J038	<i>A. gracilis</i> Lindman – 2	Epifítica	Brasil, Rio de Janeiro a Santa Catarina.	0-1,00 m	Heid-103595 (BGH).
J016	<i>A. kertesziae</i> Reitz	Epifítica, rupícola	Brasil, Santa Catarina.	5-350 m	FRP s.n. /KS 030703-13 (PFM).
J017	<i>A. lindenii</i> (Gaudichaud) Baker	Epifítica, rupícola	Brasil, Santa Catarina.	0-400 m	FRP 98-16935-3/KS 201101/ LLZ 804 FAA 804 (PFM).
J040	<i>A. lindenii</i> var. <i>lindenii</i> (Gaudichaud) Baker	Epifítica	Brasil, Santa Catarina.	—	Heid-130360 (BGH).
J035	<i>A. organensis</i> Wawra	Epifítica	Brasil, Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul	0-1,200 m	Heid-103027 (BGH).
J036	<i>A. pimentii-velosoi</i> Reitz - 2	Epifítica, terrestre	Brasil, Rio de Janeiro a Santa Catarina.	350 m	Heid-103299 (BGH).
J020	<i>A. pimentii-velosoi</i> var. <i>glabra</i> Reitz	Epifítica, terrestre	Brasil, Rio de Janeiro a Santa Catarina.	0-500 m	FRP 901144-400/Z 1193 LLZ 807 (PFM).
J013	<i>A. pimenti-velosoi</i> Reitz	Epifítica, terrestre	Brasil, Rio de Janeiro a Santa Catarina.	350 m	FRP 88-10490-3/KS 030703-11 (PFM).
J027	<i>A. racinae</i> var. <i>tubiformis</i> E.Pereira	Epifítica	Brasil, Espírito Santo.	—	FRP 86-16933-3 (PFM).
J009	<i>A. recurvata</i> (Klotzsch) L.B.Smith	Epifítica, saxícola	Paraguai, Uruguai e Argentina.	0-700 m	FRP 88-10490-3/KS 030703-11 (PFM).
J014	<i>A. recurvata</i> var. <i>benrathii</i> (Mez) Reitz	Saxícola	Paraguai, Uruguai e Argentina.	0-500 m	FRP s.n. /KS 030703-2 (PFM).
J010	<i>A. recurvata</i> var. <i>ortgiesii</i> (Baker) Reitz - 1	Epifítica, saxícola	Paraguai, Uruguai e Argentina.	0-2,000 m	FRP 0193483/KS 030703-3 (PFM).
J029	<i>A. recurvata</i> var. <i>ortgiesii</i> (Baker) Reitz - 2	Epifítica, saxícola	Paraguai, Uruguai e Argentina.	0-2,000 m	Heid-104623 (BGH).
J019	<i>A. weilbachii</i> Didrichsen	Epifítica	Brasil, Espírito Santo ao Rio de Janeiro.	—	FRP 2- 1467-87-80/FRP 97 18 214-3 FR- 747 (PFM).
J022	<i>A. weilbachii</i> var. <i>wulbachii</i> Didrichsen	Epifítica	Brasil, Espírito Santo ao Rio de Janeiro.	0-1,000 m	FRP 99-18220-0/LLZ 853 (PFM).
J026	<i>A. winkleri</i> Reitz - 1	Epifítica, terrestre	Brasil, Rio Grande do Sul.	—	FRP 98-16954-2/LLZ 743 (PFM).
J033	<i>A. winkleri</i> Reitz - 2	Epifítica, terrestre	Brasil, Rio Grande do Sul.	—	Heid-103605 (BGH).

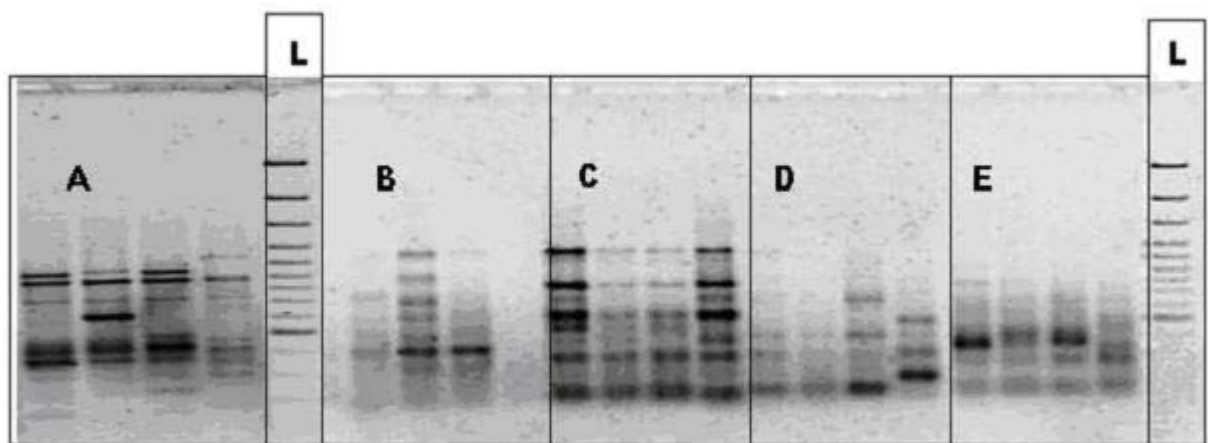


Figura 1. Amplificação seletiva do DNA genômico de quatro diferentes espécies de *Aechmea*; *A. candida* E. Morren ex Baker, *A. gamosepala* var. *gamosepala* Wittmack, *A. caudata* form. *variegata* M.B.Foster e *A. cylindrica* Lindman com cinco diferentes combinações de primers.: (A)=H+CAC/M+CGA; (B)=H+CAG/M+AGC; (C)=H+AAG/M+CGA; (D)=H+AGC/M+CCA; (E)=H+CGA/M+AGC. “L”=Marcador de peso molecular, correspondente a 100 bp. (DNA ladder).

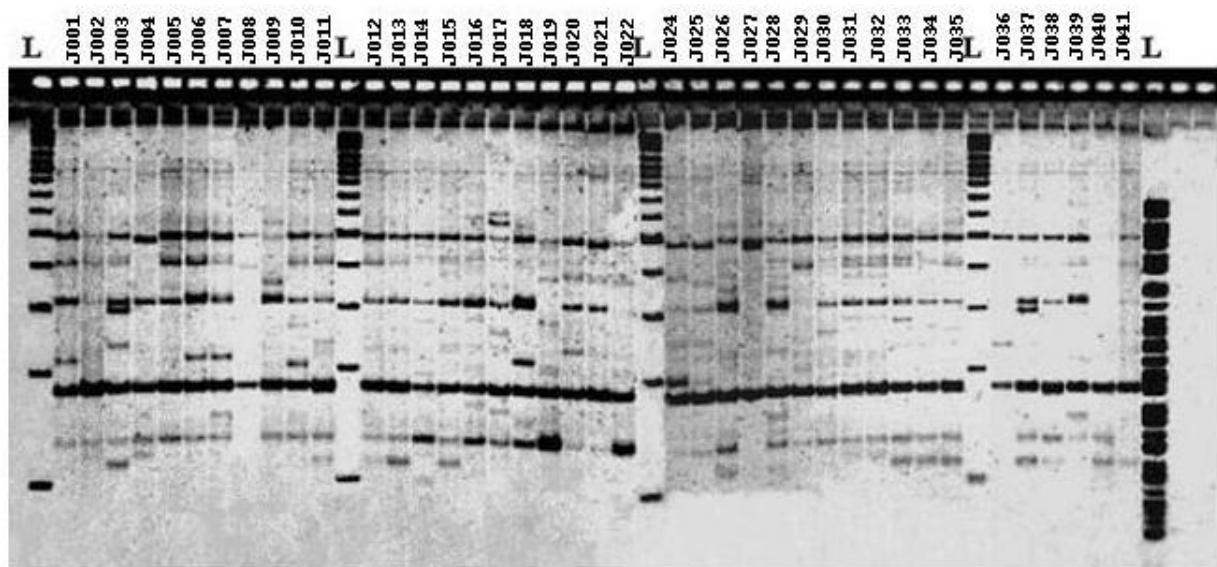


Figura 2. Gel Spreadex[®] EL 800 com produtos da reação de AFLP da combinação de primer Pk32 (HindII+CAC e MSEI+CGA) em 40 espécies de *Aechmea*. Posições indicadas por “L” correspondem a 100 bp DNA ladder e para HindIII lambda de DNA digerido (última posição).

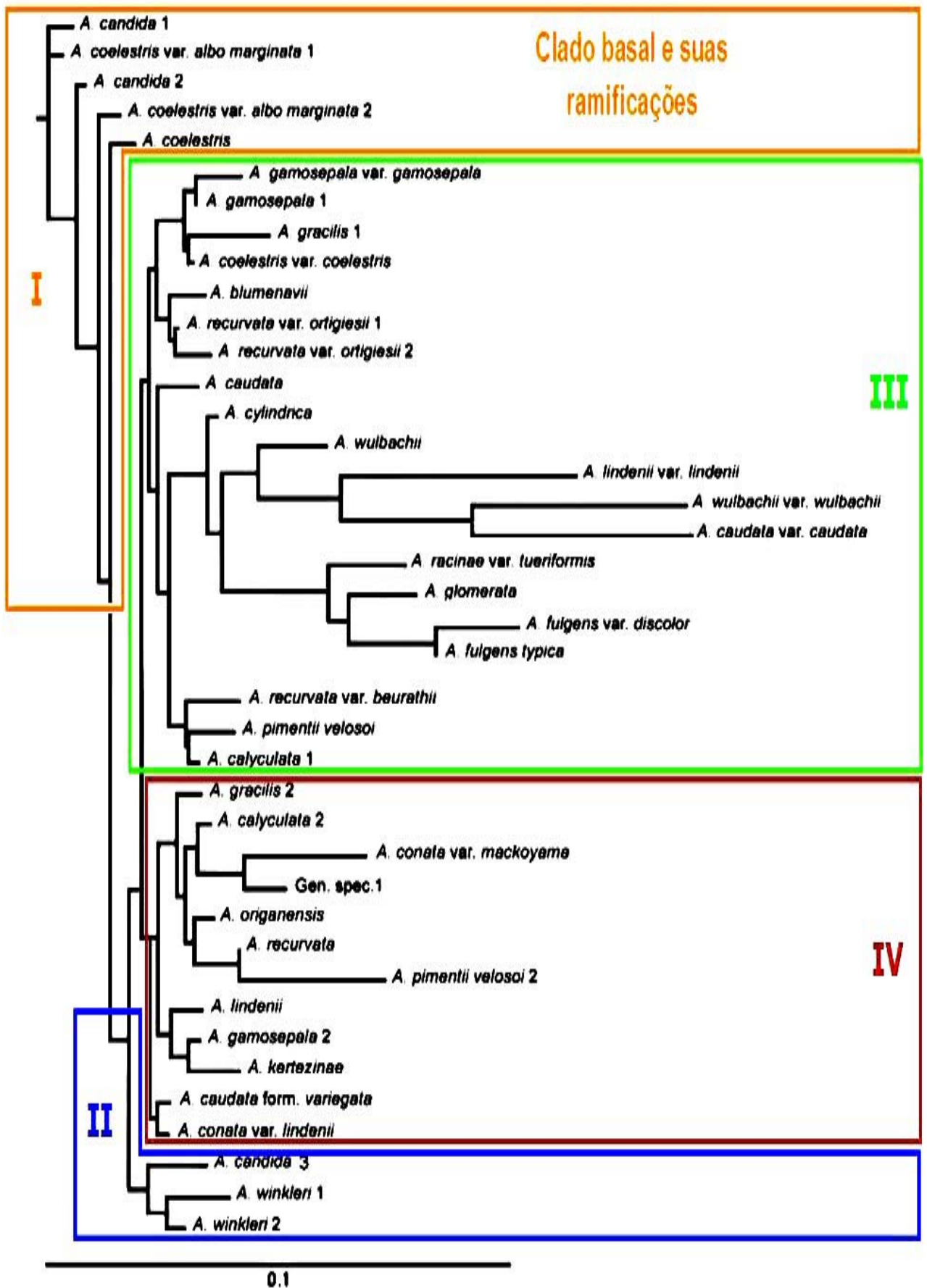


Figura 3. Árvore de parcimônia incluindo 40 espécies de *Aechmea* do subgênero *Ortigiesia* e uma espécie não identificada de Bromelioideae (Gen. spec. 1), após análise UPGMA.

5. Conclusões

- As Bromeliaceae constituem-se em uma família homogênea quanto a alguns caracteres citogenéticos como a estrutura dos núcleos interfásicos e o comportamento de condensação profásica, sugerindo que constituem um grupo monofilético.
- A família apresenta diversidade cromossômico-numérica restrita, com a maioria das espécies apresentando $2n=50$ e, mais raramente, poliplóides com $2n=100$ ou $2n=150$.
- Estudos citogenéticos anteriores a 1965 geraram números cromossômicos a partir da técnica de cortes microtômicos seriados, porém não foram confirmados pelo presente estudo nem por recontagens anteriores, devendo ser tratados cautelosamente em análises da evolução cromossômica da família.
- Todas as espécies analisadas apresentaram cromossomos de tamanho diminuto, observando-se baixo conteúdo de heterocromatina naquelas onde técnicas de bandeamento (C e fluorocromos) foram aplicadas.
- Cariótipos bimodais apresentam-se em espécies diplóides com $2n=50$ com predominância nas subfamílias Pitcairnioideae e Tillandsioideae.
- A poliploidia, provavelmente associada à hibridização, apresenta-se como o mais evidente mecanismo evolutivo da família, embora a presença de disploidia seja evidente em alguns grupos, com ênfase para as Tillandsioideae.
- A avaliação com marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) aplicada ao subgênero *Ortgiesia* de *Aechmea*, sugere que o grupo *A. cândida* - *A. coelestris* - *A. winkleri* teria uma posição primitiva dentro do grupo, além de reforçar uma possível proximidade entre taxa considerados relacionados (*A. recurvata* & *A. pimentii-velosoi*; *A. calyculata* & *A. conata*; *A. lindenii* & *A. gamosepala* & *A. kertesziinae*).

6.0 Anexos

6.1 Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae

Publicado na Revista **Plant Systematics and Evolution** 253: 65-80.

Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae

J. Gitaí et al.: Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae

and their value should be considered carefully (Brown and Gilmartin 1986).

Most previous works have been restricted to chromosome counts from meiotic cells, with only few details on karyotype architecture. Considering the relative conservation of chromosome numbers it is interesting to aggregate further cytological information as interphase nuclei structure, condensing behavior in prophase to prometaphase, chromosome size and morphology as well as banding patterns in order to assess a possible role of the heterochromatin in the karyotype evolution. The present study aims to screen different genera of Bromeliaceae regarding these cytological features in order to evaluate their usefulness for phylogenetic purposes.

Materials and methods

All species studied are listed in Table 1 with source, voucher numbers and previous reports of chromosome numbers, if any is available. Cytological observations were carried out from root tips, flower bud primordia or leaf meristems. For mitotic arrest, meristematic tissues were pre-treated with 8-hydroxyquinoline (2 mM) for 24 h and fixed in Carnoy (Ethanol:Acetic acid, 3:1). The standard chromosome preparations (HCl/Giemsa) followed the technique described by Benko-Iseppon and Morawetz (2000). C-banding was performed after Schwarzscher et al. (1980) with minor modifications and the fluorochrome staining with CMA/Actinomycin/DAPI followed the procedures described by Deumling and Greilhuber (1982) after the method developed by Schweizer (1976). Silver staining of interphase nuclei followed Hizume et al. (1980) with minor modifications.

Measurements of chromosome maximal and minimal sizes were based on drawings of 2–4 well-contracted metaphase plates of each species presented as compared with a micrometric scale. Since all species presented chromosomes of small size, a minimum of 10 good metaphase or prometaphase spreads were checked in order to identify the correct chromosome number.

Photomicrographs were taken with Kodak Technical Pan for conventional staining and with Kodak T-Max 400 for fluorochrome staining.

Results

Chromosome numbers and cytological features of the 19 analyzed taxa are presented in Table 1 and 2 and illustrated in Figs. 1 and 2. First cytological analyzes are presented for 15 taxa assigned to the three subfamilies as follows: (a) Bromelioideae (10 taxa): *Ananas nanus*, *Deinacanthon urbanianum*, *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor*, *F. bicolor* ssp. *canaliculata*, *Greigia* aff. *mulfordii* var. *micrantha*, *G. sphaelata*, *Ochagavia elegans*, *O. litoralis*; *Orthophytum disjunctum* (b) Pitcairnioideae (4 taxa): *Ayensua waipanensis*; *Deuterocohnia lorentziana*; *Dyckia saxatilis*, *Pitcairnia atrovirens*, and *Puya mirabilis* (c) Tillandsioideae (1 taxon): *Catopsis floribunda*. For the genera *Ayensua*, *Deinacanthon*, *Fascicularia*, *Greigia* and *Ochagavia* these are the first karyological data.

Additional features as interphase nuclei structure, chromosome condensing behavior, and banding patterns (C-banding, fluorochrome staining with CMA/Actinomycin/DAPI and silver staining with AgNO₃) were carried out for the first time in Bromeliaceae.

All analyzed species presented semi-reticulated interphase nuclei and proximal-anterior chromosome condensing behavior during prophase to prometaphase (Table 2; Fig. 1b, c, e, m; Fig. 2b, e, g) mostly with small spheroid or rod shaped chromocenters (e.g. Fig. 1b, e) with exception of *Deuterocohnia lorentziana* that presented filamentous chromocenters (Fig. 2b).

The number $2n = 50$ was observed in 16 species (Table 1), ten belonging to subfamily Bromelioideae, four to Pitcairnioideae and two to Tillandsioideae, covering a total of 12 of the 15 genera analyzed. Higher ploidy levels could be observed in two species of Bromelioideae (*Bromelia laciniosa*, with $2n = \text{ca. } 150$; Fig. 1d) and *Deinacanthon urbanianum* ($2n = \text{ca. } 160$; Fig. 1e). Since this last number deviates from the $x = 25$ base number, we carried out additional counts confirming this number.

and their value should be considered carefully (Brown and Gilmartin 1986).

Most previous works have been restricted to chromosome counts from meiotic cells, with only few details on karyotype architecture. Considering the relative conservation of chromosome numbers it is interesting to aggregate further cytological information as interphase nuclei structure, condensing behavior in prophase to prometaphase, chromosome size and morphology as well as banding patterns in order to assess a possible role of the heterochromatin in the karyotype evolution. The present study aims to screen different genera of Bromeliaceae regarding these cytological features in order to evaluate their usefulness for phylogenetic purposes.

Materials and methods

All species studied are listed in Table 1 with source, voucher numbers and previous reports of chromosome numbers, if any is available. Cytological observations were carried out from root tips, flower bud primordia or leaf meristems. For mitotic arrest, meristematic tissues were pre-treated with 8-hydroxyquinoline (2 mM) for 24 h and fixed in Carnoy (Ethanol:Acetic acid, 3:1). The standard chromosome preparations (HCl/Giemsa) followed the technique described by Benko-Iseppon and Morawetz (2000). C-banding was performed after Schwarzscher et al. (1980) with minor modifications and the fluorochrome staining with CMA/Actinomycin/DAPI followed the procedures described by Deumling and Greilhuber (1982) after the method developed by Schweizer (1976). Silver staining of interphase nuclei followed Hizume et al. (1980) with minor modifications.

Measurements of chromosome maximal and minimal sizes were based on drawings of 2–4 well-contracted metaphase plates of each species presented as compared with a micrometric scale. Since all species presented chromosomes of small size, a minimum of 10 good metaphase or prometaphase spreads were checked in order to identify the correct chromosome number.

Photomicrographs were taken with Kodak Technical Pan for conventional staining and with Kodak T-Max 400 for fluorochrome staining.

Results

Chromosome numbers and cytological features of the 19 analyzed taxa are presented in Table 1 and 2 and illustrated in Figs. 1 and 2. First cytological analyzes are presented for 15 taxa assigned to the three subfamilies as follows: (a) Bromelioideae (10 taxa): *Ananas nanus*, *Deinacanthon urbanianum*, *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor*, *F. bicolor* ssp. *canaliculata*, *Greigia* aff. *mulfordii* var. *micrantha*, *G. sphaelata*, *Ochagavia elegans*, *O. litoralis*; *Orthophytum disjunctum* (b) Pitcairnioideae (4 taxa): *Ayensua waipanensis*; *Deuterocohnia lorentziana*; *Dyckia saxatilis*, *Pitcairnia atrovirens*, and *Puya mirabilis* (c) Tillandsioideae (1 taxon): *Catopsis floribunda*. For the genera *Ayensua*, *Deinacanthon*, *Fascicularia*, *Greigia* and *Ochagavia* these are the first karyological data.

Additional features as interphase nuclei structure, chromosome condensing behavior, and banding patterns (C-banding, fluorochrome staining with CMA/Actinomycin/DAPI and silver staining with AgNO_3) were carried out for the first time in Bromeliaceae.

All analyzed species presented semi-reticulated interphase nuclei and proximal-anterior chromosome condensing behavior during prophase to prometaphase (Table 2; Fig. 1b, c, e, m; Fig. 2b, e, g) mostly with small spheroid or rod shaped chromocenters (e.g. Fig. 1b, e) with exception of *Deuterocohnia lorentziana* that presented filamentous chromocenters (Fig. 2b).

The number $2n = 50$ was observed in 16 species (Table 1), ten belonging to subfamily Bromelioideae, four to Pitcairnioideae and two to Tillandsioideae, covering a total of 12 of the 15 genera analyzed. Higher ploidy levels could be observed in two species of Bromelioideae (*Bromelia laciniosa*, with $2n = \text{ca. } 150$; Fig. 1d) and *Deinacanthon urbanianum* ($2n = \text{ca. } 160$; Fig. 1e). Since this last number deviates from the $x = 25$ base number, we carried out additional counts confirming this number.

Table 1. List of analyzed species including provenance, collector, voucher number and chromosome numbers (present data and previous reports). For species with more than a single previous chromosome count, respective authors are indicated by letters in upper case

Taxon	Source, collector and voucher number	[Chromosome numbers]		Author
		Present study	Previous reports	
Bromelioideae				
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	Wild, Brazil, Bahia, Rio de Contas, leg. Benko-Iseppon BRO-1220, det. Wanderley	2n = 50	2n = 50	Brown et al. (1997)
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrel	Cultivated, Brazil, Pernambuco, Recife, local market, leg. et det. Benko-Iseppon BRO-1246	2n = 50	2n = 48 ^d , 50 ^{a,b,c,d,f} , 75 ^{b,d} , 100 ^g , n = 25 ^a	^a Collins and Kerns (1931, 1936, 1938), ^b Bhowmik (1977), ^c Chen et al. (1985), ^d Lin et al. (1987), ^e Brown and Gilmarin (1989), ^f Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
<i>A. nanus</i> (L.B. Sm.) L.B. Sm.	Cultivated, Brazil, Pernambuco, Recife, Campus UFPE; leg. et det. Gital BRO-001	2n = 50	-	
<i>Bromelia laciniosa</i> Mart. ex Schultes	Wild, Brazil, Bahia; Paulo Afonso, leg. Benko-Iseppon 21/040398, det. Wanderley	2n = ca.150	2n = ca.150	Cotias-de-Oliveira et al. (2000)
<i>Deinacanthon</i> <i>urbanianum</i> (Mez.) Mez.	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 98-17786-0, leg. Horst 08.09.1972, H018, det. Horres	2n = ca.160	-	-
<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pavon) Mez. ssp. <i>bicolor</i> , E.C. Nelson & Zizka	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 98-16846-3, seeds from RBG Kew, FR 6a, det. Horres	2n = 50	-	-

Table 1. (Continued)

Taxon	Source, collector and voucher number	[Chromosome numbers]		Author
		Present study	Previous reports	
<i>F. bicolor</i> (Ruiz & Pavon) <i>Mez. ssp. canaliculata</i> E.C. Nelson & Zizka	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 90-17118-3, seeds from RBG Kew, FR 16a, det. Horres	2n = 50	-	-
<i>Greigia</i> spec. nov. (aff. <i>G. mulfordii</i> var. <i>micrantha</i>)	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, collected in Colombia, Cundina marca, Monserrate, 04°36'035"N, 074°03'238"W, leg. Grant 30.04.1999, 99-19040-0, H157, det. Horres	2n = 50	-	-
<i>G. sphacelata</i> (Ruiz & Pavon) Regel	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, collected in Chile, Province Concepción, Forest at Hualqui, 98-16855-1, H27a, det. Horres	2n = 50	-	-
<i>Ochagavia elegans</i> R. Philippi	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 98-16852-3a, II 93, seeds from RBG Kew 1987-2763, FR23a, det. Horres	2n = 50	-	-
<i>O. litovais</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zöelner	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 94-14614-3, H115, det. Horres	2n = 50	-	-
<i>Orthophytum dijunctum</i> L.B. Sm.	Wild, Brazil, Pernambuco, Camocim de São Félix, leg. Sales de Melo BRO-009, det. Wanderley	2n = 50	-	-

Table 1. (Continued)

Pitcairnioideae				
<i>Ayensia wapanensis</i> (Maguire) L.B. Sm.	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, collected in Venezuela, Auyantepui, 2000 in N.N.; leg. Batschi (Bern) 1992, 92-9510-2, H011, det. Horres	2n = 46	-	-
<i>Deuterocohnia lorentziana</i> (Mez) Spencer & L.B. Sm.	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, s.no., ex B.G. Heidelberg (130007), det. Horres	2n = 50, ca. 100	-	-
<i>Dyckia saxatilis</i> Mez.	Wild, Brazil, Bahia; Rio de Contas, leg. Benko-Iseppon BRO-1228, det. Wanderley	2n = 50	-	-
<i>Pitcairnia atrorubens</i> (Beer) Baker	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, collected in Costa Rica, 89-16095-2, 20.07.1988 grown from seeds by Billenstein, det. Horres	2n = 50	-	-
<i>Puya mirabilis</i> (Mez.) L.B. Sm.	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 86-418-1-3, det. Horres	2n = 50	-	-
Tillandsioideae				
<i>Catopsis floribunda</i> L.B. Sm.	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, s.no., det. Horres	2n = 50	-	-
<i>Tillandsia doaksonii</i> L.B. Sm.	Cultivated, Germany, Palmengarten of the City of Frankfurt, 90-9649-4-2, det. Horres	2n = 50	n = 25, 2n = 50	Brown and Gilmartin (1989), Brown et al. (1984, 1997)

Table 2. Cytogenetic features of the Bromeliaceae analyzed as evaluated from conventional, fluorochrome, and AgNO₃ staining of mitotic cells in different stages. Legend: - = not studied; ca. = approximate number

Species	2n	Chromos. maximal sizes (µm)	Chromocenters of Interphase nuclei		Number of chromosome pairs with CMA ⁺ /DAPI terminal bands	Maximal number of nuclei with AgNO ₃ staining	Karyotype Architecture
			Form	Distribution			
Bromelioideae							
<i>Aechmea bromelifolia</i>	50	2.72–1.36	Small, spheroid or rod shapped	Irregular	2	4	decreasing size
<i>Ananas comosus</i>	50	1.38–0.83	Small, mostly spheroid	Regular	-	-	± homogeneous size
<i>Ananas nanus</i>	50	1.6–1.1	Small, spheroid to dot-like	Regular	-	-	± homogeneous size
<i>Bromelia laciniosa</i>	ca.150	1.25–0.25	Small, mostly spheroid	Irregular	-	-	± homogeneous size
<i>Debraecanthion urbanianum</i>	ca.160	1.6–0.5	Spheroid to rod shapped	Regular	-	-	± homogeneous size
<i>Fascicularia bicolor</i>	50	1.47–0.59	Small, mostly spheroid	Regular	-	-	decreasing size
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i>	50	2.06–0.88	Small, mostly spheroid	Regular	-	-	± homogeneous size
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i>	50	1.14–0.57	Small, spheroid or rod shapped	Irregular	-	2	-
<i>Greigia</i> nov. (aff. <i>G. mulfordii</i> var. <i>micrantha</i>)	50	1.71–0.86	Small, spheroid or rod shapped	Irregular	1	-	decreasing size
<i>Greigia sphacelata</i>	50	2.61–1.18	Small, spheroid or rod shapped	Regular	1	-	decreasing size
<i>Ochogavia litoralis</i>	50	1.38–0.83	Small, mostly spheroid	Regular	-	-	± homogeneous size

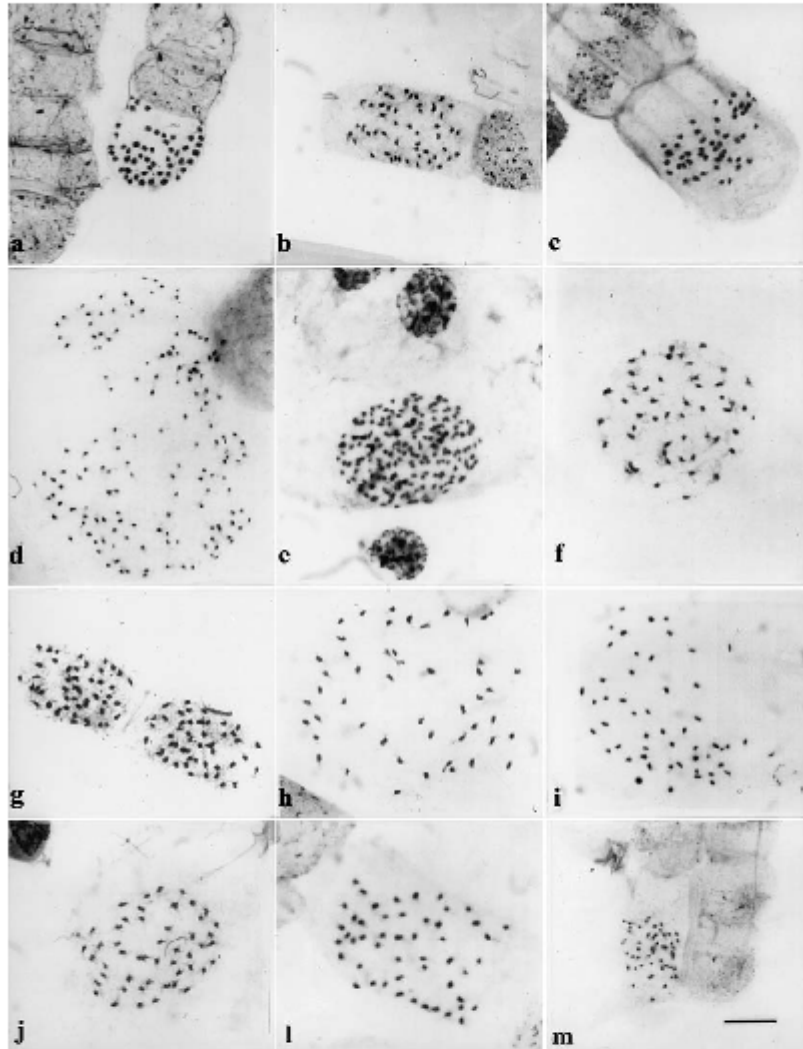


Fig. 1. Mitotic chromosomes and interphase nuclei in Bromeliaceae. a *Aechmea bromeliifolia* ($2n=50$); b-c *Ananas comosus* and *A. nanus* (both $2n=50$); d *Bromelia laevigata* ($2n=150$); e *Deinacanthus urbanianum* ($2n=ca.160$); f-g *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor* and *F. bicolor* ssp. *canaliculata* (both $2n=50$); h-i *Greigia* spec. nov. and *G. sphacelata* (both $2n=50$); j-l *Ochogavia elegans* and *O. litoralis* (both $2n=50$); m *Orthophytum disjunctum* ($2n=50$). Bar (in m) corresponds to 10 μm

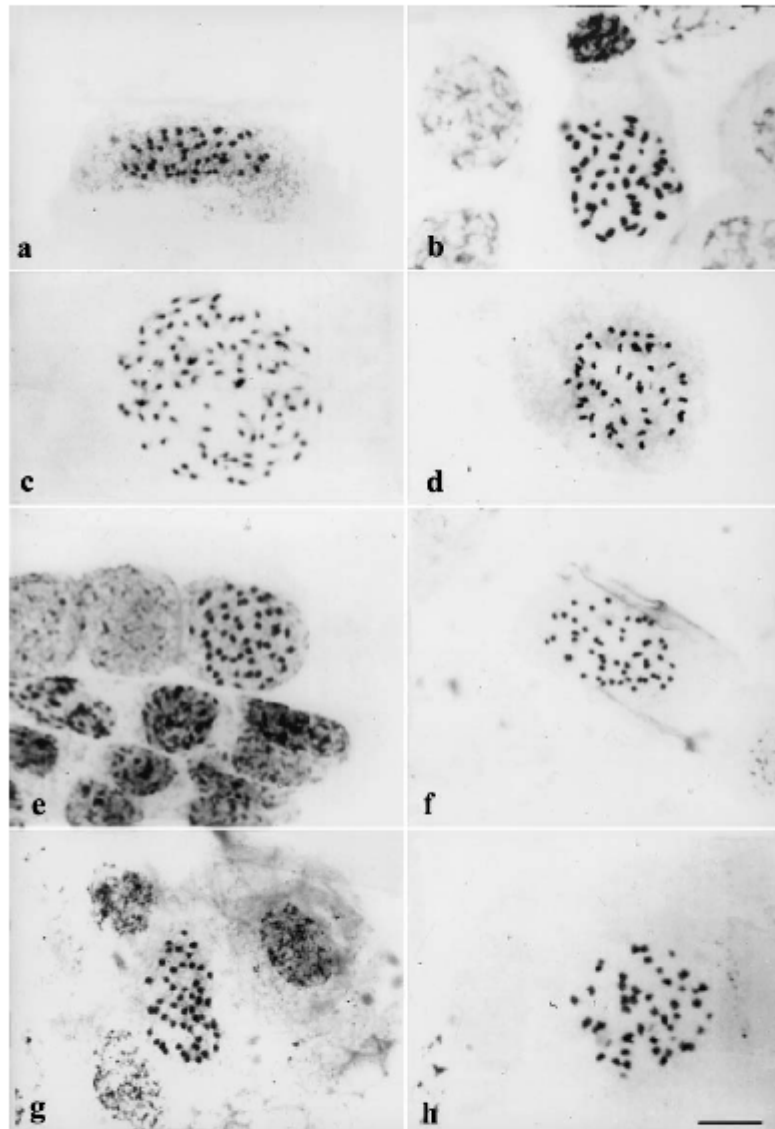


Fig. 2. Mitotic chromosomes and interphase nuclei in Bromeliaceae. a *Ayensua vulparesensis* ($2n=46$); b–c *Dexterocohnia lorentziana* ($2n=50$ and $2n=100$ respectively); d *Dyckia saxatilis* ($2n=50$); e *Pitcairnia atrorubens* ($2n=50$); f *Puya mirabilis* ($2n=50$); g *Catopsis floribunda* ($2n=50$); h *Tillandsia dodsonii* ($2n=50$). Bar (in h) corresponds to 10 μm

A single case of polyploidy was found for the subfamily Pitcairnioideae in some individuals of *Deuterocohnia lorentziana*. It is remarkable that in different individuals of this species growing side by side in pods two different chromosome numbers ($2n = 50$ or $2n = 100$; Fig. 2b-c) could be observed. Still more surprising both genomes had quite different chromosome sizes and morphology, with the diploids bearing larger chromosomes (between 2.29 and 1.14 μm) and a tendency to bimodality, with 19 larger and 6 smaller chromosome pairs (Fig. 2b) while the tetraploids presented smaller chromosomes (1.94-0.5 μm) with only two pairs of larger chromosomes (Fig. 2c). We carried out additional collection and obtained the same results. The individuals belong to the same species and could not be distinguished morphologically.

For *Ayensua waipanensis* we found $2n = 46$ (Fig. 2a), but the remaining cytological features are similar to that of the other Bromeliaceae, with small chromosomes (1.62–0.81 μm) and similar interphase nuclei structure and chromosome condensing behavior.

All studied species had chromosomes of small size, with lengths varying between 2.72 and 0.5 μm . The larger chromosomes were observed in *Aechmea bromeliifolia* (2.72–1.36 μm ; Fig. 1a) and the smaller in *Greigia* aff. *mulfordii* var. *micrantha* (1.14–0.57 μm ; Fig. 1h), both with $2n = 50$, followed by *Bromelia laciniata* ($2n = \text{ca.}150$) with sizes between 1.25 and 0.25 μm (Fig. 1d).

Most species presented chromosomes of similar sizes (i.e. regular karyotypes), as shown in *Ananas comosus* (Fig. 1b), *A. nanus* (Fig. 1c), *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor* (Fig. 1f) and *O. litoralis* (Fig. 1i).

After C banding in two species (*Deinacanthon urbanianum* and *Dyckia saxatilis*) no heterochromatic bands could be observed (data not shown). On the other hand, the triple staining with CMA/Actinomycin/DAPI revealed one to two pairs with CMA⁺/DAPI⁻ terminal (or subterminal) bands in three members of the Bromelioideae analyzed: *Aechmea bromeliifolia* (2 pairs; Fig. 3e-f); *Greigia sphaecelata* (1 pair;

Fig. 3a-b) and in *Ochagavia litoralis* (1 pair; Fig. 3c-d). Considering the small chromosome sizes and in order to increase C band resolution, a combination of C banding and CMA/DAPI staining was performed in *Aechmea bromeliifolia* (in this study the species with larger chromosomes) but only faint DAPI bands could be observed in few cells (data not shown), maybe due to differential condensing chromosome regions in late prometaphase.

Silver staining in interphase nuclei was carried out for two species (*Aechmea bromeliifolia* and *Pitcairnia atrovirens*) revealing a maximal number of four nucleoli in the first and two in the second species. Two pairs of satellited chromosomes could be observed in *Greigia* aff. *mulfordii* var. *micrantha* and also in *Dyckia saxatilis*.

This is the first report presenting photomicrographs of mitotic chromosomes in Bromeliaceae. Due to the small size, the karyotype architecture was described only for the species with good spreads of condensed metaphase chromosomes. General features observed are presented in Table 2. All members of subfamily Bromelioideae analyzed showed symmetric karyotypes with chromosomes of regular size, similar to the only Tillandsioideae studied (*Tillandsia dodsonii*). It is noteworthy that of four Pitcairnioideae studied, only a single species presented regular karyotypes (chromosomes with similar sizes), with the remaining three presenting a tendency to bimodality (Table 2).

Discussion

Considering the similarities regarding the interphase nuclei structure, the condensing behavior and the chromosome sizes, Bromeliaceae can be considered a natural group.

As shown in Table 1, there were previous counts for only four of the 19 taxa analyzed in the present work. Our results confirmed previous reports of Brown et al. (1997) for *Aechmea bromeliifolia* ($2n = 50$) and of Brown and Gilmartin (1989) and Brown et al. (1997) for *Tillandsia dodsonii* ($n = 25$; $2n = 50$). Our

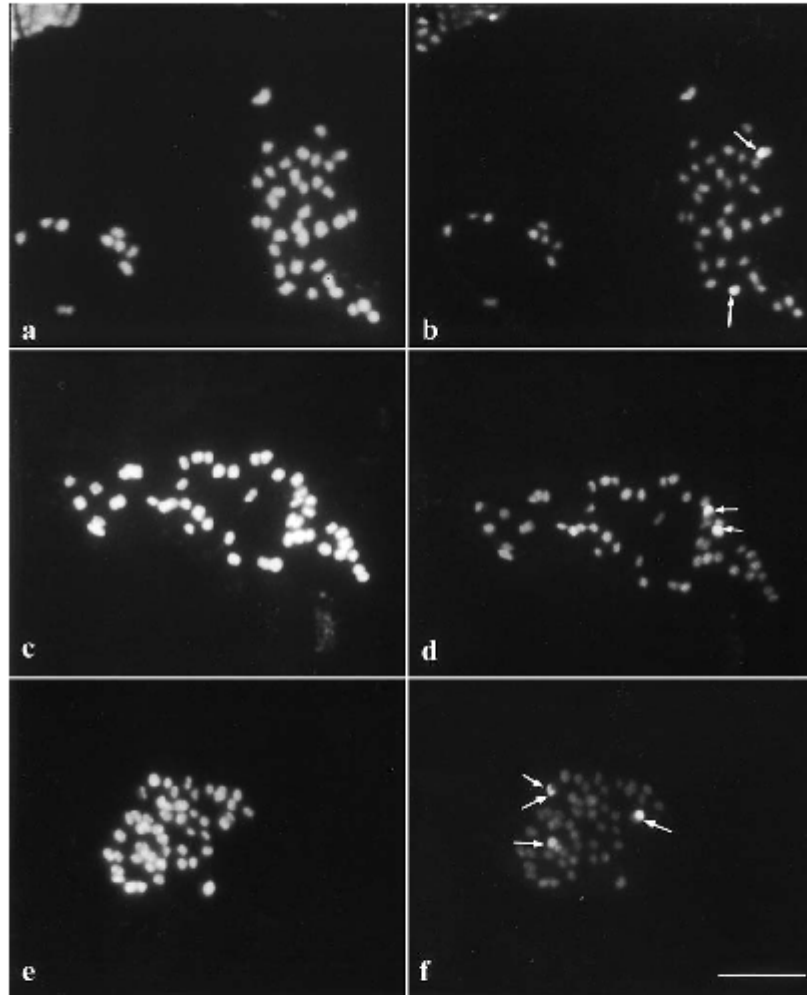


Fig. 3. Metaphase chromosomes of Bromeliaceae after sequential staining with the fluorochromes DAPI/AMD/CMA₃. a-b *Greigia sphacelata*; c-d *Ochagavia littoralis*; e-f *Aechmea bromeliifolia*. Arrows indicate CMA⁺ bands. Bar (in f) corresponds to 10 μ m

observation of small chromosomes of similar sizes in *Bromelia laciniosa* with $2n = \text{ca.}150$ also confirms the single counting for this species carried out in another Brazilian popu-

lation collected in Bahia (Cotias-de-Oliveira et al. 2000).

For almost all ten genera with previous reports we found similar chromosome num-

bers as reported for related species, with prevalence of $n = 25/2n = 50$. Deviating numbers have been all generated by the classical microtome section technique (e.g. Billings 1904, Lindschau 1933, Matsuura and Suto 1935, Gauthé 1965, Weiss 1965) used by most of the researchers up to 1965. After review of all chromosome numbers reported in Bromeliaceae we observed that most of the uncommon numbers reported by these authors were not confirmed in later studies, suggesting that they should be considered carefully. This is serious when considering that of the about 220 species previously studied, around 80 are referred only in studies published before 1965, revealing that recounts for this family are as important as new chromosome counts.

The genus *Ananas* showed a uniform karyotype with regular chromosomes in both species analyzed (*A. comosus* and *A. nanus*, both with $2n = 50$). Tetraploid specimens ($2n = 100$) have been reported in *A. macrodonates* (= *Pseudananas saganarius* (Arruda) Camargo), while triploids ($2n = 75$) and tetraploids ($2n = 100$) have also been found in *A. comosus* (Collins and Kerns 1931, 1936, 1938; Lin et al. 1987). A single case of aneuploidy in *A. ananassoides* was published with $2n = 48$ (Lin et al. 1987), maybe due to crossing experiments for breeding purposes.

Ayensua uaipanensis, a monotypic genus currently placed in Pitcairnioideae (Smith and Till 1998) presented $2n = 46$ chromosomes, that disagrees with the basic number $x = 25$ found in most Bromeliaceae. This species is native to two Tepuis of the Guayana Highlands and is also characterized by particular leaf anatomical features (Horres and Zizka 1995). It is notable that *Ayensua* was first placed in Velloziaceae (Maguire and Wurdack 1957) before being identified to be a bromeliad (Ayensu 1969, Smith 1969). Recently molecular analyses of *trnL* intron sequences of the chloroplast genome (Horres et al. 2000) positioned *Ayensua* together with *Brocchinia* as a basal clade with sister group relationship to the remainder of the family. The subfamilial position of the genus *Brocchinia* has also been

discussed. *Brocchinia* is the only genus of the monophyletic tribe Brocchinieae (Varadarajan and Gilmartin 1988), and is currently placed in the Pitcairnioideae (Smith and Till 1998), even though this species display some characters typical for the subfamily Tillandsioideae (Benzing 2000). The single count reported for this genus was carried out by Oberprieler and Vogt (1993) that reported $2n = 18$ for *B. cinerea* (Delile) Vis. Unfortunately we were not able to analyze cytogenetic features of *Brocchinia* up to now. Our results for *Ayensua* reveal that despite the contrasting chromosome numbers remaining features as chromosome size, condensing behavior and the interphase nuclei features are in accordance with those observed in other Bromeliaceae. On the other hand, these features are also present in other monocot families like Velloziaceae (Franklin-de-Melo et al. 1997) and Xyridaceae (Benko-Iseppon and Wanderley 2002). Molecular data clearly place *Ayensua* within *Brocchinia* (Horres et al. 2000, Horres et al. in print, Givnish et al. in print) so that the study of cytological features within *Ayensua/Brocchinia* is a very interesting case study for evolutionary trends within Bromeliaceae.

The observation of two different ploidy levels in morphologically undistinguishable individuals of *Deuterocohnia lorentziana* ($2n = 50, 150$; growing side by side in the same pot) is surprising, especially considering the differences in chromosome sizes and morphology (Table 2). While the diploids presented larger chromosomes (between 2.29 and 1.14 μm) and a tendency to bimodality (19 larger and 6 smaller chromosome pairs) the tetraploids presented smaller chromosomes (1.94 – 0.5 μm) with only two pairs of larger chromosomes. These observations suggest that some sequences were eliminated from the genome during the process of polyploidization, a phenomenon previously observed in other families of Angiosperms (e.g. Souza and Benko-Iseppon 2004). Evidences of sequence elimination during polyploidization processes have been shown before, suggesting that polyploidy-induced sequence elimination is a directed, non

random process (Feldman et al. 1997, Liu et al. 1998). Since the plants analyzed in this study have been grown from seeds, one cannot exclude the possibility of interspecific out crossing in the genesis of the polyploidization event, reinforcing the importance of hybridization in the evolution of Bromeliaceae.

Considering the general features of the karyotypes that represent different ploidy levels in Bromeliaceae (in the present work the three levels $2n=50$, $2n=100$ and $2n=150-160$ could be observed) regarding chromosome sizes two trends may be identified: (I) generally larger chromosomes in lower ploidy levels and smaller in higher ploidy levels and (II) lower contrast between maximal and minimal chromosome sizes in polyploids than in diploids. Taking these evidences into account one may suppose that some chromatin elimination occurred in the course of polyploidization events during the evolution of Bromeliaceae. This hypothesis should be evaluated with a larger number of species in the future.

No B chromosomes have been observed in our study, even though Cotias-de-Oliveira et al. (2000) have reported their observation, as in *Cryptanthus bahianus* L.B. Sm. ($2n=34+1-4B$) and *Hohenbergia* aff. *ulticulosa* Ule ($2n=50+2B$).

Marchant (1967) observed two groups of chromosomes of different sizes in some species, characterizing bimodal karyotypes. In our study some discrete bimodal karyotypes have been observed as in *Deuterocohnia lorentziana* ($2n=50$). Studies of karyotype in Bromeliaceae revealed bimodality especially in Tillandsioideae (genera *Tillandsia* and *Vriesea*), and also as a tendency in Bromelioideae (Brown and Gilmartin 1986, 1989). In our study bimodal karyotypes were observed in two species of Pitcairnioideae (*Deuterocohnia lorentziana* and *Puya mirabilis*; Table 2), but not in the studied members of Bromelioideae and Tillandsioideae. An evaluation of a large number of species from all three subfamilies should be carried out in order to evaluate if this feature could represent an evolutionary

trend specific to a given subfamily, as suggested before.

Since the Bromeliaceae are conservative regarding chromosome base numbers, an evaluation of heterochromatin evolution could be helpful to the understanding of infrafamilial relationships.

After the triple staining with CMA₃/Actinomycin/DAPI one to two CMA⁺/DAPI⁻ bands could be observed in the three studied species (see Table 2) probably corresponding to the NOR-associated heterochromatin. No additional C bands could be observed in *Deinacanthon urbanianum* and *Dyckia saxatilis*. Also the attempt to associate C banding with CMA/DAPI staining, performed in *Aechmea bromeliifolia* (the species with larger chromosomes in the present study) revealed no heterochromatic bands. These evidences suggest that Bromeliaceae are relatively poor in heterochromatin, a typical feature of plants with small chromosome sizes. This is also confirmed by the observations of interphase nuclei structure, with most species presenting quite small chromocenters.

A maximum number of two satellited chromosome pairs was observed in *Greigia* aff. *mufordii* var. *micrantha* and in the diploid individuals of *Deuterocohnia lorentziana*. The silver (AgNO₃) staining also confirmed the assumption that CMA⁺/DAPI⁻ bands correspond to the NORs. This method stains the nucleoli of the NO-chromosomes that are active in the latest interphase, and revealed a maximum of four nuclei for *Dyckia saxatilis* (also with two pairs with CMA⁺/DAPI⁻ terminal bands). It is assumed that each chromosome set originally presented a single pair of NO-chromosomes (Stebbins 1971), but this number normally increases during polyploidization. The presence of two pairs of such chromosomes may confirm the theory that the Bromeliaceae are paleopolyploids with base chromosome number $x=25$ that probably evolved from hybridization of species with lower ploidy levels not available anymore (Brown and Gilmartin 1989, Brown et al. 1997).

A very frequent cytological trend in angiosperms is dysploidy. It has been defined as a change in chromosome number due to structural rearrangements, with occurrence in many other monocotyledonous families (Franklin-de-Melo et al. 1997, Guerra 2000, Benko-Iseppon and Wanderley 2002). The available chromosome data for Bromeliaceae reveals a high importance of polyploidy in the evolution of the family with an almost complete lack of dysploid changes. Additionally the prevalence of the number $2n = 50$ (and its relative genome size) may represent the ideal (i.e. most successful) character combination for this family, indicating that hybridization events resulted mainly in individuals that maintained the same ploidy level as the parental species in the course of species diversification within this family.

Recently the reproductive biology of hybrid bromeliads was studied in natural populations of *Pitcairnia* species, with hybrids bearing intermediate features relatively to the parents (Wendt et al. 2001). The genetic variability was also investigated using isoenzymatic polymorphisms in genotypes of *Pitcairnia geykesii* revealing a high diversity level within species distributed in different populations of inselbergs (Sarhou et al. 2001). The karyological evaluation of such natural hybrids, including modern methods as GISH (genomic *in situ* hybridization) could bring interesting evidences for the understanding of chromosome speciation processes within this family.

In view of the presented features and up to date literature data, the karyological evolution in Bromeliaceae can be summarized by: (i) conservation regarding interphase nuclei structure and chromosome condensing behavior; (ii) limited chromosome number diversification with dominance of $2n = 50$, with few exceptions; (iii) minute chromosomes with low amount of heterochromatin; (iv) presence of one to two pairs of NOR-bearing chromosomes in species with $2n = 50$, suggesting that this ploidy level corresponds to the original tetraploid level; (v) presence of bimodal karyotypes in some diploid species ($2n = 50$) with

polyploids ($2n = 100, 150, 160$) showing smaller chromosomes of similar sizes.

The present work shows that, despite the importance of chromosome numbers, the aggregation of additional karyological features in the evaluation of Bromeliaceae may bring very interesting evidences about the phylogenetic relationships of its members and should be considered as a useful tool for the understanding of evolutionary trends in the family.

The authors gratefully acknowledge Dr. Maria das Graças Wanderley for identification of some species and interesting discussions. To Dr. Reginaldo de Carvalho and Ms. Maria Rita Sales-de-Barros we thank for interesting discussions and collecting of specimens. To Claudete Marques da Silva we thank for technical help. We acknowledge the Palmengarten of the City of Frankfurt for the permission to collect biological material in their greenhouses. This study was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, Grant no. 478895/2003-8), CAPES (Master Fellowship, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), and BMZ (Bundesministerium für Technische Zusammenarbeit, Germany).

References

- Ayensu E. S. (1969) The identity of *Vellozia ualpanensis*. Anatomical evidence. Mem. New York Bot. Gard. 18: 291-298.
- Benko-Iseppon A. M., Morawetz W. (2000) Viburnales: Cytological features and a new circumscription. Taxon 49: 5-16.
- Benko-Iseppon A. M., Wanderley M. G. L. (2002) Cytotaxonomy and evolution of *Xyris* (Xyridaceae). Bot. J. Linn. Soc. 138: 245-252.
- Benzing D. H. (2000) Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Billings F. W. (1904) A study of *Tillandsia usneoides*. Bot. Gaz. 38: 99-121.
- Bhowmik G. (1977) Meiosis in two varieties of pineapple. Indian J. Genet. Pl. Breed. 37: 1-4.
- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1983) Chromosomes of bromeliads. J. Bromeliad Soc. 33: 171-172.
- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1986) Chromosomes of the Bromeliaceae. Selbyana 9: 88-93.

- Brown G. K., Gilmartin A. J. (1989) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Amer. J. Bot.* 76: 657–665.
- Brown G. K., Palaci C. A., Luther H. E. (1997) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Selbyana* 18: 85–88.
- Brown G. K., Varadarajan G. S., Gilmartin A. J. (1984) Chromosomes Numbers Reports LXXXV. *Taxon* 33: 756–760.
- Chen R. Y., Li X. L., Song W. Q., Lin S. H. (1985) Studies on chromosome of tropical fruit trees in China. *J. Wuhan Bot. Res.* 3: 423–428.
- Collins J. L., Kems K. R. (1931) Genetic studies in pineapples. I. A preliminary report upon the chromosome number and meiosis in seven pineapples varieties. (*Ananas sativus* Lindl.) and in *Bromelia pinguin* L. *J. Heredity* 225: 139–142.
- Collins J. L., Kems K. R. (1936) Origin and nature of tetraploid pineapples. *Amer. Naturalist* 726: 45.
- Collins J. L., Kems K. R. (1938) The origin and breeding characteristics of polyploid pineapples *Ananas comosus* (L.) Merr. *Genetics* 23: 145.
- Cotias-de-Oliveira A. L. P., Assis J. G. A., Bellintani M. C., Andrade J. C. S., Guedes M. L. S. (2000) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Gen. Moec. Biol.* 23: 173–177.
- Deumling B., Greilhuber J. (1982) Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla sibirica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma* 84: 535–555.
- Feldman M., Lui B., Segal G., Abbo S., Levy A. A., Vega J. M. (1997) Rapid elimination of low copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381–1387.
- Franklin de Melo N., Guerra M., Benko-Iseppon A. M., Menezes N. L. (1997) Cytogenetics and cytotaxonomy of Velloziaceae. *Pl. Syst. Evol.* 204: 257–273.
- Gauthé J. (1965) Contribution à l'étude caryologique des Tillandsiées. *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot.* 1: 39–59.
- Gentry A. H. (1993) A field guide of the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. Conservation International. Washington D.C.
- Guerra M. (2000) Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson K. L., Morrison D. A. (eds.) *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne, pp. 127–136.
- Hizume M., Sato S., Tanaka A. (1980) A highly reproducible method for nucleolus organizing regions staining in plants. *Stain Technol.* 55: 87–90.
- Horres R., Zizka G. (1995) Untersuchungen zur Blattsukkulenz bei Bromeliaceae. *Beitr. Biol. Pflanz.* 69: 43–76.
- Horres R., Zizka G., Kahl G., Weising K. (2000) Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL(UAA)* intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biol.* 2: 306–315.
- Horres R., Schulte K., Weising K., Zizka G. (2005) Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies. In: Columbus, J. T., Friar, E. A., Hamilton, C. W., Porter, J. M., Simpson, M. G. (eds.) *Monocots: comparative biology and evolution*. Rancho Santa Botanic Garden, Claremont, Calif (in press).
- Givnish T. J., Millam K. C., Evans T. M., Pires J. C., Berry P. E., Sytsma K. J. (2005) Phylogeny, biogeography, and ecological evolution in Bromeliaceae insights from *ndhF* sequences. In: Columbus, J. T., Friar, E. A., Hamilton, C. W., Porter, J. M., Simpson, M. G. (eds.) *Monocots: comparative biology and evolution*. Rancho Santa Botanic Garden, Claremont, Calif. (in press).
- Lin B. Y., Ritschel P. S., Ferreira F. R. (1987) Número cromossômico de exemplares da família Bromeliaceae. *Rev. Bras. Frutic.* 9: 49–55.
- Lindschau M. (1933) Beiträge zur Zytologie der Bromeliaceae. *Planta* 3: 506–530.
- Liu B., Vega J. M., Feldman M. (1998) Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low copy coding DNA sequences. *Genome* 41: 535–542.
- Maguire B., Wurdack J. J. (1957) *Barbarea uaipanensis*. *Mem. N.Y. Bot. Gard.* 9: 477–478.
- Matsuura H., Suto H. (1935) Contributions to the idiogram study in phanerogamous plants. I. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.* 5: 33–75.
- Marchant C. J. (1967) Chromosome evolution in the Bromeliaceae. *Kew Bull.* 21: 161–168.
- McWilliams E. (1974) Chromosome number and evolution. In: Smith L. B., Downs R. J. (eds.) *Bromeliaceae (Pitcairnioideae)*. *Flora Neotro-*

- pica Monographs. Hafner Press, New York, vol. 14, pp. 33–40.
- Oberprieler C., Vogt R. (1993) Chromosomes of North African Phanerogams. II. *Wilddenowia* 23: 211–238.
- Sarthou C., Samadi S., Boisselier-Dubayle M. (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *Amer. J. Bot.* 88: 861–868.
- Schwarzacher T., Ambros P., Schweizer D. (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl. Syst. Evol.* 134: 293–297.
- Schweizer D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307–324.
- Smith L. B. (1969) Bromeliaceae. In: Maguire B., Wurdack J. (eds.) *The botany of the Guayana Highland*. Part VIII. New York Botanical Garden, New York.
- Smith L. B., Till W. (1998) Bromeliaceae. In: Kubitzki K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Springer, Berlin Heidelberg New York, vol. 4, pp. 74–99.
- Souza M. G. C., Benko-Iseppon A. M. (2004) Cytogenetics and banding patterns on Caesalpinioideae and Papilionoideae native from Pará, Amazonas, Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 144: 181–191.
- Stebbins G. L. (1971) *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London.
- Varadarajan G. S., Gilmartin A. J. (1988) Phylogenetic relationships of groups of genera within the subfamily Pitcarnioideae (Bromeliaceae). *Syst. Bot.* 13: 283–293.
- Weiss H. E. (1965) Étude caryologique et cytotoxicologique de quelques Broméliacées. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. B. Bot.* 1: 9–38.
- Wendt T., Canela M. B. F., Faria A. P. G., Rios R. I. (2001) Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Amer. J. Bot.* 88: 1760–1767.

Addresses of the authors: Ms. Jailson Gitaí and Prof. Dr. Ana Maria Benko-Iseppon (corresponding author; e-mail: celisep@hotmail.com.br and jailsongitai@yahoo.com.br), Universidade Federal de Pernambuco, UFPE/CCB/Genética, Av. Prof. Moraes Rego, s/n., 50732-970, Recife, PE, Brazil. Dr. Ralf Horres, Department of Botany and Molecular Evolution, Research Institute Senckenberg, Frankfurt am Main, Germany (e-mail: Ralf.Horres@senckenberg.de).

6.2 Instrução para Autores

6.2 Revista *Plant Systematics and Evolution*

Instructions for Authors

Plant Systematics and Evolution

Manuscripts Submission

Manuscripts should be submitted to:

<http://www.editorialmanager.com/plsy>

The online manuscript submission and review system for the journal offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "Contact us" from the tool bar.

General

Only papers written in English will be considered. Maximum length is twenty printed pages including tables and figures.

Papers submitted should only comprise new and important results. They must be written in concise form and in clear, grammatical language.

Papers sent to the authors for revision should be returned within two months; otherwise they will be treated as new submissions.

It is essential that manuscripts be submitted in their final form ready for printing, with the approximate desired position of all figures and tables marked in the margins. To facilitate communication between authors, editors and publisher, the telephone and fax numbers and/or e-mail address of the corresponding author should be provided in the accompanying letter. The full names and addresses of the authors must also be included at the end of the manuscript.

Text

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

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

Key words. A list of up to 8 key words, including the complete botanical name and common name (if any) of the plant material, must be supplied. Other key words should include the topic investigated and any special techniques used.

A running title (up to 75 characters) should be suggested by the author(s).

Headings. Main headings (Introduction, Materials and methods, etc.) should be placed on separate lines.

Small print. Footnotes, Material and methods sections, Acknowledgements, References, Tables, and figure legends should be marked for small print.

Scientific names. Italics should be used for names at generic and lower taxonomic rank, but not for names at higher

ranks.

Units and symbols. Temperatures may be expressed in degrees Celsius, time in seconds (s), minutes (min), hours (h), days (d). Otherwise, the International System of Units (SI) should be used.

Standard chemical symbols and abbreviations for chemical names may be used if they are concise and widely accepted, see *Eur J Biochem* (1993) 213: 1-3
Gene symbols must be written in lower case italics as e. g. *rbcl*, *matK*.

Protein symbols designated on the basis of gene names are written with first or all letters capitalized and in roman type.

Footnotes to the text should be numbered consecutively.

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

Example: ... has been investigated by Sorensson (1993) and Sorensson and Brewbaker (1994) ...Yang et al. (1992) have shown

The list of references should include only publications cited in the text. They should be in alphabetical order by name of the first author with all authors and the complete title of each work cited. Citation must obey the same rules as for the main text. The second and subsequent lines are indented.

Examples are:

a) Articles from journals and other serial publications: Knapp S., Persson V., Blackmore S. (1998) Pollen morphology and functional dioecy in *Solanum* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 210: 113–139.

b) Articles from non-serial collective publications (symposia volumes, encyclopedias, etc.) and books: Verma D. P. S., Nadler K. (1984) Legume-Rhizobium symbiosis: host's point of view. In: Verma D. P. S., Hohn T. (eds.) *Genes involved in microbe-plant interactions*. Springer, Wien New York, pp. 57–93 (*Plant gene research*).

For standardization of formats, authors are requested to adhere to the following: in Literature Cited, use of abbreviations of journals contained in B-P-H (G. H. M. Lawrence, A. F. G. Buchheim, G. S. Daniels and H. Dolezal, eds., 1968, *Botanico-Periodicum-Huntianum*, Hunt Botanical Library, Pittsburgh), including *Supplementum*; (G. D. R. Bridson and E. R. Smith, eds., 1991, B-P-H/S, Hunt Institute for Botanical Documentation, Pittsburgh); in taxonomic treatments, use of book abbreviations from TL-II (F. A. Stafleu and R. S. Cowan, 1976–1988, *Taxonomic*

Literature, ed. 2, vols. 1–7, Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht; plus *Supplements*); throughout the text, use of taxonomic author abbreviations from *Authors of Plant Names* (R. K. Brummitt and C. E. Powell, eds., 1992, Royal Botanic Gardens, Kew).

It is recommended that the work be divided into Introduction (without heading), Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (without heading) and References.

Details must be given about origin and determination of each organism studied. Scientific (Latin) names should conform to the international rules of nomenclature. Authors of species and infraspecific taxa investigated must be given either when first mentioned in text or included all in one of the tables. In principal, voucher specimens are to be deposited in a large public herbarium quoted using the abbreviation given in the "Index Herbariorum".

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

Tables

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

Illustrations

The number of illustrations should be kept at the minimum needed to clarify the text. Double documentation of the

same points in figures and tables is not acceptable.

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

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

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

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

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular 'subscription-based' article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular subscription model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

www.springeronline.com/openchoice

Proofs, Offprints

For all papers page proofs will be sent as PDF files to the authors. Misprints only should be corrected, and no changes of contents or style should be made on the page proofs. Costs caused by changes or revisions in the page proofs – other than those resulting from printer's errors – exceeding 10 per cent of the typesetting costs will be charged to the author.

Springer will supply the corresponding author with one PDF-file of each paper free of charge for your own personal use. Additional offprints may be ordered at cost price. A price list and an order form will be sent with the proofs. The filled – in order form should accompany the corrected proofs when they are returned.

Online First Publication

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

Communication

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

SpringerWienNewYork
Production Department
Sachsenplatz 4-6
P.O. Box 89
1201 Wien
Austria
Fax +43/1/330 24 26-64
e-mail: petra.naschenweng@springer.at

GUIDELINES FOR AUTHORS

Submission and review process. — All contributions submitted for publication in *Taxon* must be sent to the Editor-in-chief of *Taxon* (Institute of Botany, University of Vienna, Rennweg 14, 1030 Vienna, AUSTRIA, editors@iapt-taxon.org), or to a member of the Editorial board (see inside cover of journal or IAPT website). Items for book reviews are to be sent directly to the column editor, Rudi Schmid.

Manuscripts must be written in English and are to be submitted in electronic form. Electronic versions should be provided for text and tables in Word-compatible formats (.doc), .txt or .rtf-files, for figures as separate pdf or jpg files and can be sent as e-mail attachments [editors@iapt-taxon.org], on floppy discs, CD ROMs, or ZIP cartridges. All material must be double-spaced, including summary and literature cited, with margins of at least 3 cm on all sides of the page. Pages should be numbered consecutively. Final versions of manuscripts and figures are needed in a digital format with figures, figure legends and tables as separate files. Full instructions can be found on p. 2. Please include in your cover letter the information whether one of the authors is an individual member of IAPT (see also page charges).

All original papers will be sent for review to 2–3 experts in the field; articles for the nomenclature section or papers with an important nomenclatural component will be sent after review to the Nomenclature Editors, and only after their editorial review will materials be returned to the authors. Other contributions will be reviewed by the editors. Proposals are handled by the Nomenclature Editors. Authors will be asked to modify or rewrite their texts to accommodate suggestions of the reviewers and editors and to conform with requirements of *Taxon*.

Online access for tracking the manuscript review process. — Authors can track the status of their manuscript via the Internet on the URL <http://www.botanik.univie.ac.at/iapt/taxon/manuscripts/>. Authors will receive, together with

acknowledgement of receipt of their manuscript, information about the Online User and Online Password. This will enable them to access their manuscript, and to obtain information about when the manuscript has been sent and returned from the reviewers and/or editors. Reviewers and editors also will have access to the database via User and Password identifications, providing them information about manuscripts for which they are in charge. Authors must not send a revised version until they have received comments from the Editors.

Page charges. — The following page charges apply: Non-IAPT members: 4 free printed pages, then \$50 per page. IAPT individual members: no page charges.

Reprints. — Reprints are available as free pdf files and can be downloaded from the Internet version of *Taxon*: login at <http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax> or and register for *Taxon* online access (for detailed instructions for login at our website: <http://www.botanik.univie.ac.at/iapt/taxon/index.htm>, go to *Taxon* online. With this pdf file, an unlimited number of copies are available. Authors who are IAPT members have free access. Proposals are free for all users. Authors who are not IAPT members will receive the pdf directly from the editors (via e-mail or ftp).

If hard-copy reprints are desired, they must be ordered together with the proofs directly from the printer, Allen Press, Inc. Order forms will be sent together with the proofs.

By submitting a contribution for publication, authors tacitly agree to (1) not submit in parallel the same manuscript to another journal, and (2) assign the copyright to the publishers of *Taxon* (such assignment taking effect as soon as the author receives written confirmation of acceptance of the manuscript). Rejected manuscripts will be discarded, except for original artwork and photographs, which will be returned to the authors.

Original papers. — *Taxon* publishes original papers deal-

TAXON

■ MANUSCRIPT ADMINISTRATION



Fig. 1. Screenshot of entry into the manuscript database in the Internet.

■ MANUSCRIPT

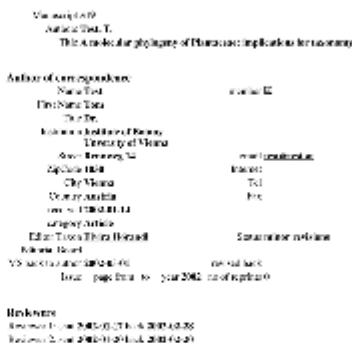


Fig. 2. Screenshot of an author's view of manuscript status in the Internet database.

ing with systematic botany in its widest sense. The emphasis is on articles with new and important results of a general nature: taxonomy, systematics of higher categories, evolution, methodology, bibliography, biodiversity, biography, biosystematics, chemotaxonomy, conservation, history, molecular botany, nomenclature, numerical taxonomy, palaeobotany, palynology, typification, and related subjects. Original articles are published in various columns, e.g., "Molecular phylogenetics", "Taxonomy", "Methods and Techniques", "Herbaria and Institutions", "Biodiversity and Conservation", etc.

Authors are not encouraged to submit manuscripts including new classifications without underlying original (molecular, morphological, etc.) analyses. If all original analyses are already submitted or published in other journals, the review process will not be started until these papers are published, and for the *Taxon* manuscript a summary of basic analyses is requested. Submission of new classifications and original analyses in parallel manuscripts is encouraged.

Descriptions or taxonomic papers of single species will be accepted only if results are presented in a broader context of nearest relatives and/or if a broader array of methodical approaches is used. Manuscripts of a narrow scope will be rejected without review by the editors.

Points of View. — Challenging new ideas, or new challenges to extant ones, may be presented in the "Points of View" column. Editorial requirements are the same as for articles, except that no summary is required. Tables, illustrations, and literature cited should be kept to a minimum, the ideal length of such contributions being 2–4 printed pages. Publication of dissenting or supporting views by others is encouraged. No external reviews for these manuscripts will usually be solicited; acceptance will be granted by the Editors, the main criteria being interest and timeliness of the topic.

Letters to the editors. — The Letters column welcomes short pieces that reflect personal (or collective) opinions that are not documented in detail and that would be inappropriate for Points of View, a full article, or the more newsy items in *Plant Systematics World*. We reserve the right to select and publish letters that, in our view, will be most interesting to the readers.

Nomenclature proposals. — Detailed guidelines for proposals to conserve and/or reject names are published separately [see *Taxon* 52(1), p. 183] and differ in important respects from those that follow. Proposals to amend the *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN, the St. Louis Code, *Regnum Veg.* 138) should follow instructions published by McNeill & Staessy (in *Taxon* 50: 557–558, 2001). All proposals will be reviewed both by the Editors and the Nomenclature Editor (John McNeill, Edinburgh), and may be modified to conform to the rules and requirements of botanical nomenclature in consultation with the author. Please provide an electronic version of your proposal as Word PC-version (.doc), .txt or .rtf-files or as e-mail attachment [editors@iapt-taxon.org].

Preparation of text. — Consult the 52(1) issue of *Taxon* and follow current format. For original papers, provide a Summary and 5–6 keywords (indicating taxa, methods, main topic, geographic region) and try to structure the manuscript into the main sections Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Literature Cited. Addresses of all coauthors, which must be given in full, including e-mail addresses (if available), should be

given as a footnote. Keep title and subheadings short and informative. Only two subheading categories are encouraged: the primary ones standing alone, the secondary ones being followed by a period and a long dash (or triple hyphen), with the subsequent text running on. Authors are requested to check correct spelling and authors of scientific names before submission, and abbreviate authors of scientific plant names in conformity with Brummitt & Powell, *Authors of Plant Names* [Kew, 1992; also incorporated in The *International Plant Names Index* (IPNI), see the website <http://www.ipni.org/>]. Authors of scientific names should be given at least once in the text or in tables.

A single blank must always follow after a period, colon, semicolon, or comma (except within numerals and standard abbreviations such as e.g., i.e., l.c., s.s., s.l.): "Brown, A. J." not "Brown, A.J."; "32: 120–130" not "32:120-130"; and between numerals and units of measure: "2 mm" not "2mm", but "5%" not "5 %"; $x = 5$ not $x=5$. Use a double hyphen between page numbers and measurements, "120–130" not "120-130".

Figures and Tables. — Figures should be sharp, good in contrast, and designed to fit the full page width after reduction (16.6 cm); with caption they may occupy the full page length (19.9 cm). It is mandatory that scale(s) be included in the illustration itself. Please use Arial fonts for all legends included in the figures and be certain that after reduction all lettering and symbols are clear and easy to read. Hard-copy figures should be mounted separately on solid A4 or letter size white board, to be mailed flat (never folded or rolled). All illustrations must be numbered consecutively using Arabic numerals. They should be cited "Fig. 1" or "Figs. 1–4" in sequential order. Plates comprising several figures or photographs should have internal numbers or capital letters (A, B, C) for reference (please use Arial fonts). Legends should be appended separately at the end of the manuscript. Photographs should be sent in triplicate. Do not mount line illustrations (drawings, maps, graphs, or diagrams) and half-tones (photographs) on the same plate. Photographs, especially those of herbarium specimens, must be of exceptional quality, good contrast, and submitted as close to *Taxon* page size as possible, avoiding "landscape" (i.e., horizontal) orientation. Normally only previously unpublished illustrations are acceptable. If circumstances require the reproduction of copyright material, the authors are responsible for obtaining written permission from the copyright holder (a signed permission to accompany the revised typescript). **Digital versions of illustrations should be prepared as follows:**

For electronic submission, please send figures each in a separate file in .jpg or .pdf files (size of a single file should not exceed 200 KB).

After acceptance, please prepare the final version as follows: photographs must be scanned at 300 dpi and saved as .tif format. Colour figures should be saved in CMYK rather than RGB (optimize colour in CMYK mode). Computer-generated line graphics (trees, diagrams, etc.) should be saved in encapsulated postscript (.eps) format or in a standard vector graphic format (.cdr, .ai, .pict). Line drawings should be scanned at a resolution of at least 600 dpi and saved as .tif file. Do not submit any graphics generated in Powerpoint! Large files should be sent on a CD-ROM. Colour plates are encouraged in *Taxon*, and authors have to contribute to costs (ca. US \$300 per article). Acceptance of colour plates in articles is determined by the editors.

Tables must have an appropriate heading and must bear consecutive Arabic numerals. They should be cited "Table 1," etc. Long tables including plant materials or accessory materials should be designed as an Appendix. Such materials will be included partly in the online version of Taxon (<http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax>) at the end of each article, but will not appear in the print version.

Literature. — Each reference in the text must also be listed under "Literature Cited" and vice versa. References in the text are to be cited with author(s) and year. Where there are more than two authors, only the first should be named in the text, followed by "& al."

Examples: ...has been investigated by Miller (1993) and Miller & Maier (1994). Baker & al. (1996) have shown..., or, (Miller, 1993; Miller & Maier, 1994; Baker & al., 1996).

The list of references should be in alphabetical order by name of the first author with all authors and the complete title of each work cited. Repeat author names when the author(s) have more than one publication. Full references must be given, including city of publication and publisher for books. Titles quoted in full (e.g., of books) should have all important words capitalised.

Book titles in taxonomic synonymies should follow Stafleu & Cowan's, *Taxonomic Literature* (ed. 2 and supplements) but with capital initial letters; journal titles, both in synonymies and under "Literature Cited" in conformity with Lawrence & al., *Botanico-Periodicum-Huntianum* (Pittsburgh, 1968) and, except for the altered Cyrillic transliteration system, its *Supplement* (Pittsburgh, 1991). Titles in foreign languages must be cited in original and not in English translation; if they (and the authors) appear in non-Latin script they are to be transliterated following ISO standards (ISO-1 for Cyrillic script). Use a double hyphen between page numbers.

Examples:

- Black, H. T.** 2006. Why plant systematists like trees so much. *Theor. Appl. Cladistics* 67: 61--80.
- Brown, U. F. & Carter, I. V.** In press. The *ImageCode*---the ultimate universal system for naming plants. *Taxon* 54.
- Stuessy, T. F.** (ed.). 2006. *Systematic Botany Forever*. Univ. Cambridge Press, Cambridge.
- White, J.** 2003. How not to prepare a manuscript. Pp. 613--675 in: Roberts, P. (ed.), *The Botany Manual of Style*, ed. 26. Chicago Press, Chicago.

Citation of Specimens and Synonymies. — Voucher specimens are to be cited and deposited in a public herbarium. The following format is required: Country. Political subdivision (locality and date optional, depending on the type of study), collector(s) and number (herbarium acronym). Use herbarium acronyms of Holmgren & al. (*Index Herbariorum, Regnum Veg.* 120. 1990), and Holmgren & Holmgren (*Taxon* 49: 113--124. 2000 and subsequent updates; see also the website <http://www.nybg.org/bsci/ih/ih.html>). This format applies also when the material is tabulated. Useful conventions for citing Linnaean specimens can be found in Jarvis & al. (*Regnum Veg.* 127. 1993).

Names of new taxa must be followed immediately by the holotype indication, then by the (Latin) description or diagnosis in a separate paragraph. For all type specimens examined by the author(s), an explanation mark should be given after the herbarium acronym, e.g., (W!). Homotypic names shall form a single para-

graph, in chronological sequence, indicated with the identity sign (=) with the respective type indication at the end of each such paragraph. Heterotypic names should be listed in separate paragraphs, indicated by the equality sign (≠).

Sequence data. — DNA or protein sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.), and accession numbers must be given in the Materials and Methods (to be provided after the manuscript is accepted).

Proofs. — Proofs will be sent to the corresponding author as pdf file (together with the reprint order form as .rtf file). They must be processed immediately and returned by air mail, e-mail or fax (+43 1 4277 54099). Authors who anticipate being absent are urged to give forwarding orders or to give notice of temporary addresses (with dates). Corrections not returned within two weeks cannot usually be taken into consideration.

7.0 RESUMO

Face ao seu exotismo e diversidade, a família Bromeliaceae está entre as mais admiráveis da flora neotropical. Embora existam contagens cromossômicas para cerca de 200 espécies (10% dos membros do grupo), poucas são as análises citológicas prévias agregando informações citogenéticas adicionais, como morfologia cromossômica, caracterização de núcleos interfásicos, dos padrões de condensação cromossômica, ou técnicas de bandeamento. Do ponto de vista molecular, a maioria das inferências têm ocorrido em nível macrotaxonômico, com base na análise de seqüências nucleares e extra-nucleares, havendo poucas análises em nível infragenérico e interespecífico com marcadores moleculares. O presente estudo fornece novas evidências citogenéticas para 73 espécies, dentre as quais 48 espécies e nove gêneros analisados pela primeira vez. Os resultados apontam para uma relativa conservação quanto ao padrão de condensação (proximal em todas as espécies analisadas) e ao principal tipo de núcleo interfásico (semi-reticulado), embora existam diferenças perceptíveis na forma e distribuição dos cromocentros. A maioria das espécies apresenta cromossomos diminutos, havendo uma tendência à bimodalidade em alguns taxa analisados. Para as espécies *Aechmea aquilega* (Salisbury) Grisebach, *A. bromelifolia* (Rudge) Baker, *Ananas comosus* L. Merrill, *A. nanus* L.B.Smith, *Greigia sphacelata* (Ruiz & Pavon) Regel, *Ochagavia litoralis* (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner, *Puya coerulea* Lindley e *Tillandsia bourgarei* Baker, foram efetuadas análises com os fluorocromos CMA/DAPI, revelando predominância de heterocromatina CMA⁺/DAPI rica em GC (Guanina-Citosina) associada às RONS (regiões organizadoras de nucléolos). A coloração com nitrato de prata também foi aplicada, revelando um ou dois pares portadores de RONS nas espécies analisadas. As análises de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos Amplificados), aplicadas a 40 entidades taxonômicas do subgênero *Ortgiesia* do gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. revelaram um clado basal incluindo espécies do complexo *A. candida*-*A. coelestrix* (composto de cinco genótipos relacionados), a partir do qual as demais provavelmente derivaram, emergindo em três ramos adicionais distintos e parcialmente consistentes com as características fitogeográficas e taxonômicas conhecidas. Os resultados gerados, especialmente aqueles relacionados às espécies de classificação controversa, são discutidos no trabalho.

Palavras Chave: Coloração com fluorocromos, Subgênero *Ortgiesia*, Análise molecular AFLP.

8. ABSTRACT

The Bromeliaceae is between the most typical neotropical plant families, very admired due to its ecological and ornamental value. Bromeliads are important components of a wide range of habitats, from rain forests to dry savannas, campos rupestres and semi-arid regions. Chromosome counts are available for only 200 species (ca. 10% of its members) with few works including karyomorphological descriptions, as condensing behaviour, nuclear structure, chromosome morphology and banding patterns. Regarding molecular evaluations, most studies have been applied to solve macrotaxonomical questions, using nuclear and extra-nuclear sequences, but few analysis have been done with molecular markers to compare taxa at the intraspecific and infrageneric level. The present study brings new cytological information and chromosome counts in 73 species, among them, data for 48 species and nine genera are reported for the first time. All analyzed species presented very small chromosomes, semi-reticulated interphase nuclei and proximal chromosome condensing behavior. The fluorochrome staining with CMA/DAPI in *Aechmea aquilega* (Salisbury) Grisebach, *A. bromelifolia* (Rudge) Baker, *Ananas comosus* L. Merrill, *A. nanus* L.B.Smith, *Greigia sphacelata* (Ruiz & Pavon) Regel, *Ochagavia litoralis* (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner, *Puya coerulea* Lindley and *Tillandsia bourgarei* Baker revealed CMA⁺/DAPI⁻ (GC rich) bands probably corresponding to the NORs. The silver staining (AgNO₃) revealed one to two pairs of nuclei correspondent to the NO-chromosomes. The AFLP procedure (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) including 1265 characters was applied to 40 species of the subgenus *Ortgiesia* (genus *Aechmea* Ruiz & Pav.) revealing a basal clade including the species of the *A. candida*-*A. coelestrix* complex (composed of five related genotypes) from which three distinct clades emerged and formed subgroups of species, partially consistent with the previous known phylogeographic and taxonomic evidences. The results generated, especially regarding controversial species, are further discussed.

Keywords: Fluorochrome staining, subgenus *Ortgiesia*, AFLP markers.