

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

Julia Zappelini

Caracterização citogenética de três espécies de bambu nativas da América do Sul: *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, *Guadua angustifolia* Kunth e *Chusquea tenella* Nees (Poaceae)

Florianópolis
2017

Julia Zappelini

Caracterização citogenética de três espécies de bambu nativas da América do Sul: *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, *Guadua angustifolia* Kunth e *Chusquea tenella* Nees (Poaceae)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosete Pescador

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zappelini, Julia
Caracterização citogenética de três espécies de
bambu nativas da América do Sul: *Guadua chacoensis*
(Rojas) Londoño & P.M. Peterson, *Guadua*
angustifolia Kunth e *Chusquea tenella* Nees
(Poaceae) / Julia Zappelini ; orientadora, Rosete
Pescador - SC, 2017.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Citogenética
vegetal. 3. Bambus lenhosos. 4. Paleopoliploidia.
5. Diploidização. I. Pescador, Rosete. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III.
Título.

À minha para sempre amada
Mutter Nivardis,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, docentes, discentes e colaboradores, fundamentais para a minha formação profissional.

À Prof. Rosete Pescador pela orientação, oportunidades a mim concedidas e confiança depositada.

Aos meus pais, Norma e Aldo Zappellini, por sempre acreditarem no meu potencial, me aconselharem e apoiarem em todas as decisões.

Às minhas irmãs, Alessandra e Ana Paula Zappellini, por serem minhas companheiras de vida e estarem sempre ao meu lado.

À Marla Olivetti e à Vani da Rosa, por cuidarem de mim e da minha família.

Ao Guilherme Brand, meu amor e melhor amigo, por compreender os momentos de ausência e sempre me acolher novamente com coração pleno de carinho.

Aos meus amigos do “Laboratório Fitotron”, por estarem sempre dispostos para um café, um chimarrão, ou somente para uma conversa de motivação e força.

Ao Prof. Luiz Gustavo Souza da UFPE, pela disponibilidade em me acolher e em me ensinar.

Aos meus novos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal da UFPE, agradeço por tudo. Este trabalho só poderia ser realizado através dos ensinamentos de vocês. Sempre lembrarei com carinho deste período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil” (Edital 66/2013), pelo apoio financeiro.

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

MUITO OBRIGADA.

**Caracterização citogenética de três espécies de bambu
nativas da América do Sul: *Guadua chacoensis* (Rojas)
Londoño & P.M. Peterson, *Guadua angustifolia* Kunth
e *Chusquea tenella* Nees (Poaceae)**

por

Julia Zappellini

Dissertação julgada e aprovada em 10/03/2017, em sua forma final,
pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos
Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rosete Pescador (Presidente-CCA/UFSC)



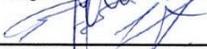
Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza (Externo-UPPE/PE)
(Participação por videoconferência)



Prof. Dr. Neusa Steiner (Interno-CCB/UFSC)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno-CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovatô (Coordenador do Programa)

Florianópolis, março de 2017

RESUMO

Os bambus (Poaceae: Bambusoideae) são gramíneas perenes, de múltiplas utilidades, principalmente como produto florestal não-madeireiro, sendo a única linhagem da família a se diversificar em hábitat florestal. A subfamília é composta por 120 gêneros e 1.641 espécies, distribuídas entre as tribos Olyreae (bambus herbáceos), Arundinarieae (bambus lenhosos temperados) e Bambuseae (bambus lenhosos tropicais), apresentando vasta distribuição mundial. A tribo Bambuseae é dividida em duas linhagens distintas, de origem paleo- e neotropical. O grupo neotropical é composto por 373 espécies distribuídas em 20 gêneros, onde o Brasil constitui o principal centro de diversidade e endemismo de espécies. Apesar das múltiplas utilidades dos bambus, o uso comercial destas plantas não é amplamente difundido no país, diferentemente de países asiáticos. Recentemente, foi estabelecida uma nova lei no Brasil que vem estimulando o cultivo desta gramínea, intitulada "Política Nacional de Incentivo à Gestão Sustentável e Cultivo de Bambu (PNMCB)". O presente trabalho foi desenvolvido por meio do projeto multidisciplinar e interinstitucional denominado "Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável da Cadeia Produtiva do Bambu no Sul do Brasil" (CNPq/2013), que tem como objetivo identificar e superar gargalos científicos e tecnológicos limitantes para a cadeia produtiva de bambus. As espécies selecionadas para o estudo foram *Guadua chacoensis* e *G. angustifolia*, cujos colmos tem grande potencial de uso na construção civil, e *Chusquea tenella*, principal representante da tribo Bambuseae na Ilha de Santa Catarina. A história evolutiva de um determinado grupo taxonômico pode ser acessada pela comparação entre características citogenéticas, como o cariótipo e tamanho do genoma. Com isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o cariótipo das três espécies selecionadas através da determinação do número cromossômico somático ($2n$), número e localização de bandas heterocromáticas e de sítios de DNAr 5S e 45S, determinação do nível de ploidia, assim como a estimativa do tamanho do genoma. Ambas as espécies de *Guadua* apresentaram $2n=46$, enquanto que em *C. tenella* foram observados $2n=44$ cromossomos, sendo este o primeiro registro para a última espécie. Os cariótipos das três espécies se mostraram estáveis, onde o bandeamento com fluorocromos revelou um par de bandas CMA⁺/DAPI⁻, e a FISH revelou um par de sítios de cada família de DNAr, estes ocorrendo em cromossomos distintos. Os sítios de DNAr 45S se encontraram colocalizados com o par de bandas CMA⁺/DAPI⁻ nas três espécies estudadas. A citometria de fluxo estimou o tamanho do genoma

de *G. chacoensis* em 3,98 pg DNA/2C, *G. angustifolia* em 3,99 pg DNA/2C e de *C. tenella* em 4,77 pg DNA/2C, sendo o primeiro registro para *G. chacoensis* e para o gênero *Chusquea*. Em gramíneas, considera-se que a variação no tamanho do genoma não esteja relacionada ao número cromossômico em geral, mas à porção de DNA repetitivo. As marcações citogenéticas empregadas revelaram que as espécies são paleopoliploides diploidizados. Os mecanismos putativamente envolvidos na evolução do cariótipo das espécies são discutidos, bem como a escolha das possíveis técnicas a serem empregadas para a confirmação da condição indicada de diploidização.

Palavras-chave: Bambus lenhosos. Cariótipo. Diploidização. Evolução.

ABSTRACT

Bamboos (Poaceae: Bambusoideae) are perennial grasses of multipurpose, mainly as non-timber forest product, being the only lineage of the family to diversify in forest habitat. The subfamily is composed of 120 genera and 1,641 species, distributed among the tribes Olyreae (herbaceous bamboos), Arundinarieae (temperate woody bamboos) and Bambuseae (tropical woody bamboos), with a worldwide distribution. The tribe Bambuseae is divided in two distinct lineages, which have paleo- and neotropical origin. The neotropical group encompass 373 species distributed in 20 genera, where Brazil is the main center of diversity and endemism of species. Despite the multiple uses of the bamboos, the commercial use of these plants is not widespread in this country, unlike in Asian countries. Recently, a new law was established in Brazil in order to stimulates the bamboo productive chain, entitled "National Policy of Encouragement to Sustainable Management and Cultivation of Bamboo (PNMCB)". The present work was developed through the multidisciplinary and interinstitutional project called "Technologies for the Sustainable Development of the Bamboo's Productive Chain in the South Brazil" (CNPq/2013), which aims to identify and overcome limiting scientific and technological bottlenecks for the productive chain of bamboo. The selected species for the study were *Guadua chacoensis* and *G. angustifolia*, which culms have great potential of use in the civil construction, and *Chusquea tenella*, principal element of the tribe Bambuseae at Santa Catarina's Island. The evolutionary history of a given taxonomic group can be accessed by comparing cytogenetic features such karyotype and genome size. Thus, the objective of this research was to characterize the karyotype of the three-selected species through determination of somatic chromosome number ($2n$), number and location of heterochromatic bands and 5S and 45S rDNA sites, determination of ploidy level, as well as genome size estimation. Both *Guadua* species presented $2n = 46$, while *C. tenella* showed $2n = 44$ chromosomes, being the first record for this last species. The karyotypes of the three species were shown stable, where the fluorochrome banding revealed a pair of bands CMA⁺/DAPI, and FISH revealed a pair of sites from each rDNA family, occurring on distinct chromosomes. The 45S rDNA sites were colocalized with the pair of bands CMA⁺/DAPI in the three species. Flow cytometry estimated the genome size of *G. chacoensis* in 3.98 pg DNA/2C, *G. angustifolia* in 3.99 pg DNA/2C and of *C. tenella* in 4.77 pg DNA/2C, being the first record for *G. chacoensis* and for the genus *Chusquea*. In grasses, it is considered

that the variation in genome size is not overall related to chromosome number, but to the portion of repetitive DNA. The cytogenetic markers revealed that the species are diploidized paleopolyploids. The putative mechanisms involved in the karyotype evolution of the species are discussed, as well as the choice of possible techniques to be employed to confirm the indicated diploidization condition.

Keywords: Woody bamboos. Karyotype. Diploidization. Evolution.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.1.** Árvore filogenética e distribuição geográfica das principais linhagens da subfamília Bambusoideae. (A) Tribo Olyreae; (B) Tribo Arundinarieae; (C) Tribo Bambuseae, paleotropicais; (D) Tribo Bambuseae, neotropicais. Adaptado de KELCHNER & BPG (2013)**32**
- Figura 1.2.** (A) *Guadua chacoensis* (fonte: www.tropicalbamboo.org); (B) Distribuição mundial de *G. chacoensis* (fonte: www.tropicos.org).....**34**
- Figura 1.3.** (A) *Guadua angustifolia* (fonte: www.tropicalbamboo.org; RUIZ et al., 2004); (B) Distribuição mundial de *G. angustifolia* (fonte: www.tropicos.org)**35**
- Figura 1.4.** (A) População natural de *C. tenella* em Florianópolis, SC, Brasil; Destaque para nó com múltiplas brotações; (B) Distribuição mundial de *C. tenella* (fonte: www.tropicos.org)**36**
- Figura 1.5.** Esquema sintetizando as principais etapas da hibridização *in situ* fluorescente (GUERRA, 2004)**41**
- Figura 1.6.** Unidades de repetição de DNAr e suas principais regiões. (a) DNAr 45S, e; (b) DNAr 5S (OVALLE, 2011)**43**
- Figura 1.7.** Esquematisação das principais etapas envolvidas na estimativa do tamanho do genoma nuclear de plantas por citometria de fluxo. Adaptado de PELLICER & LEITCH (2014)**46**

Capítulo II

- Figura 2.1.** Caracterização do cariótipo de *Guadua chacoensis* após bandeamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S em cromossomos metafásicos. (a) Distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI (amarelo); (b) Localização de sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) na mesma célula; (c) Cariograma proposto para os 23 pares cromossômicos; (d) Idiograma do complemento haploide, mostrando bandas CMA⁺/DAPI (amarelo) e sítios de DNAr 5S (vermelho), onde OC: ordem cromossômica, T: tamanho total dos cromossomos (µm), AR: razão entre braços (“arm ratio”). As barras em (b) e (c) correspondem a 5 µm**79**
- Figura 2.2.** Caracterização do cariótipo de *Guadua angustifolia* após bandeamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S em cromossomos metafásicos. (a) Distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI (amarelo); (b) Localização de sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) na mesma célula. Cabeça da seta indica possível

sinal inespecífico; (c) Cariograma proposto para os 23 pares cromossômicos; (d) Idiograma do complemento haploide, mostrando bandas CMA⁺/DAPI (amarelo) e sítios de DNAr 5S (vermelho), onde OC: ordem cromossômica, T: tamanho total dos cromossomos (μm), AR: razão entre braços (“arm ratio”). As barras em (b) e (c) correspondem a 5 μm 80

Figura 2.3. Caracterização do cariótipo de *Chusquea tenella* após bandeamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S em cromossomos metafásicos. (a) Distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI- (amarelo). Cabeça da seta indicando banda CMA⁺/DAPI- de sinal mais fraco; (b) Localização de sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) na mesma célula; (c) Cariograma proposto para os 22 pares cromossômicos; (d) Idiograma do complemento haploide, mostrando bandas CMA⁺/DAPI- (amarelo) e sítios de DNAr 5S (vermelho), onde OC: ordem cromossômica, T: tamanho total dos cromossomos (μm), AR: razão entre braços (“arm ratio”). As barras em (b) e (c) correspondem a 5 μm81

Figura 2.4. Histogramas de intensidade de fluorescência relativa obtidos a partir da análise por citometria de fluxo de núcleos isolados e corados com iodeto de propídio de (A) *G. angustifolia*; (B) *G. chacoensis*, e; (C) *C. tenella*. O padrão interno de referência utilizado foi *G. max*82

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 2.1. Tamanho do genoma de <i>G. chacoensis</i> , <i>G. angustifolia</i> e <i>C. tenella</i> estimado por citometria de fluxo	82
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

m - Metro
cm - Centímetros
km² - Quilômetros quadrados
% - Porcentagem
n^o - Número
CMA – Cromomicina A₃
DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol
GC – Guanina e Citosina
AT – Adenina e Timina
RNAr – RNA ribossomal
DNAr – DNA ribossomal
x – Número básico de cromossomos
2n – Número cromossômico somático
pg DNA/2C – Picograma de DNA por núcleo 2C
HC – Heterocromatina constitutiva
FISH – Hibridização *in situ* fluorescente
NORs – Regiões organizadoras de nucléolos
Cy3 – Cianina
Cy3-dUTP – 5-amino-2'-desoxiuridina propargil-5'-trifosfato conjugado a cianina
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
Mpb – Mega pares de base
LTR – Retrotransposons com longas cadeias terminais
L – Litro
8-HQ – 8-hidroxiquinileína
°C – Graus Celsius
v/v – Volume por volume
µl – Microlitro
µg/ml – Micrograma por mililitro
mg/ml – Miligrama por mililitro
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mM – Milimolar
mg – Miligrama
p/v – Peso por volume
SSC – Tampão citrato de sódio salino (“*Saline-sodium citrate buffer*”)
ng/µl – Nanograma por microlitro
RB ou AR – Relação entre braços ou “*Arm ratio*”
ml - Mililitro
WPB – Tampão “*Woody Plant Buffer*”

nm - Nanômetro

M – Cromossomos metacêntricos

SM – Cromossomos submetacêntricos

µm – Micrometro

OC – Ordem cromossômica

T – Tamanho total dos cromossomos

CV – Coeficientes de variação

ET – Elementos transponíveis

SUMÁRIO

1. Introdução e Justificativa	23
2. Objetivos	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. Capítulo I – Revisão bibliográfica.....	29
3.1 A subfamília Bambusoideae.....	29
3.2 Os gêneros <i>Guadua</i> Kunth e <i>Chusquea</i> Kunth.....	33
3.3 Citogenética.....	36
3.3.1 Bandeamento cromossômico com fluorocromos: identificação de heterocromatina.....	38
3.3.2 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente e DNA ribossomal	41
3.3.3 Tamanho do genoma e Citometria de fluxo	44
3.3.4 Estudos citogenéticos em Bambusoideae.....	47
Referências.....	51
4. Capítulo II – Cariótipo e tamanho do genoma de espécies de bambu neotropicais: <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, <i>Guadua angustifolia</i> Kunth e <i>Chusquea tenella</i> Nees (Poaceae)*	69
4.1 Introdução	71
4.2 Material e métodos	74
4.2.1 Material vegetal.....	74
4.2.2 Caracterização citogenética.....	74
4.2.2.1 Preparação cromossômica	74
4.2.2.2 Bandeamento cromossômico com CMA/DAPI	75
4.2.2.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	75
4.2.2.4 Medições cromossômicas e Idiogramas	76
4.2.3 Estimativa do tamanho do genoma	76
4.2.3.1 Citometria de fluxo.....	76
4.3 Resultados	78
4.3.1 Caracterização citogenética.....	78
4.3.2 Estimativa do tamanho do genoma	82
4.4 Discussão.....	83
4.4.1 Caracterização citogenética.....	83
4.4.2 Paleopoliploides e Diploidização	85
4.4.3 Tamanho do genoma	87
4.5 Conclusões	89
Referências.....	90

1. Introdução e Justificativa

A família Poaceae Barnhart. é reconhecida mundialmente por sua grande importância econômica e ecológica, incluindo as principais culturas alimentícias como arroz, milho e trigo, além de outras significativas como sorgo, cana-de-açúcar, aveia e diversas gramíneas forrageiras (BENNETZEN, 2007). Com distribuição cosmopolita e ocorrência numa enorme variedade de habitats, é uma das maiores e mais diversas famílias entre as Angiospermas, compreendendo mais de 11.000 espécies (GPWG II, 2012).

Dentre as 12 subfamílias reconhecidas para Poaceae (GPWG II, 2012), a subfamília Bambusoideae Luerss. abrange 1.641 espécies distribuídas em 120 gêneros (SORENG et al., 2015), atualmente classificadas em bambus herbáceos (tribo Olyreae Kunth ex Spenn.), bambus lenhosos temperados (tribo Arundinarieae Asch. & Graebn.) e bambus lenhosos tropicais (tribo Bambuseae Kunth ex Dumort; SUNGKAEW et al., 2009; KELCHNER & BPG, 2013). Os bambus são reconhecidos por serem a única linhagem de gramíneas a se diversificarem em habitat florestal, e por apresentarem hábito perene, colmos lignificados (bambus lenhosos) e rota fotossintética C3 (BPG, 2012). Devido a sua versatilidade, os bambus lenhosos são de grande importância para o desenvolvimento de comunidades rurais no mundo todo, com utilidade na construção civil, alimentação, combustível, como matéria-prima para artesanatos, além de serem fundamentais para a manutenção dos sistemas ecológicos nos quais estão inseridos (BYSTRIAKOVA et al., 2004).

Os bambus apresentam distribuição natural em todos os continentes, com exceção da Europa e Antártica, ocorrendo entre as latitudes 46°N e 47°S e em até 4.300 m de altitude (JUDZIEWICZ et al., 1999). Em geral, os bambus lenhosos têm como centro de diversidade a Ásia e a América do Sul, sendo o Brasil o país de maior diversidade de gêneros e espécies nos Neotrópicos (BYSTRIAKOVA et al., 2004). Dos 20 gêneros e das 373 espécies de bambus lenhosos reconhecidos nas Américas (SORENG et al., 2015), 18 gêneros e 155 espécies ocorrem no Brasil, dos quais 6 e 129 são considerados endêmicos, ocorrendo principalmente nos domínios Mata Atlântica e Amazônia (FILGUEIRAS & SANTOS-GONÇALVEZ, 2004; GRECO et al., 2015).

Dentre os gêneros de bambus lenhosos neotropicais, *Guadua* Kunth e *Chusquea* Kunth se destacam pelo número de espécies com pela ampla ocorrência e notável importância ecológica e econômica. As 32 espécies de *Guadua* são identificadas pelo seu grande porte (com colmos

atingindo até 30m de altura e 20 cm de diâmetro), alta taxa de crescimento e qualidade como material de construção (LONDOÑO et al., 2002; CLARK et al., 2015). Ainda, este gênero é componente essencial da mais extensa floresta natural de bambus localizada na bacia Amazônica (JUDZIEWICZ et al., 1999; CLARK et al., 2015).

O gênero *Chusquea*, por sua vez, contribui com 40% das espécies de bambus lenhosos neotropicais, onde 41 das 44 espécies no Brasil são endêmicas (FISHER et al., 2014; Flora do Brasil, 2017c). Este é o gênero de bambus com a maior distribuição latitudinal (24°N a 47°S) e altitudinal (até 4.000 m), ocorrendo em florestas montanhosas, campos de altitude e planícies tropicais (JUDZIEWICZ & CLARK, 2007; FISHER et al., 2014).

Embora as propriedades e potencialidade de uso dos bambos sejam bastante versáteis, as Américas não expandiram a “cultura do uso do bambu” como países Asiáticos o fizeram. A exploração de bambus nativos na América do Sul se restringe ao desenvolvimento da economia local, como na Colômbia, Equador e Brasil. Comercialmente, as espécies nativas mais exploradas são *G. angustifolia* Kunth e *G. amplexifolia* J. Presl., assim como espécies exóticas introduzidas, como *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex J.C. Wendl. e *Phyllostachys aurea* Carrière ex Rivière & C. Rivière (LONDOÑO, 2001; BYSTRIAKOVA et al., 2004).

Recentemente, uso dos bambus no Brasil vem sendo estimulado devido à lei nº 12.484 de 08 de setembro de 2011, denominada “Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB)”. Esta lei tem por objetivo a regulamentação da produção de espécies nativas, proporcionando o desenvolvimento socioeconômico regional e da agricultura familiar. Assim sendo, o presente trabalho se enquadra no projeto de pesquisa multidisciplinar e interinstitucional intitulado “Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável da Cadeia Produtiva do Bambu no Sul do Brasil” (Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq nº 66/2013), que visa identificar e superar gargalos científicos e tecnológicos limitantes ao desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu nesta região.

Apesar da importância econômica e ecológica, a história evolutiva da família Poaceae é ainda parcialmente desconhecida (GPWG II, 2012). Estima-se que as gramíneas tenham se diversificado a partir de um ancestral comum há cerca de 70-90 milhões de anos (SALSE et al., 2008), e que eventos independentes de especiação resultaram numa grande variação no número cromossômico, nível de ploidia e tamanho do genoma (HILU, 2004). Em Bambusoideae, considera-se que a evolução das diferentes linhagens lenhosas seja consequência de eventos

independentes de hibridização e de duplicação total do genoma (TRIPLETT et al., 2014), onde sugere-se que a linhagem neotropical teria surgido durante o Mioceno, há cerca de 20-25 milhões de anos (RUIZ-SANCHEZ, 2011; WU et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Além da abordagem genética e molecular, a citogenética, através da caracterização do cariótipo e da estimativa do tamanho do genoma, é uma importante ferramenta para o estudo da organização e evolução do genoma de plantas (MALUSZYNSKA, 2002). A análise do cariótipo é geralmente baseada no número e morfologia de cromossomos metafásicos de células somáticas, e técnicas como bandeamento cromossômico com fluorocromos base-específicos e hibridização *in situ* são empregadas para a diferenciação do complemento cromossômico, assim permitindo a interpretação de rearranjos cromossômicos e evidenciando a história evolutiva de diferentes grupos taxonômicos (WEISS-SCHNEEWEISS & SCHNEEWEISS, 2013).

Os fluorocromos mais usados em técnicas de bandeamento são o CMA (cromomicina A₃) e DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol), que se ligam preferencialmente a regiões de heterocromatina ricas em pares de base GC e AT, respectivamente, formando blocos, ou bandas, ao longo dos cromossomos (SCHWEIZER, 1976). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) consiste no pareamento de uma sequência de DNA, marcada com molécula fluorescente para a sua detecção, à uma sequência complementar em preparações cromossômicas (GUERRA, 2004). A principal aplicação desta técnica é o mapeamento físico de genes de RNAr (DNAr) 5S e 45S, uma vez que estes são abundantes em seres eucariotos, contendo múltiplas cópias de sequências altamente conservadas e organizadas em *tandem* (LIM et al., 2001).

O padrão de distribuição ao longo dos cromossomos de bandas heterocromáticas, bem como de números e sítios de famílias de DNAr, podem trazer evidências quanto a natureza híbrida de espécies, mecanismos e direcionamentos de variações cromossômicas, assim como os respectivos impactos na evolução do cariótipo e do genoma de plantas (de MORAES et al., 2007; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; BERJANO et al., 2009; SOUZA et al., 2015).

A citometria de fluxo é a técnica mais usada atualmente para estimar o tamanho do genoma, ou conteúdo de DNA nuclear, de plantas (DOLEŽEL et al., 2007). Esta técnica consiste na rápida quantificação de luz fluorescente emitida por um número representativo de núcleos isolados e corados com fluorocromos, e posteriormente comparado a uma espécie cujo genoma seja de tamanho conhecido (padrão de referência) (DOLEŽEL & BARTOŠ, 2005). Estimativas sobre o tamanho do genoma

podem ter aplicações variadas, desde taxonomia, estudos sobre evolução do genoma, até na escolha de organismos não-modelo para programas de sequenciamento (GREGORY et al., 2007).

Em Bambusoideae, poucos são os estudos envolvendo a caracterização do cariótipo e estimativa do tamanho do genoma, o quais se baseiam principalmente no número cromossômico. Em bambus lenhosos, o estado poliploide baseado no número básico de cromossomos $x=12$ é o mais frequente, embora $x=11$ e 10 tenham sido relatados para algumas espécies tropicais (HILU, 2004). Em bambus temperados, o número tetraploide $2n=48$ é o mais comum, enquanto que nas linhagens tropicais a variação pode ser mais ampla, ocorrendo espécies tetraploides e hexaplóides com $2n=40, 44, 46, 48, 72$ (CLARK et al., 2015).

Quanto ao tamanho do genoma de espécies de bambu, os estudos se concentram em linhagens temperadas e paleotropicais, onde a maior variação observada é de 1,67 a 5,61 pg DNA/2C (GIELIS et al. 1997, GUI et al., 2007; KUMAR et al., 2011; JIA et al., 2016; ZHOU et al.; 2016). Em geral, a variação do tamanho do genoma em bambus não está relacionada ao número cromossômico e nível de ploidia, sendo atribuída ao conteúdo de DNA repetitivo no genoma (MACAS et al., 2015; JIA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Tendo em vista o relevante potencial de uso de espécies neotropicais, bem como sua importante ocorrência em ambientes ameaçados (como os domínios Mata Atlântica e Amazônia), a caracterização da biodiversidade é um dos estágios iniciais para o desenvolvimento de programas de conservação e de uso sustentável destas espécies. A caracterização do cariótipo, assim como a estimativa do tamanho do genoma, pode superar este gargalo científico e contribuir para estudos sobre a evolução e complexidade do genoma de bambus lenhosos neotropicais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar e comparar aspectos citogenéticos de três espécies de bambu nativas da América do Sul: *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, *Guadua angustifolia* Kunth e *Chusquea tenella* Nees (Poaceae: Bambusoideae).

2.2 Objetivos específicos

- a. Caracterizar o número e morfologia cromossômica das três espécies de estudo;
- b. Determinar número e localização de bandas heterocromáticas e de sítios de DNA ribossomal 5S e 45S nos complementos cromossômicos das três espécies;
- c. Determinar o nível de ploidia relativa das espécies;
- d. Estimar o conteúdo de DNA nuclear das espécies;
- e. Comparar os dados obtidos com as informações citogenéticas disponíveis para outras espécies da subfamília Bambusoideae.

3. Capítulo I – Revisão bibliográfica

3.1 A subfamília Bambusoideae

A família Poaceae é uma das maiores e mais diversas famílias entre as Angiospermas, com cerca de 800 gêneros e mais de 11.000 espécies reconhecidas (GPWG, 2001; GPWG II, 2012). Cobrindo 40% da superfície global, é a família mais amplamente distribuída em todo o mundo, ocorrendo em todos os continentes e nos mais variados habitats (BREMER, 2002). As gramíneas são de grande importância econômica e ecológica para a humanidade, principalmente por serem os principais elementos da dieta humana (p.ex. arroz, milho, trigo e outros cereais) e animal (forrageiras), além de prestarem diversos serviços ecossistêmicos, como estocagem de carbono, ciclagem de nutrientes, regeneração do solo, entre outros (GIBSON, 2009).

Os estudos filogenéticos mais recentes dividem as gramíneas em 12 subfamílias. As três linhagens de gramíneas basais estão distribuídas nas subfamílias Anomochlooideae, Pharoideae e Puelioideae, enquanto que maioria das espécies está distribuída nos clados BEP (Bambusoideae, Ehrhartoideae e Pooideae) e PACMAD (Panicoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Micrairoideae, Aristidoideae, Danthonioideae) (GPWG, 2001; DUVALL et al., 2007; SÁNCHEZ-KEN et al., 2007; BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2008; GPWG II, 2012).

Os bambus, pertencentes à subfamília Bambusoideae, são conhecidos por serem a única linhagem da família com diversificação em habitat florestal (JUDZIEWICZ & CLARK, 2007; CLARK et al., 2015). Estas espécies são distinguidas de outras gramíneas pelo hábito perene, rizomas bem desenvolvidos, caules do tipo colmo (herbáceos ou lignificados, sólidos ou ocos), anatomia peculiar da lâmina foliar, floração não sazonal e rota fotossintética C3 (CLARK, 1990; BPG, 2012). Devido ao seu ciclo de vida distinto, importância ecológica e socioeconômica, são plantas de interesse na melhoria da qualidade de vida de comunidades rurais e indígenas em todo o mundo.

Os bambus são considerados importantes recursos florestais não-madeireiros, sendo utilizados como substitutos da madeira na construção civil, na indústria de papel e celulose e na produção de carvão de alta qualidade, além de serem matéria-prima para artesanato e instrumentos musicais. Suas folhas e brotos são amplamente utilizados na alimentação humana e na medicina oriental. Por serem importantes componentes estruturais de ecossistemas florestais, comumente dominantes ou

elementos de destaque na paisagem (CLARK et al., 2015), são frequentemente associados a espécies de animais especializados e vegetais ameaçadas, e sua complexa rede de rizomas está relacionada a prevenção de erosão do solo e conservação do lençol freático (JUDZIEWICZ et al., 1999; BYSTRIAKOVA et al., 2004; DAS et al., 2008; BPG, 2012; YEASMIN, 2015).

A subfamília Bambusoideae compreende 1.641 espécies descritas em 120 gêneros (SORENG et al., 2015), distribuídas naturalmente em todos os continentes, exceto Europa e Antártida, ocorrendo entre latitudes 46°N e 47°S e até 4.300 m acima do nível do mar (JUDZIEWICZ et al., 1999; Figura 1.1). Estima-se que 62% das espécies são nativas da Ásia, enquanto que 34% das Américas e 4% da Oceania e África (HIDALGO, 2003).

A monofilia da subfamília é sustentada por dados morfológicos e moleculares, sendo considerada a presença de células braciciformes fortemente invaginadas e assimétricas no mesófilo foliar uma sinapomorfia estrutural do grupo (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2008; SUNGKAEW et al., 2009; BPG, 2012). Atualmente, são reconhecidas três tribos para Bambusoideae: tribo Olyreae (bambus herbáceos), tribo Arundinarieae (bambus lenhosos temperados) e tribo Bambuseae (bambus lenhosos tropicais; SUNGKAEW et al., 2009; KELCHNER & BPG, 2013).

Os bambus herbáceos são representados por 127 espécies em 21 gêneros (SORENG et al., 2015). São plantas típicas de sub-bosque de florestas tropicais, identificadas por não apresentarem folhas do colmo e lígulas, colmos não lignificados, ramificação vegetativa limitada, flores unissexuadas, floração contínua e policárpica (FILGUEIRAS & SANTOS-GONÇALVEZ, 2004; CLARK et al., 2015). Embora nenhuma sinapomorfia morfológica tenha sido identificada para a tribo Olyreae, sua monofilia é sustentada por dados moleculares (SUNGKAEW et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014). Membros da tribo são endêmicos de regiões tropicais das Américas, ocorrendo principalmente em florestas tropicais da América Central e do Sul, com duas exceções: *Buergersiochloa* Pilg., gênero endêmico da Papua-Nova Guiné, e *Olyra latifolia* L., com populações introduzidas na África e Sri Lanka (CLARK et al., 2015; Figura 1.1A).

As duas tribos de bambus lenhosos (Arundinarieae e Bambuseae) tem como principal centro de diversidade a Ásia, onde somente na China ocorrem 45% das espécies descritas (LI, 2010). As espécies lenhosas são caracterizadas pela presença um sistema complexo de rizomas, de colmos lignificados (geralmente ocos e segmentados), hábito perene, e presença

de folhas do colmo (folhas modificadas para proteção e sustentação de brotações), ramificação vegetativa complexa, presença de lígula externa nas lâminas foliares e floração geralmente cíclica, gregária e monocárpica (FILGUEIRAS & SANTOS-GONÇALVEZ, 2004; JUDZIEWICZ & CLARK, 2007). Os colmos lignificados dos bambus lenhosos apresentam qualidades particulares que trazem vantagens em relação aos recursos florestais típicos (árvores), como alta resistência, alta taxa de crescimento, ausência de crescimento secundário e de casca, entre outras (CLARK et al., 2015).

A linhagem dos bambus lenhosos temperados (tribo Arundinarieae) compreende 621 espécies distribuídas em 31 gêneros (SORENG et al., 2015). As espécies apresentam características como rizomas leptomorfo (embora algumas espécies apresentem tipo paquimorfo), desenvolvimento basípeto de ramos vegetativos e cariótipo tetraploide com número cromossômico $2n=48$ (BPG, 2012; CLARK et al., 2015). Com distribuição Laurasiana típica, o principal centro de diversidade desta tribo encontra-se na Ásia Oriental (Figura 1.1B). O gênero *Arundinaria* Michx. é o único representante nas Américas, com 3 espécies nativas dos Estados Unidos (JUDZIEWICZ & CLARK, 2007). Para os bambus temperados são reconhecidas 12 linhagens distintas, as quais incluem gêneros de destaque, como *Phyllostachys* Siebold & Zucc., *Arundinaria*, *Chimonobambusa* Makino, *Indosasa* McClure, entre outros, envolvidos diretamente na alimentação especializada de animais (como pandas gigantes) e humana, através da produção comercial de brotos (ATTIGALA, et al., 2014; CLARK et al., 2015).

Os bambus lenhosos tropicais e subtropicais estão distribuídos em 893 espécies em 68 gêneros (SORENG et al., 2015) formando a tribo Bambuseae (SUNGKAEW et al., 2009; KELCHNER & BPG, 2013). Esta tribo compreende dois principais grupos geográficos, cujas espécies apresentam ocorrência nos paleotrópicos e neotrópicos. Ambos os grupos apresentam características como rizomas paquimorfos e desenvolvimento acrópeto de ramos vegetativos (BPG, 2012).

O grupo paleotropical abrange 520 espécies e 48 gêneros (SORENG et al., 2015), com distribuição no sudeste asiático, Índia, Austrália, Sri Lanka, África e Madagascar (BPG, 2012; Figura 1.1C). Este grupo inclui 4 subtribos, onde Melocanninae é filogeneticamente irmã do clado formado por Bambusinae, Hickeliinae e Racemobambosinae (KELCHNER & BPG, 2013). Táxons de grande importância econômica fazem parte deste grupo, como os gêneros *Bambusa* Schreb., *Dendrocalamus* Nees, *Hickelia* A. Camus e *Melocanna* Trin. (BPG, 2012; CLARK et al., 2015).

Os bambus lenhosos neotropicais formam uma linhagem monofilética representada por 373 espécies distribuídas em 20 gêneros (SORENG et al., 2015). Os bambus americanos são considerados evolutivamente mais diversificados que os bambus asiáticos, pois ocorrem em habitats e condições ambientais mais variadas (JUDZIEWICZ et al., 1999). Nativos das Américas, estas espécies apresentam distribuição geográfica a partir do México até a América Central e do Sul (Figura 1.1D; BPG, 2012). Este grupo está dividido em três subtribos: Arthrostylidiinae, Guaduinae e Chusqueinae, sendo o clado formado por Arthrostylidiinae e Guaduinae sustentado como irmão de Chusqueinae em estudos filogenéticos (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2008; SUNGKAEW et al., 2009; KELCHNER et al., 2013).

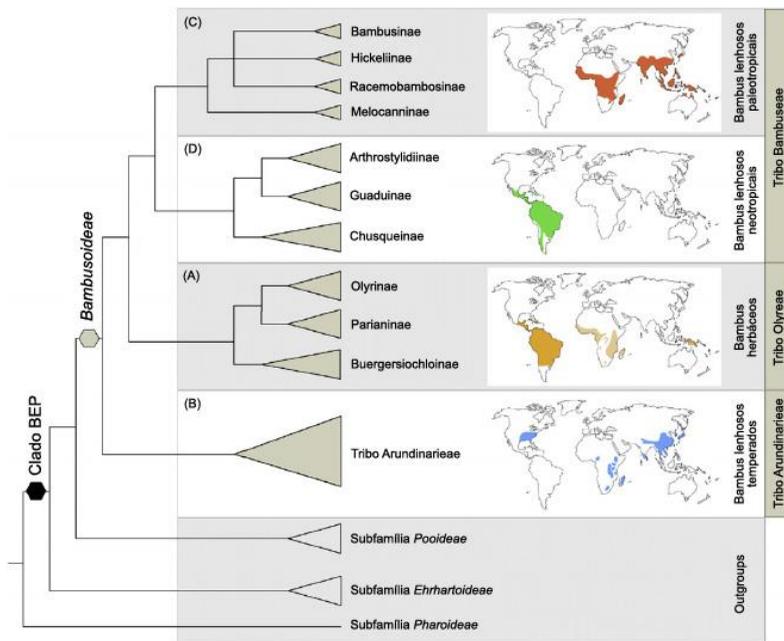


Figura 1.1. Árvore filogenética e distribuição geográfica das principais linhagens da subfamília Bambusoideae. (A) Tribo Olyreae; (B) Tribo Arundinarieae; (C) Tribo Bambuseae, paleotropicais; (D) Tribo Bambuseae, neotropicais. Adaptado de KELCHNER & BPG (2013).

O Brasil é o país de maior diversidade e grau de endemismo de espécies de bambus nas Américas (BYSTRIAKOVA et al., 2004). De acordo com o Projeto Flora do Brasil (2017a), há 49 gêneros e 289 espécies nativas do Brasil, das quais 11 e 172 são endêmicas. Dentre as espécies herbáceas, as 93 espécies descritas correspondem a 36% das espécies nativas do país (GRECO, 2013). Já, dentre os 20 gêneros e 373 espécies de bambus lenhosos neotropicais reconhecidas (SORENG et al., 2015), 18 gêneros e 155 espécies ocorrem no Brasil, das quais 6 e 129 são considerados endêmicos. As mais variadas espécies ocorrem principalmente nos domínios da Mata Atlântica e Amazônia (FILGUEIRAS & SANTOS-GONÇALVEZ, 2004; BYSTRIAKOVA et al., 2004; GRECO et al., 2015). As espécies herbáceas mais comuns são *Olyra latifolia* e *Parodiolyra micrantha* (Kunth) Davidse & Zuloaga, enquanto que os gêneros mais comuns de espécies lenhosas são *Merostachys* Spreng e *Chusquea* Kunth (Flora do Brasil, 2017b, 2017c; GRECO et al., 2015).

3.2 Os gêneros *Guadua* Kunth e *Chusquea* Kunth

A subtribo Guaduinae dos bambus lenhosos neotropicais é composta por 41 espécies distribuídas em 5 gêneros: *Eremocaulon* Soderstr. & Londoño, *Apoclada* McClure, *Olmecca* Soderstr., *Otatea* (McClure & E.W. Sm.) C.E. Calderón & Soderstr. e *Guadua* Kunth (SORENG et al., 2015; CLARK et al., 2015). Esta subtribo apresenta distribuição geográfica do México ao Uruguai, Argentina e Bolívia, ocorrendo em maior abundância em elevações mais baixas (até 1.500 m altitude; LONDOÑO, 1996). Os representantes desta subtribo são distinguidos por peculiaridades foliares, como lâminas anfi-estomáticas e presença de papilas na face adaxial (RUIZ-SANCHEZ et al., 2008).

O gênero *Guadua* é composto por 32 espécies (CLARK et al., 2015), com ocorrência desde o México ao norte da Argentina, e que se dividem em dois grupos, um cujos colmos são eretos, e outro cujos colmos tem hábito escandente (RUIZ et al., 2004). As principais características das espécies são: rizomas paquimorfos (entouceirantes), presença de folhas do colmo triangulares e eretas, cujas margens das bainhas e lâminas são contínuas, colmos verdes com entrenós lisos e ocos, espinhosos, geralmente eretos na base a ramificados no ápice, apresentando uma distinta banda de tricomas brancos na linha nodal (LONDOÑO & PETERSON, 1992; SCHMIDT & LONGHI-WAGNER, 2009; GRECO, 2013).

O gênero inclui os bambus de maior estatura e de maior importância econômica da América Latina, com espécies que podem atingir até 30 m de altura e 20 cm de diâmetro de colmo (LONDOÑO, 1996), além de serem componentes importantes da mais extensa floresta natural de bambus, encontrada na bacia Amazônica (JUDZIEWICZ et al., 1999; CLARK et al., 2015). Os colmos de *Guadua* são muito versáteis e resistentes, sendo bastante utilizados como matéria-prima para artesanato, móveis e utensílios cotidianos, bem como substituto da madeira na construção civil, principalmente por populações rurais e indígenas de países como Bolívia, Colômbia e Equador (HERNANDEZ & MARÍN, 2011; GRECO, 2013).

Guadua chacoensis (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, popularmente conhecida como taquara ou taquaraçu, é uma espécie nativa da Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil (SCHMIDT & LONGHI-WAGNER, 2009), que se desenvolve em florestas tropicais preferencialmente próximo à cursos d'água (Figura 1.2). Além das características comuns para o gênero, esta espécie é característica pela presença de longos prófilos basais nos complementos de ramos, florescimento monocárpico e colmos atingindo de 10 a 20 m de altura e 8 a 15 cm de diâmetro (LONDOÑO & PETERSON, 1992; GRECO, 2013).

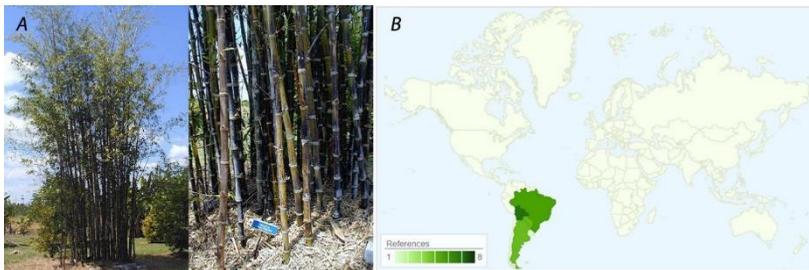


Figura 1.2. (A) *Guadua chacoensis* (fonte: www.tropicalbamboo.org); (B) Distribuição mundial de *G. chacoensis* (fonte: www.tropicos.org).

Guadua angustifolia Kunth apresenta propriedades mecânicas e físicas que a coloca entre as 20 espécies de bambu mais importantes comercialmente (CRUZ RÍOS, 2009). É a espécie do gênero mais amplamente distribuída, ocorrendo desde o México até o nordeste da Argentina e sudeste do Paraguai (Figura 1.3), principalmente próximo à rios e córregos, mas também em clareiras no dossel florestal de regiões de altitude de até 1.800 m (YOUNG & JUDD, 1992). Podem ser distinguidas de outras espécies do gênero pelas características dos colmos, os quais podem atingir até 30 m de altura e 20 cm de diâmetro e

cujos entrenós verdes se tornam amarelados quando maduros, além de folhas do colmo com tricomas rígidos e escuros na face abaxial (YOUNG & JUDD, 1992; SCHMIDT & LONGHI-WAGNER, 2009).

Embora esta espécie seja muito semelhante a *G. chacoensis*, e por vezes podem ser confundidas, algumas características em *G. angustifolia* as diferenciam, como: florescimento policárpico e a presença de lígula interna nas folhas do colmo terminando antes das margens (LONDOÑO & PETERSON, 1992).

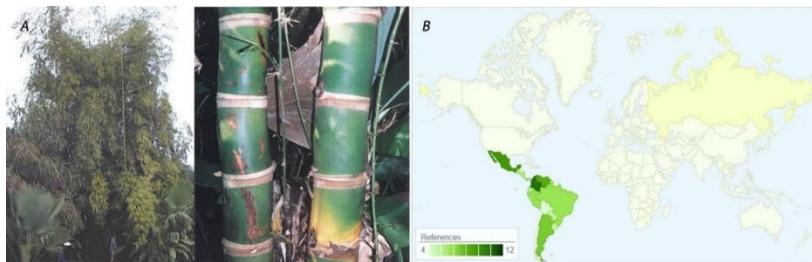


Figura 1.3. (A) *Guadua angustifolia* (fonte: www.tropicalbamboo.org; RUIZ et al., 2004); (B) Distribuição mundial de *G. angustifolia* (fonte: www.tropicos.org).

Chusqueinae é a linhagem monofilética de bambus lenhosos neotropicais formada por um único gênero, *Chusquea* Kunth. Dentro da subfamília, o gênero é considerado o mais diverso, com 169 espécies descritas (correspondendo à 40% das espécies lenhosas neotropicais; FISHER et al., 2014), bem como o de maior amplitude em relação à altitude (variando de 0 a 4.300 m acima do nível do mar) e à latitude (24°N a 47°S; JUDZIEWICZ & CLARK, 2007). Embora algumas espécies de *Chusquea* possam ser encontradas em campos de altitude ou planícies de florestas tropicais e temperadas, a maioria delas habita preferencialmente regiões de florestas montanhosas, tendendo a serem elementos dominantes na paisagem (FISHER et al., 2009). O Brasil é um dos principais centros de diversidade deste grupo, onde, das 44 espécies descritas, 41 são consideradas endêmicas (Flora do Brasil, 2017c).

Chusquea tenella Nees, popularmente conhecida como pitinga ou taquari (JUDZIEWICZ et al., 1999), é comumente encontrada em sub-bosques da Mata Atlântica brasileira, embora também ocorra no nordeste da Argentina e Uruguai (Figura 1.4; SCHMIDT & LONGHI-WAGNER, 2009). Na Ilha de Santa Catarina, é uma das espécies mais bem distribuída da tribo Bambuseae, podendo ser encontrada em fragmentos de floresta ombrófila densa e restingas, e em altitude variando de 0 a 400 m, onde

frequentemente é associada à ambientes alterados e a matas em estágio médio de regeneração (GRECO, 2013).

C. tenella é identificada pelo seu hábito apoiante, colmos sólidos de 2 a 6 m de altura e 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, múltiplas brotações por nós, rizomas paquimorfos curtos, folhas do colmo pseudopecioladas, cujas bainhas apresentam-se pilosas e com manchas vináceas (estas também presentes nas bainhas das folhas dos ramos; SCHMIDT & LONGHI-WAGNER, 2009; GRECO, 2013). Na ilha de SC, podem ocorrer simpatricamente com populações de *Colantheia intermedia* (McClure & L.B. Sm.) McClure (tribo Olyreae), onde muitas vezes estas duas são confundidas. No entanto, características como a pilosidade e as manchas vináceas na folha do colmo presentes em *C. tenella* são importantes para a distinção entre estas espécies (GRECO, 2013).

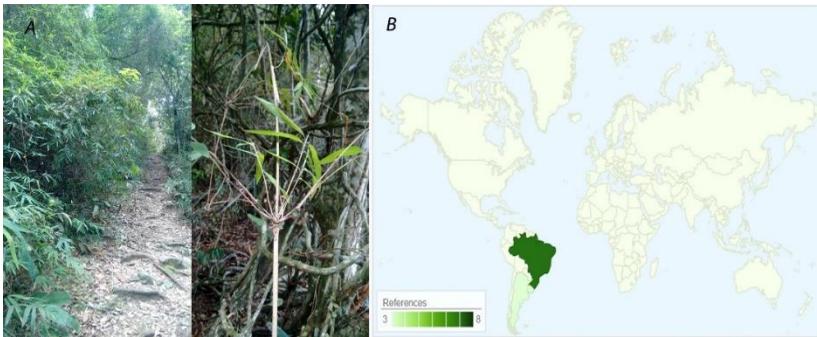


Figura 1.4. (A) População natural de *C. tenella* em Florianópolis, SC, Brasil; Destaque para nó com múltiplas brotações; (B) Distribuição mundial de *C. tenella* (fonte: www.tropicos.org).

3.3 Citogenética

A partir do início do século XX, com a descrição da Teoria Cromossômica da Herança, os cromossomos passaram a ser considerados a unidade básica da hereditariedade das células de organismos eucariotos (RAM, 2010), dando início aos estudos citogenéticos clássicos. Estudos citogenéticos pioneiros realizados em *Zea mays* L. (LONGLEY, 1927; McCLINTOCK, 1934), *Datura* L. (BLAKESLEE, 1924) e *Drosophila* Fallén (MORGAN, 1912) demonstraram que os indivíduos apresentam um número fixo de cromossomos, e que os genes localizados nestes são precisamente herdados através de mitose e meiose (SINGH, 2003).

Vale destacar os importantes estudos em citogenética desenvolvidos por B. McClintock em *Zea mays*, que contribuíram para o entendimento da estrutura (importância de regiões cromossômicas terminais ou telômeros) e da dinâmica do genoma (conhecimento dos “elementos móveis” ou elementos transponíveis) desta espécie (McCLINTOCK, 1929; 1932; 1938; 1941), contribuindo, assim, para o desenvolvimento desta ciência.

A identificação de cromossomos individuais em núcleos meióticos de *Zea mays* através de parâmetros, como o tamanho relativo dos cromossomos, posição do centrômero, a razão entre braços e padrões diferenciais de cromatina, mostrou-se muito informativa quando aplicada no desenvolvimento de mapas citogenéticos pioneiros de outras espécies de plantas, como em *Oryza sativa* L. (SHASTRY et al., 1960) e em *Lycopersicon esculentum* Mill. (RICK et al., 1956). No entanto, espécies cujos cromossomos se apresentam de tamanhos similares demandou o desenvolvimento de novas técnicas citogenéticas a fim de aumentar a precisão das análises de seus respectivos cariótipos (FIGUEROA & BASS, 2010).

Conceitualmente, a citogenética é o estudo das implicações genéticas da estrutura e comportamento dos cromossomos (GILL & FRIEBE, 1998). Esta ciência inclui o tratamento de cromossomos por técnicas de coloração, convencional ou diferencial, estudo da função e movimentação cromossômica durante a divisão celular, análise do cariótipo e de diversas modificações estruturais e comportamentais relacionadas à recombinação, transmissão e expressão de genes (SINGH, 2003).

Os cromossomos mitóticos, os quais são significativamente mais fáceis de serem obtidos em relação aos meióticos, oferecem uma oportunidade única de se observar o genoma nuclear em escala microscópica (FIGUEROA & BASS, 2010; DOBIGNY et al., 2004). A análise desses cromossomos, baseada no pressuposto que estes apresentam um padrão de condensação similar, permite o detalhamento individual de seus componentes, bem como a caracterização global do complemento cromossômico de um organismo, ou seja, o seu cariótipo (GUPTA, 2007). Muito embora seja considerado parte do fenótipo de uma planta, o cariótipo se distingue de outros aspectos fenotípicos por ser a organização do próprio material genético, e seu fenótipo durante a metáfase não depende especificamente da expressão de genes, condições ambientais ou estágio de desenvolvimento do organismo, etc. (GUERRA, 2012).

O cariótipo é, portanto, o mais alto grau de organização do genoma nuclear em nível estrutural e funcional, sendo este distinto e constante para uma determinada espécie. Considera-se que a constância cariotípica dentro de uma espécie seja um pré-requisito para a correta segregação cromossômica e transferência de material genético para as linhagens celulares futuras, e as variações no cariótipo podem conferir mudanças evolutivas (WEISS-SCHNEEWEISS & SCHNEEWEISS, 2013). Portanto, a comparação entre cariótipos de diferentes táxons fornece informações importantes para o entendimento dos mecanismos de evolução das espécies, assim como de relações filogenéticas e sistemáticas (DOBIGNY et al., 2004; SCHUBERT, 2007; GUERRA, 2008).

A descrição do cariótipo se dá por diferentes características, sendo estas representadas graficamente através de um idiograma. A citogenética clássica, geralmente baseadas em técnicas de coloração convencional com carmim ou Giemsa, permite a detecção de variações cariotípicas menos delicadas, como número, tamanho e morfologia cromossômica (posição de constrições primárias e secundárias), e simetria do cariótipo (CHESTER et al., 2010). Com o advento de técnicas de coloração mais avançadas, incluindo diferentes técnicas de bandeamento (bandeamento-C, bandeamento-Q, coloração diferencial com fluorocromos, etc.), e mais recentemente da citogenética molecular, principalmente pela hibridização *in situ*, as marcações citogenéticas não se limitam mais a características estruturais dos cromossomos. Com isso, tornou-se possível a identificação mais acurada de cromossomos homólogos, bem como a ocorrência de possíveis rearranjos entre eles e entre cariótipos. Ainda, o estudo destes parâmetros pode ser complementado com a estimativa do tamanho do genoma, ou conteúdo de DNA nuclear, e com dados sobre o comportamento cromossômico, principalmente durante a meiose (WEISS-SCHNEEWEISS & SCHNEEWEISS, 2013).

3.3.1 Bandeamento cromossômico com fluorocromos: identificação de heterocromatina

Em células de organismos eucariotos, a cromatina é constituída por filamentos de DNA genômico enrolados a diferentes classes de proteínas (histonas e não-histonas), sendo estas responsáveis pelos diferentes níveis de condensação (NEVES et al., 2005). Os domínios cromossômicos de cromatina, eucromatina e heterocromatina, foram primeiramente descritos por Heitz (1928), com base na diferença de níveis de

condensação durante o ciclo celular, apresentando características estruturais e funcionais distintas. A eucromatina é caracterizada por abrigar a maior parte dos genes estruturais e funcionais, principalmente de cópia única, e por manter um padrão de condensação-descondensação regular ao longo do ciclo celular (condensada durante a metáfase e descondensada na intérfase), possibilitando, assim, a transcrição gênica (WALLRATH, 1998). A heterocromatina caracteriza-se por se manter condensada, e possível de ser fortemente corada, durante todo o ciclo celular (RICHARDS & ELGIN, 2002).

A heterocromatina pode ser classificada como facultativa ou constitutiva. A heterocromatina facultativa é formada pelo silenciamento de regiões eucromáticas quando estas são posicionadas nas proximidades de regiões heterocromáticas, especialmente através de rearranjos cromossômicos ou transposições de elementos do genoma (Revisado por EISSENBERG & ELGIN, 2000; RICHARDS & ELGIN, 2002; LIPPMAN et al., 2004). Este estado heterocromático é estável e herdado ao longo de múltiplos ciclos de divisão celular, representando um mecanismo epigenético básico de inativação permanente de genes, e pode ser variável em diferentes condições ambientais e de desenvolvimento (GREWAL & MOAZED, 2003; FISCHER et al., 2006). A heterocromatina constitutiva (HC), por outro lado, é formada por sequências de DNA repetitivo e por poucos (ou nenhum) genes, se distribuindo em blocos ao longo dos cromossomos, geralmente em regiões pericentroméricas, teloméricas, *knobs* e regiões organizadoras de nucléolos ou NORs (GUERRA, 2000; FISCHER et al., 2006).

Ainda que os cromossomos de plantas sejam constituídos em sua maior parte por HC, esta é a sua fração menos caracterizada e, conseqüentemente, menos conhecida (BENNETZEN, 2000; LAMB et al., 2007). Porém, a HC tem atraído a atenção de citogeneticista, principalmente devido às suas propriedades gênicas e de condensação, bem como às suas funções não totalmente conhecidas (GUERRA, 2000).

Nos últimos anos, diversos estudos vêm acumulando evidências de que as diferentes classes e padrões de distribuição de bandas de HC nos cromossomos teriam diferenças nas suas composições, estruturas, naturezas e funções a nível molecular, como em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (COPENHAVER et al., 1999; McCOMBIE et al., 2000; CHAN et al., 2005; FRANSZ et al., 2000; 2006) e em *Zea mays* (ALFENITO & BIRCHLER, 1993; ANANIEV et al., 1998; ALLEMAN et al., 2006). A HC teria, então, papel importante na manutenção da estabilidade do genoma (segregando e inativando sequências de DNA repetitivo, o que impede a recombinação ilegítima), da estabilidade cromossômica

(desempenhando funções nos centrômeros e telômeros importantes para a segregação de cromossomos homólogos), além de serem fatores importantes na regulação da expressão e silenciamento de genes durante as fases de desenvolvimento e diferenciação celular (BENNETZEN, 2000; GREWAL & MOAZED, 2003; GREWAL & JIA, 2007).

A HC pode ser observada em cromossomos metafásicos através de técnicas de bandeamento, as quais revelam o número e padrões de distribuição de bandas ao longo dos cromossomos. A HC foi primeiramente observada no início dos anos 70, por meio de técnicas clássicas de bandeamento, como o bandeamento-C (SUMNER, 1972; VOSA & MARCHI, 1972), revelando grande polimorfismo nos padrões de distribuição de bandas entre diferentes táxons (Revisado por VOSA, 1985; SUMNER, 1990; GUERRA, 2000). No entanto, estas técnicas não discriminam os diferentes tipos de HC, o que pode ser obtido através do bandeamento com fluorocromos base-específicos (SCHWEIZER, 1981).

O bandeamento com fluorocromos apresenta a vantagem, em relação ao bandeamento-C, por ser um método mais simples e por não danificar a estrutura da cromatina, possibilitando, assim, que as preparações cromossômicas sejam sequencialmente submetidas outras análises, como a hibridização *in situ* (SOUZA et al., 2012). Através desta técnica, não somente os cromossomos e suas regiões podem ser identificadas, mas também a composição físico-química da HC (SUMNER, 1990; SHE et al., 2006).

Diferentes combinações de fluorocromos podem ser empregadas com a finalidade de se obter padrões de bandas fluorescentes distintas, especialmente a dupla coloração com compostos que apresentem base-especificidade opostas. Atualmente, os fluorocromos mais utilizados na citogenética de plantas são o DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol), que se liga preferencialmente a regiões ricas em pares de base adenina e timina (AT), e o CMA (Cromomicina A₃), que tem afinidade reversa, se ligando preferencialmente a sequências ricas em guanina e citosina (GC; SCHWEIZER, 1976).

Variações nos padrões de bandas CMA/DAPI podem trazer evidências quanto a natureza híbrida de espécies, quanto a evolução do cariótipo através de translocações e inversões, ou podem esclarecer relações filogenéticas entre diferentes táxons (ALMEIDA et al., 2007; de MORAES et al., 2007; BERJANO et al., 2009; SOUZA et al., 2012, 2015).

3.3.2 Hibridização *in situ* fluorescente e DNA ribossomal

O desenvolvimento de técnicas de hibridização *in situ* de seqüências de DNA, primeiramente descrita por Gall & Pardue (1969), marcou o início da era moderna da citogenética molecular. Estas técnicas são consideradas altamente informativas, tendo aplicação nas mais diversas áreas da ciência, como no mapeamento do genoma de plantas (JIANG & GILL, 1994), melhoramento de plantas (SZINAY et al., 2010), no estudo de evolução cromossômica e especiação (FRELLO & HESLOP-HARRISON, 2000; CHESTER et al., 2010).

A hibridização *in situ* fluorescente (fluorescent *in situ* hybridization; FISH) consiste no pareamento de uma seqüência isolada de DNA ou RNA, marcada com uma molécula fluorescente para a sua detecção (sonda), com uma seqüência de DNA complementar desnaturada em preparações cromossômicas (GUERRA, 2004; JIANG & GILL, 2006; Figura 1.5). Embora também seja aplicada ao mapeamento de seqüências de DNA satélite, DNA repetitivo e microssatélites, a aplicação mais comum da FISH é a localização de famílias de DNA ribossomal (DNAr) nos cromossomos, especialmente em organismos não-modelo (LIM et al., 2001).

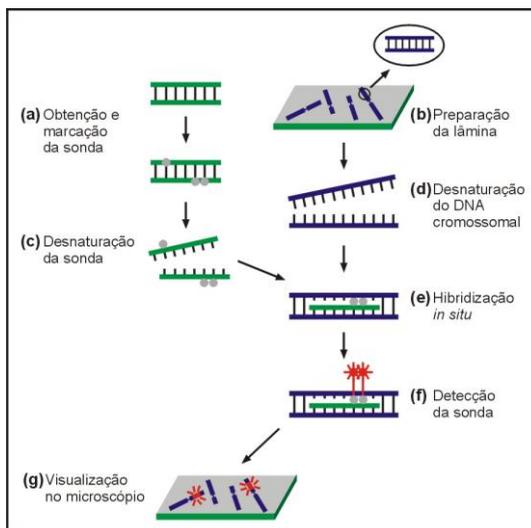


Figura 1.5. Esquema sintetizando as principais etapas da hibridização *in situ* fluorescente (GUERRA, 2004).

O DNAr contém genes que codificam para o RNA ribossomal (RNAr), sendo assim fundamentais para os processos de síntese de proteínas e para o metabolismo celular (GARCIA et al., 2012). Estas seqüências são amplamente utilizadas para a caracterização de cariótipos, uma vez que possuem as seguintes características: *i*) são evolutivamente muito conservadas, o que permite que uma seqüência isolada em uma espécie seja aplicada em outra distante; *ii*) são altamente polimórficas em relação ao número e localização no cariótipo, independentemente do número cromossômico; *iii*) são regiões de mobilidade genômica, e podem, assim, estar envolvidas na diferenciação de espécies, e; *iv*) abrigam marcadores moleculares altamente polimórficos (ITS e IGS do DNAr 45S e o espaçador não-codante do DNAr 5S), frequentemente utilizados em estudos filogenéticos (WEISS-SCHNEEWEISS & SCHNEEWEISS, 2013).

Os genes de RNAr 18S, 5,8S e 25S, juntamente dos espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e externos (ETS), e não transcritos (IGS), formam a unidade de transcrição do DNAr 45S (EICKBUSH & EICKBUSH, 2007; Figura 1.6A). Dezenas a milhares de cópias de DNAr 45S, organizadas em *tandem*, estão presentes no genoma plantas, formando blocos heterocromáticos localizados em um ou mais sítios no complemento cromossômico (HESLOP-HARRISON, 2000). Quando ativos, os sítios de DNAr 45S dão origem ao nucléolo, formando as regiões organizadoras do nucléolo, ou NORs (PIKAARD, 2002).

As NORs ativas podem ser detectadas pela presença de constrição secundária em cromossomos metafásicos, observada por coloração convencional ou de prata, ou pela presença bandas CMA⁺/DAPI. No entanto, os sítios menores e/ou inativos somente são detectáveis através da FISH com sondas de DNAr 45S (BERJANO et al., 2009; WEISS-SCHNEEWEISS & SCHNEEWEISS, 2013). Em plantas, os sítios de DNAr 45S ocorrem preferencialmente em regiões terminais do braço curto de cromossomos metafásicos (ROA & GUERRA, 2012).

Em relação ao DNAr 45S, o DNAr 5S é mais simples, consistindo numa única e altamente conservada região codante e um espaçador intergênico não-codante (NTS; Figura 1.6B). As múltiplas unidades de repetição do DNAr 5S do genoma estão organizadas em *tandem*, porém não formando constrições secundárias ou blocos, e são detectadas exclusivamente por FISH (BERJANO et al., 2009). Os sítios de DNAr 5S tem ocorrência preferencial na região proximal e intersticial do braço curto de cromossomos de plantas (ROA & GUERRA, 2015).

Particularmente em plantas, a FISH combinando sondas de DNAr 5S e 45S marcadas com diferentes moléculas (como Cy3 e FITC)

permitiu a determinação do número e da posição dos sítios em diversas espécies, as quais são características consideradas únicas para um determinado táxon (GARCIA et al., 2012). Portanto, esta técnica, juntamente com o bandeamento com fluorocromos, é considerada uma importante ferramenta para a diferenciação entre cariótipos, e vem sendo amplamente empregada em diversos estudos sobre mecanismos de rearranjos cromossômicos e evolução de plantas (FUKUI et al., 1994; de MELO & GUERRA, 2003; VANZELA et al., 2003; HASTEROK et al., 2006; PEDROSA-HARAND et al., 2006; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; KOLANO et al., 2013; FIGUEREDO et al., 2016; entre muitos outros).

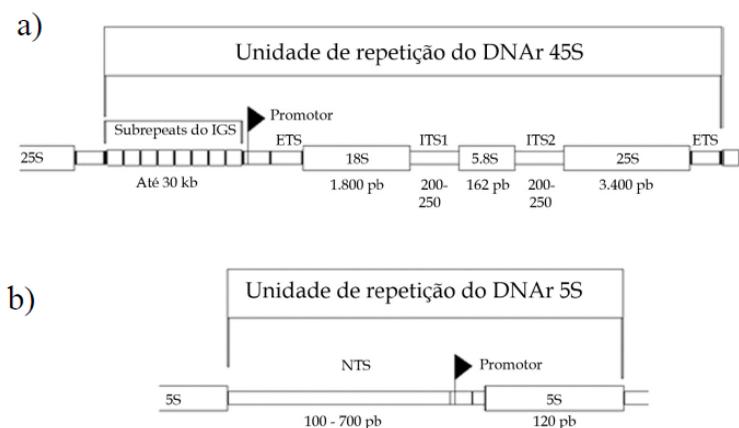


Figura 1.6. Unidades de repetição de DNAr e suas principais regiões. (a) DNAr 45S, e; (b) DNAr 5S (OVALLE, 2011).

Os mecanismos de variação no número e localização dos sítios, bem como no número de cópias e composição nucleotídica das sequências de DNAr, são distintos para os *loci* de DNAr 45S e 5S dentro do genoma (WEISS-SCHNEEWEISS & SCHNEEWEISS, 2013). Os *loci* DNAr 45S são mais propensos a sofrerem homogeneização de suas sequências, processo conhecido como Evolução em Concerto, reduzindo as cargas mutacionais nas regiões transcritas dos conjuntos, principalmente através de mecanismos de conversão gênica e recombinação desigual (NEI & ROONEY, 2005). Em organismos híbridos ou espécies poliploides, é comum ocorrer o silenciamento epigenético e perda de um *locus* de DNAr 45S proveniente de um dos parentais, onde somente o conjunto do outro

parental continua a ser expresso, processo denominado de Dominância Nucleolar (PIKAARD, 2000; KOVARIK et al., 2008).

Assim como o DNAr 45S, o DNAr 5S também está sujeito a homogeneização de suas sequências e perda de *loci*, porém em diferentes níveis e dimensões (KRISHNAN et al., 2001; CLARKSON et al., 2005). No entanto, o polimorfismo de genes de RNAr 5S num mesmo indivíduo pode ocorrer, sendo consequência do efeito de forças opostas e complementares (mutação, homogeneização e seleção; CRONN et al., 1996). Ainda, diversos estudos associam a perda de *loci* de ambas as famílias de DNAr com o processo de diploidização do genoma de espécies poliploides (CLARKSON et al., 2005; KOVARIK et al., 2008; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; FIGUEREDO et al., 2016).

3.3.3 Tamanho do genoma e Citometria de fluxo

O termo “valor-C” foi cunhado por Swift (1950) referindo-se à constância na quantidade de DNA nuclear característica de um genótipo em particular. Atualmente, valor-C representa a “quantidade de DNA em um complemento cromossômico holoploide (ou com número cromossômico n) característico de um organismo, independentemente do seu nível de ploidia” (GREILHUBER et al., 2005). Portanto, o valor-2C representa a quantidade de DNA de uma célula somática (com número cromossômico $2n$) durante a fase G1 do ciclo celular. Este valor pode ser expresso em picogramas ($1 \text{ pg} = 1 \times 10^{-9} \text{ g}$) ou em mega pares de base (Mpb), onde 1 pg corresponde a 978 Mpb (DOLEŽEL et al., 2003).

Entre as Angiospermas, a variação do tamanho do genoma (ou quantidade total de DNA nuclear) é especialmente grande, sendo de cerca de 2.400x. A espécie com o menor tamanho de genoma conhecido é a planta carnívora *Genlisea margaretae* (Lentibulariaceae), com $2C=0,13 \text{ pg}$ (GREILHUBER et al., 2006), enquanto que o maior é de *Paris japonica* (Melanthiaceae) com $2C=304,46 \text{ pg}$ (PELLICER et al., 2010). Apesar desta importante variação, somente cerca de 2% (7.542 espécies) das espécies de Angiospermas tiveram o tamanho do seu genoma estimado. Estas informações podem ser acessadas livremente pelo banco de dados eletrônico “the Plant DNA C-values Database”, que compila informações de 8.510 espécies de plantas (BENNETT & LEITCH, 2012).

Na tentativa de explicar a base biológica que estaria por trás desta grande variação, bem como seu valor adaptativo, a falta de correlação entre o tamanho do genoma de um organismo e a sua complexidade foi observada, indicando a possibilidade de o genoma ser composto por

elementos além de genes e sequências regulatórias (GREILHUBER et al., 2010). Esta falta de correlação foi, então, denominada de “Paradoxo do valor-C” por THOMAS (1971). A existência de sequências de DNA não-codantes e repetitivo predominantes no genoma forneceu uma possível resolução deste paradoxo, porém ainda pouco se sabe sobre a origem, funções e significado, bem como as forças que levam a variação no tamanho do genoma dos eucariotos (GREGORY, 2005).

Diversos estudos sobre o significado biológico da variação no tamanho do genoma sugeriram que o genoma teria efeito numa ampla gama de caracteres fenotípicos à nível nuclear, celular e do organismo como um todo. O tamanho do genoma, bem como o volume nuclear, pode afetar o tamanho e duração do ciclo celular, o tamanho de células estomáticas, ciclo de vida, tamanho de sementes, entre outros (Revisado em BENNETT & LEITCH, 2005; KRON et al., 2007). Com isso, BENNETT (1971) sugeriu o conceito de nucleótipo, ou seja, as condições do DNA nuclear, especialmente o seu tamanho, teriam efeito no fenótipo de um organismo independentemente do seu conteúdo gênico (BENNETT & LEITCH, 2005).

O conhecimento sobre o tamanho do genoma de organismos, além de nas mais diversas áreas do conhecimento biológico (p.ex. sistemática, evolução, melhoramento de plantas), teria aplicações práticas, como na escolha de espécies e projetos de sequenciamento do genoma, planejamento de clones para montagem de bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) e na escolha e aplicação de marcadores moleculares no estudo do genoma individual e populacional, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites (FAY et al., 2005; KRON et al., 2007).

Ao longo dos anos, diferentes métodos foram utilizados para estimar o conteúdo de DNA em plantas, como a densitometria de Feulgen e a reassociação cinética. No entanto, após o pioneiro trabalho aplicando citometria de fluxo em *Vicia faba* L. (HELLER, 1973), esta técnica se tornou a principal escolha por ser mais conveniente, rápida e confiável em relação às demais (DOLEŽEL et al., 2007). A citometria apresenta vantagens como a não necessidade de células em ciclo de divisão, facilidade e rapidez de preparação das amostras, necessidade de pequenas quantidades de material vegetal (método não destrutivo), e a capacidade de medir precisamente uma grande quantidade de células em um curto espaço de tempo (DOLEŽEL & BARTOŠ, 2005).

A citometria de fluxo pode ter aplicação em diversas áreas, como no estudo do ciclo celular, da expressão gênica, da estrutura físico-

química das partículas analisadas, do nível de ploidia das partículas e na seleção e análise de cromossomos mitóticos individuais. Porém, a estimativa do conteúdo de DNA nuclear é a aplicação mais importante e difundida desta técnica (LOUREIRO et al., 2008).

Esta é considerada uma ferramenta de alto rendimento que detecta e quantifica, simultaneamente, diferentes propriedades óticas (luz difusa ou fluorescência) de partículas isoladas em suspensão, geralmente células ou núcleos marcados com moléculas fluorescentes, que se interseccionam a um forte feixe luminoso. Esta intersecção faz com que as partículas suspensas emitam sinais fluorescentes, os quais são captados por filtros, convertidos e amplificados a partir de um *software* de computador, e posteriormente representados na forma de histogramas de intensidade de fluorescência relativa (KRON et al., 2007).

Basicamente, a estimativa do tamanho do genoma por citometria de fluxo envolve as seguintes etapas: *i*) preparação das amostras, que consiste no isolamento de núcleos de um tecido (geralmente folhas jovens) por um tampão adequado; *ii*) remoção dos ruídos causados por, p.ex., compostos fenólicos, através de uma filtragem; *iii*) coloração dos núcleos isolados por um fluorocromo (geralmente iodeto de propídio) que se liga quantitativamente ao DNA nuclear; e; *iv*) passagem da suspensão de núcleos por um citômetro de fluxo, cuja função é medir a quantidade de feixe fluorescente emitido pelo corante ligado a cada núcleo (PELLICER & LEITCH, 2014; Figura 1.7).

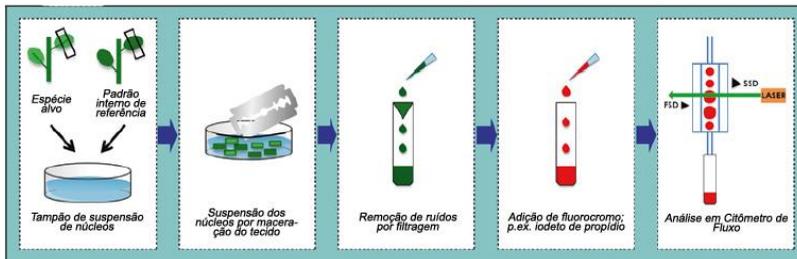


Figura 1.7. Esquematização das principais etapas envolvidas na estimativa do tamanho do genoma nuclear de plantas por citometria de fluxo. Adaptado de PELLICER & LEITCH (2014).

Uma vez que o citômetro de fluxo quantifica a fluorescência relativa emitida pelos núcleos corados, o conteúdo de DNA, ou tamanho do genoma, é estimado em relação à quantidade de fluorescência emitida por núcleos de um padrão de referência cujo tamanho do genoma seja previamente conhecido (DOLEŽEL et al., 2007). A padronização de

referência empregada pode ser externa ou interna, porém a última é considerada a mais precisa e adequada para estimar o conteúdo de DNA nuclear de plantas em unidades absolutas (pg). A padronização interna consiste na preparação da amostra onde os núcleos da planta em estudo e do padrão de referência são isolados, corados e analisados simultaneamente (DOLEŽEL, 1991).

Deste modo, a quantidade absoluta de DNA de uma amostra é calculada com base nos valores médios de fluorescência relativa emitida por núcleos na fase G1 do ciclo celular (DOLEŽEL & BARTOŠ, 2005), comparando os valores médios do padrão interno de referência, segundo a fórmula:

$$\text{Quantidade de DNA } \left(\frac{\text{pg}}{2C}\right) = \left[\frac{\text{fluorescência média do pico G1 da amostra}}{\text{fluorescência média do pico G1 do padrão}} \right] \times \text{cont. de DNA } \left(\frac{\text{pg}}{2C}\right) \text{ do padrão}$$

3.3.4 Estudos citogenéticos em Bambusoideae

Diversos estudos indicam que as espécies da família Poaceae teriam se originado a partir de um ancestral comum diploide com número cromossômico somático $2n=24$, e número básico $x=12$. Este número cromossômico seria derivado de um ancestral $x=5$ que passou por eventos de duplicação total do genoma seguido de rearranjos cromossômicos, originando um número básico ancestral $x=12$ (SALSE et al., 2008). No entanto, uma outra hipótese deve ser considerada, na qual o genoma ancestral das gramíneas teria número básico $x=7$, e que teria sofrido alotetraploidização originando um genoma ancestral $2n=48$. Este genoma tetraploide derivado teria sofrido rearranjos cromossômicos e, subsequentemente, teria sido diploidizado a um genoma $2n=24$, com $x=12$ (DEVOS, 2010).

Estudos citogenéticos em Bambusoideae são, em geral, limitados à contagem do número cromossômico somático, principalmente devido aos raros eventos de floração de espécies de bambus lenhosos (HUNZIKER et al., 1989). A variação no número cromossômico dentro da subfamília é grande, sendo de $2n=14$ em *Olyra fasciculata* Trin. (HUNZIKER et al., 1982) a $2n=96$ em *Bambusa variovstriata* (W.T. Lin) L.C. Chia & H.L. Fung (GUANG-ZHU, 1985). Recentemente, Mathu et al. (2015) relataram um citótipo poliploide do gênero *Pseudoxytenanthera* Soderstr. & R.P. Ellis com $2n=192$ cromossomos.

A maior variação do número cromossômico é encontrada dentro da tribo Olyreae, sendo de $2n=14$ (*O. fasciculata*) a $2n=44$ (*O. latifolia*), e onde a diploidia é o estado citológico mais frequente (SODERSTROM, 1981). Considera-se que esta grande variação dentro do grupo dos bambus herbáceos seja resultado de rearranjos cromossômicos a partir de um cariótipo ancestral cujo número básico seria $x=12$, formando uma série descendente de $x=11$, 10 até 7 (HUNZIKER et al., 1982).

A tribo Arundinarieae, reconhecida pela tetraploidia, apresenta o número cromossômico $2n=48$, este considerado constante. Dentro da tribo Bambuseae, por outro lado, a variação é maior, podendo ocorrer de $2n= (20) 40, 44, 46, 48, 70, 72$ (CLARK et al., 2015).

Em bambus lenhosos, o estado poliploide e o número básico $x=12$ são as características mais frequentes (HILU, 2004). No entanto, algumas espécies foram relatadas como diploides, como *Chusquea talamancensis* Y. Widmer & L.G. Clark ($2n=20$; POHL & CLARK, 1992), *Bambusa oldhamii* Munro e *B. stenostachya* Hack. ($2n=24$; HSU, 1972).

Em bambus lenhosos neotropicais, são observados desvios do padrão geral $x=12$, como nas espécies do gênero *Chusquea*, onde o número básico mais frequente é $x=10$ (DAVIDSE & POHL, 1974, 1978; POHL & CLARK, 1992). Ainda, *Guadua capitata* (Trin.) Munro, *G. paraguayana* Döll, *G. chacoensis* e *G. angustifolia* foram relatadas como $2n=46$ (GOULD & SODERSTROM, 1967; QUARÍN, 1977; CHEN et al., 2003), sugerindo que este complemento somático seja resultado de séries de disploidia a nível tetraploide.

Portanto, considera-se que os dois grandes grupos de bambus, herbáceos e lenhosos, tenham seguido diferentes padrões de evolução cromossômica. Enquanto que os herbáceos mantiveram seu caráter diploide com evolução do cariótipo e reduções aneuplóides no número cromossômico básico até $x=7$, os bambus lenhosos passaram por frequentes eventos de poliploidização baseado em $x=12$ (HUNZIKER et al., 1982, TRIPLETT, et al., 2014). Devido aos longos intervalos entre florações, e conseqüentemente uma baixa taxa de recombinação genética entre as gerações, a poliploidização é considerada uma importante fonte de variabilidade genética em espécies de bambus lenhosos (NIRMALA et al., 2014).

A poliploidia é atualmente reconhecida como uma das principais forças evolutivas em plantas (SOLTIS et al., 2014). Estima-se que todas as linhagens de Angiospermas compartilhem um evento de duplicação do genoma, consideradas, portanto, paleopoliploides (JIAO et al., 2011). Espécies poliploides podem surgir de duas maneiras: autopoliploidia (ocorrência de duplicação cromossômica) ou aloploidia (hibridização

entre duas espécies com complementos cromossômicos diferentes seguido de duplicação do genoma), sendo a última a mais importante e recorrente na evolução de plantas (RIESEBERG & WILLIS, 2007).

Evidências genômicas preliminares sugerem que os bambus passaram por um evento de duplicação do genoma há cerca de 7-15 milhões de anos (PENG et al., 2013). Ainda, estudos filogenéticos demonstram que a hibridização teria um papel importante na diversificação de linhagens de bambus (ZHANG et al., 2012; YANG et al., 2013). Mais recentemente, Triplett et al. (2014) confirmam a hipótese de que eventos de hibridização seguidos de duplicação total do genoma (alopoliploidização) teriam ocorrido independentemente nos grupos tropicais e temperados, precedendo os eventos de especiação.

Assim como no número cromossômico, variações no tamanho do genoma são características importantes na evolução das gramíneas, sendo de 0,5 a 51,96 pg DNA/2C (BENNETT & LEITCH, 2012). Em Bambusoideae, os estudos se concentram basicamente em espécies temperadas e paleotropicais, e poucas representantes do grupo de bambus herbáceos e neotropicais foram estudadas.

Kumar et al. (2011) estimaram o tamanho do genoma de 37 táxons de bambus lenhosos temperados e tropicais, não observando correlação entre o tamanho do genoma e o tamanho dos colmos. A mais recente e expressiva estimativa do tamanho do genoma em Bambusoideae foi realizada em 135 espécies temperadas e paleotropicais, registrando uma variação de 1,67 pg DNA/2C (*Bambusa affinis* Munro) a 5,61 pg DNA/2C (*Pseudosasa japonica* (Siebold & Zucc. ex Steud.) Makino ex Nakai; ZHOU et al., 2016).

Outros estudos estimaram o tamanho do genoma de espécies de bambus, como *Phyllostachys pubescens* Mazel ex J. Houz. (4,22 pg DNA/2C; GUI et al., 2007) e *P. heterocyclus* (Carrière) S. Matsum. (4,24 pg DNA/2C; PENG et al., 2013). Dentre as espécies do grupo neotropical da tribo Bambuseae, há somente o registro da estimativa do conteúdo de DNA nuclear de *G. angustifolia* (3,03 pg DNA/2C; GIELIS et al., 1997). A falta de dados sobre o tamanho do genoma de espécies neotropicais é um gargalo significativo para a caracterização da biodiversidade e de estudos sobre as relações evolutivas entre elas.

De modo geral, o grupo de bambus paleotropicais (de 1,67 a 4,29 pg DNA/2C) apresenta genoma de menor tamanho em relação aos temperados (de 2,03 a 5,61 pg DNA/2C; GIELIS et al., 1997; ZHOU et al., 2016). No entanto, não se observa uma correlação direta com o tamanho do genoma e o número cromossômico, uma vez que o primeiro

grupo apresenta número cromossômico muito maior (geralmente $2n=\pm 2$) em relação ao primeiro (JIA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

O amplo padrão de colinearidade entre os genomas de espécies da família Poaceae sugere que a grande variação no conteúdo de DNA seja consequência do conteúdo de DNA repetitivo no genoma, principalmente elementos transponíveis (GAUT, 2002; DEVOS, 2010). Esta importante colinearidade foi observada no primeiro sequenciamento amplo de uma espécie de bambu, *P. heterocyclus*, onde a comparação entre sequências indica que aproximadamente 85% dos genes do bambu estão alinhados com sequências homólogas em *Oryza L.* e *Sorghum Moench*. Ainda, estima-se que 59% do genoma desta espécie seja composto por elementos transponíveis, principalmente retrotransposons de longas repetições terminais (LTRs; PENG et al., 2013).

Referências

- ALFENITO, M. R.; BIRCHLER, J. A. (1993) Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. **Genetics**, 135(2): 589-597.
- ALLEMAN, M.; SIDORENKO, L.; MCGINNIS, K.; SESHADRI, V.; DORWEILER, J. E.; WHITE, J.; SIKKINK, K.; CHANDLER, V. L. (2006) An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. **Nature**, 442(7100): 295-298.
- ALMEIDA, C. C. de S.; CARVALHO, P. C. de L.; GUERRA, M. (2007) Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 155(4): 541-547.
- ANANIEV, E. V.; PHILLIPS, R. L.; RINES, H. W. (1998) Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9: retrotransposon invasion into heterochromatin. **Genetics**, 149(4): 2025-2037.
- ATTIGALA, L.; TRIPLETT, J.K.; KATHRIARACHCHI, H.-S.; CLARK, L.G. (2014) A new genus and a major temperate bamboo lineage of the Arundinarieae (Poaceae: Bambusoideae) from Sri Lanka based on a multi-locus plastid phylogeny. **Phytotaxa**, 174(4): 187-205.
- BENNETT, M. D.; FINCH, R. A. (1971) Duration of meiosis in barley. **Genetical Research**, 17(03): 209-214.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. (2005) Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. **Annals of Botany**, 95(1): 45-90.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. (2012) **Plant DNA C-values database**. (Release 6.0, Dec. 2012).
- BENNETZEN, J. L. (2000) The many hues of plant heterochromatin. **Genome Biology**, 1(1): 1-4.
- BENNETZEN, J. L. (2007) Patterns in grass genome evolution. **Current opinion in plant biology**, 10(2): 176-181.

BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S.; GUERRA, M. (2009) Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and evolution**, 280(3-4): 219-227.

BLAKESLEE, A.F. (1924) Distinction between primary and secondary chromosomal mutants in *Datura*. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, 10: 109–116.

BOUCHENAK-KHELLADI, Y.; SALAMIN, N.; SAVOLAINEN, V.; FOREST, F.; VAN DER BANK, M.; CHASE, M.W. & HODKINSON, T.R. (2008) Large multi-gene phylogenetic trees of the grasses (Poaceae): Progress towards complete tribal and generic level sampling. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 47: 488-505.

BPG (Bamboo Phylogeny Group) (2012). An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society** 24(1): 1-10.

BREMER, K. (2002) Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). **Evolution**, 56(7), p.1374-1387.

BYSTRIAKOVA, N.; KAPOS, V.; LYSENKO, I. (2004). **Bamboo Biodiversity**. UNEP-WCMC/INBAR.

CHAN, S. W. L.; HENDERSON, I. R.; JACOBSEN, S. E. (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Reviews Genetics**, 6(5): 351-360.

CHEN, R.Y.; LI, X.L.; SONG, W.Q.; LIANG, G.L.; ZHANG, P.X.; LIN, R.X.; ZONG, W.X.; CHEN, C.B.; FUNG, X.L. (2003) **Chromosome atlas of major economic plants genome in China** (Version IV): Chromosome atlas of various bamboo species. Science Press, Beijing, China, 628p.

CHESTER, M.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. (2010). Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). **Genes**, 1(2): 166-192.

- CLARK, L.G. (1990) Diversity and biogeography of neotropical bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, 4(1): 125-132.
- CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. (2015) Bamboo taxonomy and habitat. In: Liese, W.; Kohl, M. (eds) **Bamboo, tropical forestry**. Springer International Publishing, Switzerland, p. 1–30.
- CLARKSON, J. J.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; LEITCH, A. R. (2005) Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). **New Phytologist**, 168(1): 241-252.
- COPENHAVER, G. P.; NICKEL, K.; KUROMORI, T.; BENITO, M. I.; KAUL, S.; LIN, X.; BEVAN, M.; MURPHY, G.; HARRIS, B.; PARNELL, L.D.; MCCOMBIE, W. R.; MARTIENSSSEN, R.A.; MARRA, M.; PREUSS, D. (1999) Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres. **Science**, 286(5449): 2468-2474.
- CRONN, R. C., ZHAO, X., PATERSON, A. H., & WENDELL, J. F. (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. **Journal of Molecular Evolution**, 42(6): 685-705.
- CRUZ RÍOS, H. (2009) **Bambú–Guadua (*Guadua angustifolia* Kunth): bosques naturales en Colombia y plantaciones comerciales en México**. Colômbia: Colmex. 691p.
- DAS, M.; BHATTACHARYA, S.; SINGH, P.; FILGUEIRAS, T.S.; PAL, A. (2008) Bamboo taxonomy and diversity in the era of molecular markers. **Advances in Botanical Research**, 47:225–268.
- DAVIDSE, G.; POHL, R. W. (1974) Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on tropical American grasses (Gramineae). **Canadian Journal of Botany**, 52(2): 317-328.
- DAVIDSE, G.; POHL, R. W. (1978) Chromosome numbers of tropical American grasses (Gramineae): 5. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 65(2): 637-649.

de MELO, N. F.; GUERRA, M. (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, 92(2): 309-316.

de MORAES, A. P.; SOARES FILHO, W. dos S.; GUERRA, M. (2007) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **Chromosome Research**, 15(1): 115-121.

DEVOS, K. M. (2010) Grass genome organization and evolution. **Current opinion in plant biology**, 13(2): 139-145

DOBIGNY, G.; DUCROZ, J.-F.; ROBINSON, T.J.; VOLOBOUÉV, V. (2004) Cytogenetics and cladistics. **Systematic Biology**, 53: 470–484.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, 95(1): 99-110.

DOLEŽEL, J. (1991) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical analysis**, 2(4): 143-154.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, 51(2): 127.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature protocols**, 2(9): 2233-2244.

DUVALL, M.R.; DAVIS, J.I.; CLARK, L.G.; NOLL, J.D.; GOLDMAN, D.H.; SÁNCHEZ-KEN, J.G (2007) Phylogeny of the Grasses (Poaceae) Revisited, **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, 23(1): 237-247.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. **Genetics**, 175(2), 477-485.

EISSENBERG, J. C.; ELGIN, S. C. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. **Current opinion in genetics & development**, 10(2): 204-210.

FAY, M. F.; COWAN, R. S.; LEITCH, I. J. (2005) The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. **Annals of Botany**, 95(1): 237-246.

FIGUEREDO, A.; OLIVEIRA, Á. W. D. L.; CARVALHO-SOBRINHO, J. G.; SOUZA, G. (2016) Karyotypic stability in the paleopolyploid genus *Ceiba* Mill. (Bombacoideae, Malvaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 39(4): 1087-1093.

FIGUEROA, D. M.; BASS, H. W. (2010). A historical and modern perspective on plant cytogenetics. **Briefings in functional genomics**, 9(2), 95-102.

FILGUEIRAS, T.S; SANTOS-GONÇALVES, A.P. (2004) A checklist of the basal grasses and bamboo in Brazil (Poaceae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, 18(1): 7-18.

FISCHER, A.; HOFMANN, I; NAUMANN, K.; REUTER, G. (2006). Heterochromatin proteins and the control of heterochromatic gene silencing in *Arabidopsis*. **Journal of plant physiology**, 163(3), 358-368.

FISHER, A.; TRIPLETT, J.K.; HO, C-S; SCHILLER, A.; OLTROGGE, K.; SCHRODER, E.; KELCHNER, S.A.; CLARK, L.G. (2009) Paraphyly in the Chusqueinae (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae). **Systematic Biology**, 34: 673-683.

FISHER, A. E.; CLARK, L. G.; KELCHNER, S. A. (2014) Molecular phylogeny estimation of the bamboo genus *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) and description of two new subgenera. **Systematic Botany**, 39(3): 829-844.

FLORA DO BRASIL (2017a) *Poaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB102232>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

FLORA DO BRASIL (2017b) *Merostachys in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13316>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

FLORA DO BRASIL (2017c) *Chusquea* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13085>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

FRANSZ, P. F.; ARMSTRONG, S.; DE JONG, J. H.; PARNELL, L. D.; VAN DRUNEN, C.; DEAN, C.; ZABEL, P.; BISSELING, T.; JONES, G. H. (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. **Cell**, 100(3): 367-376.

FRANSZ, P.; TEN HOOPEN, R.; TESSADORI, F. (2006). Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. **Chromosome Research**, 14(1), 71-82.

FRELLO, S.; HESLOP-HARRISON, J. S. (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. **Annals of Botany**, 86(2): 317-322.

FUKUI, K.; OHMIDO, N.; KHUSH, G. S. (1994) Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, 87(8): 893-899.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 63(2): 378-383.

GARCIA, S.; GARNATJE, T.; KOVAŘÍK, A. (2012) Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online. **Chromosoma**, 121(4), 389-394.

GAUT, B. S. (2002) Evolutionary dynamics of grass genomes. **New Phytologist**, 154(1): 15-28.

GIBSON, D.J. (2009) **Grasses and Grassland Ecology**. New York: Oxford Univ. Press., 305 pp.

GIELIS, J.; VALENTE, P.; BRIDTS, C.; VERBELEN, J.-P. (1997) Estimation of DNA content of bamboos using flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. **The Bamboos**. London: Academic Press, p.215-223.

GILL, B.S.; FRIEBE, B. (1998) Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. **Current Opinion in Plant Biology**, 1: 09-115.

GOULD, F. W.; SODERSTROM, T. R. (1967) Chromosome numbers of tropical American grasses. **American Journal of Botany**, 54(6): 676-683.

GPWG (Grass Phylogeny Working Group) (2001) Phylogeny and sub-familial classification of the grasses. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 88, 373–457.

GPWG II (Grass Phylogeny Working Group II) (2012) New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. **New Phytologist**, 193(2): 304-312.

GRECO, T.M. (2013) **Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na ilha de Santa Catarina, Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, CCB, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Florianópolis, Brasil.

GRECO, T.M.; PINTO, M.M.; TOMBOLATO, F.C.; XIA, N. (2015) Diversity of bamboo in Brazil. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, 23:1-16.

GREGORY, T. R. (2005) The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. **Annals of botany**, 95(1): 133-146.

GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K.; LEITCH, I. J.; MURRAY, B.G.; KAPRAUN, D.F.; GREILHUBER, J.; BENNETT, M. D. (2007) Eukaryotic genome size databases. **Nucleic acids research**, 35(suppl. 1): D332-D338.

GREILHUBER, J.; DOLEŽEL, J.; LYSAK, M. A.; BENNETT, M. D. (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms

'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. **Annals of botany**, 95(1): 255-260.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. (2006) Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, 8(06): 770-777.

GREILHUBER, J.; DOLEŽEL, J.; LEITCH, I.J.; LOUREIRO, J.; SUDA, J. (2010) Genome size. **Journal of Botany**, Art. ID 946138, p.1-4.

GREWAL, S. I.; JIA, S. (2007). Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, 8(1): 35-46.

GREWAL, S. I.; MOAZED, D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, 301(5634): 798-802.

GUANG-ZHU, Z. (1985) Studies on the chromosome number of some bamboo species with clump rhizomes. **Recent Research on Bamboos**, p.175-178.

GUERRA, M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and molecular biology**, 23(4), 1029-1041.

GUERRA, M. (2004) **Hibridização *in situ*: princípios básicos**. In: FISH – Conceitos e aplicações na citogenética, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p.33-60

GUERRA, M. (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, 120: 339-350.

GUERRA, M. (2012) Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems**, 146: 703–710.

GUI, Y.; WANG, S.; QUAN, L.; ZHOU, C.; LONG, S.; ZHENG, H.; JIN, L.; ZHANG, X.; MA, N.; FAN, L. (2007) Genome size and sequence composition of moso bamboo: a comparative study. **Science in China Series C: Life Sciences**, 50(5): 700-705.

- GUPTA, P.K. (2007) **Cytogenetics**. Rastogi Publications, 432p.
- HASTEROK, R., WOLNY, E., HOSIAWA, M., KOWALCZYK, M., KULAK-KSIAZCZYK, S., KSIAZCZYK, T., HENNEN, W.K.; MALUSZYNSKA, J. (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. **Annals of Botany**, 97(2), 205-216.
- HELLER, F. O. (1973) DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, 86(5-9): 437-441.
- HERNANDEZ, L.M.; MARÍN, D. (2011) Propagación y crecimiento de *Guadua amplexifolia* Presl., *Guadua angustifolia* Kunth y *Elytostachys typica* McClure, em três tipos de substratos. **Bioagro**, 23(3): 191-198.
- HESLOP-HARRISON, J. S. (2000) Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, 12(5), 617-635.
- HIDALGO LOPEZ, O. (2003) **Bamboo: The gift of the Gods**. 1.ed. Bogotá, Colombia: D'vinni Ltda. 553p.
- HILU, K. W. (2004). Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). **Australian Journal of Botany**, 52(1): 13-22.
- HSU, C. C. (1972) Preliminary chromosome studies on the vascular plants of Taiwan (V). Cytotaxonomy on some monocotyledons. **Taiwania**, 17(1): 48-65.
- HUNZIKER, J. H.; WULFF, A. F.; SODERSTROM, T. R. (1982) Chromosome studies on the Bambusoideae (Gramineae). **Brittonia**, 34(1): 30-35.
- HUNZIKER, J. H.; WULFF, A. F.; WULF, A.; SODERSTROM, T. R. (1989) Chromosome studies on *Anomochloa* and other Bambusoideae (Gramineae). **Darwiniana**, 41-45.
- JIA, F.; ZHOU, M.; CHEN, R.; YANG, H.; GAO, P.; XU, C. (2016) Karyotype and genome size in four bamboo species. **Scientia Silvae Sinicae**, 52(9): 57-66.

JIANG, J.; GILL, B. S. (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. **Genome**, 37(5): 717-725.

JIANG, J.; GILL, B. S. (2006) Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, 49(9): 1057-1068.

JIAO, Y.; WICKETT, N. J.; AYYAMPALAYAM, S.; CHANDERBALI, A. S.; LANDHERR, L.; RALPH, P. E.; TOMSHO, L.P.; HU, Y.; LIANG, H.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D. E.; CLIFTON, S.W.; SCHLARBAUM, S.E.; SCHUSTER, S.C.; MA, H.; LEEBENS-MACK, J.; dePAMPHILIS, C.W. (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature**, 473(7345), 97-100.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X. & STERN, M.J. (1999) **American bamboos**. Washington: Smithsonian. 392p.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G. (2007) Classification and biogeography of New World grasses: Anomochlooideae, Pharoideae, Ehrhartoideae, and Bambusoideae. **Aliso**, 23: 303-314.

KELCHNER, S.A. & BPG (Bamboo Phylogeny Group) (2013) Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 67: 404-413.

KOLANO, B.; SARACKA, K.; BRODA-CNOTA, A.; MALUSZYNSKA, J. (2013) Localization of ribosomal DNA and CMA3/DAPI heterochromatin in cultivated and wild *Amaranthus* species. **Scientia Horticulturae**, 164: 249-255.

KOVARIK, A.; DADEJOVA, M.; LIM, Y.K.; CHASE, M.W.; JAMES, C.; CLARKSON, J.; KNAPP, S.; LEITCH, A.R. (2008) Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics. **Annals of Botany**, 101:815-823.

KRISHNAN, P.; SAPRA, V. T.; SOLIMAN, K. M.; ZIPF, A. (2001) FISH mapping of the 5S and 18S-28S rDNA loci in different species of *Glycine*. **Journal of Heredity**, 92(3): 295-300.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 38: 847-876.

KUMAR, P. P.; TURNER, I. M.; RAO, A. N.; ARUMUGANATHAN, K. (2011) Estimation of nuclear DNA content of various bamboo and rattan species. **Plant biotechnology reports**, 5(4): 317-322.

LAMB, J. C.; YU, W.; HAN, F.; BIRCHLER, J. A. (2007) Plant chromosomes from end to end: telomeres, heterochromatin and centromeres. **Current opinion in plant biology**, 10(2): 116-122.

LI, D.Z. (2010). Taxonomy and biogeography of the Bambuseae (Gramineae: Bambusoideae). **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, 107: 4623-4628.

LIM, K. B.; WENNEKES, J.; JONG, J. H. D.; JACOBSEN, E.; VAN TUYL, J. M. (2001) Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridisation. **Genome**, 44(5): 911-918.

LIPPMAN, Z.; GENDREL, A. V.; BLACK, M.; VAUGHN, M. W.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W. R., LAVINE, K.; MITTAL, V.; MAY, B.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J. C.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R. (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature**, 430(6998): 471-476.

LONDOÑO, X.; PETERSON, P.M. (1992) *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambuseae), its taxonomic identity, morphology, and affinities. **Novon**, 2(1): 41-47.

LONDOÑO, X. (1996) Diversity and distribution of New World Bamboos. **INBAR Working Paper n°8, India**.

LONDOÑO, X. (2001) **Evaluation of bamboo resources in Latin America**. A summary of the final report of the project 96-8300-01-4. International Network for Bamboo and Rattan, Beijing, China.

LONDOÑO, X.; CAMAYO, G. C.; RIAÑO, N. M.; LÓPEZ, Y. (2002) Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (Poaceae:

Bambusoideae) culms. **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, 16(1): 18-31.

LONGLEY, A.E. (1927) Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. **J. Agric. Res.** 35, 769-784.

LOUREIRO, J.; DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SANTOS, C.; SUDA, J. (2008) Plant flow cytometry—far beyond the stone age. **Cytometry Part A**, 73(7): 579-580.

MACAS, J.; NOVAK, P.; PELLICER, J.; ČÍŽKOVÁ, J.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; NEUMANN, P.; FUKOVÁ, I.; DOLEŽEL, J.; KELLY, L.J.; LEITCH, I. J. (2015) In depth characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe Fabaeae. **PLoS ONE**, 10(11): e0143424.

MALUSZYNSKA, J. (2002) **In Situ Hybridization in Plants: Methods and Application**. In: Molecular techniques in crop improvement (Eds. Jaim, S.M. et al.), 299-326.

MATHU, A.J.; MATHEW, P.M.; MATHEW, P.J.; HARIKUMAR, D.; KOSHY, K.C. (2015) Cytological study in *Pseudoxytenanthera* (tribe Bambuseae) occurring in India. **Journal Cytology and Genetics**, 16: 61-68.

McCLINTOCK, B. (1929) Chromosome morphology in *Zea mays*. **Science**, 69(1798): 629.

McCLINTOCK, B. (1932) Cytological observations in *Zea* on the intimate association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis and its relation to diakinesis configurations. **Proceedings of the VI International Congress of Genetics**, 2: 126-138.

McCLINTOCK, B. (1934) The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nuclei in *Zea mays* Z. Zellforsch. **Mikr. Anat.**, 21: 294-328.

McCLINTOCK, B. (1938) The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. **Genetics**, 23(4): 315.

- McCLINTOCK, B. (1941) The association of mutants with homozygous deficiencies in *Zea mays*. **Genetics**, 26(5): 542.
- McCOMBIE, W.R., et al. (Center, G. S., & PE Biosystems Arabidopsis Sequencing Consortium) (2000) The complete sequence of a heterochromatic island from a higher eukaryote. **Cell**, 100(3), 377-386.
- MORGAN, T.H. (1912) "Complete linkage in the second chromosome of the male of *Drosophila*." **Science**, 719-720.
- NEI, M.; ROONEY, A. P. (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, 39: 121-152.
- NEVES, N.; DELGADO, M.; SILVA, M.; CAPERTA, A.; MORAIS-CECILIO, L.; VIEGAS, W. (2005). Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cytogenetic and genome research**, 109(1-3): 104-111.
- OLIVEIRA, R.P.; CLARK, L.G.; SCHNADELBACH, A.S.; MONTEIRO, S.H.N.; LONGHI-WAGNER, H.M.; van den BERG, C. (2014) A molecular phylogeny of *Raddia* (Poaceae, Olyreae) and its allies based on noncoding plastid and nuclear spacers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 78(105):117.
- OVALLE, F.R. (2011) **Análise da distribuição dos sítios de DNA ribossomal 5S e 45S em cariótipos de espécies vegetais**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 203p.
- PEDROSA-HARAND, A.; de ALMEIDA, C. C. S.; MOSIOLEK, M.; BLAIR, M. W.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. **Theoretical and Applied Genetics**, 112(5), 924-933.
- PELLICER, J.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J. (2010) The largest eukaryotic genome of them all? **Botanical Journal of the Linnean Society**, 164(1): 10-15.

PELLICER, J.; LEITCH, I. J. (2014) The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. **Molecular plant taxonomy: methods and protocols**, 1115: 279-307.

PENG, Z.; LU, Y.; LI, L.; ZHAO, Q.; FENG, Q.; GAO, Z.; LU, H.; HU, T.; YAO, N.; LIU, K.; et al. (2013) The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heteroclada*). **Nature Genetics** 45: 456–461.

PIKAARD, C. S. (2000) The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, 16(11): 495-500.

PIKAARD, C. S. (2002) Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. **The Arabidopsis Book**, p. e0083.

POHL, R. W.; CLARK, L. G. (1992) New chromosome counts for *Chusquea* and *Aulonemia* (Poaceae: Bambusoideae). **American Journal of Botany**, 79(4): 478-480.

QUARÍN, C. L. (1977) Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina subtropical. **Hickenia**, 1(13): 73-78.

RAM, M. (2010) **Fundamentals of cytogenetics and genetics**. PHI Learning Private Limited, New Delhi, 653p.

RICHARDS, E. J.; ELGIN, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. **Cell**, 108(4): 489-500.

RICK, C. M.; BUTLER, L. (1956) Cytogenetics of the tomato. **Advances in genetics**, 8, 267-382.

RIESEBERG, L. H.; WILLIS, J. H. (2007) Plant speciation. **Science**, 317(5840): 910-914.

ROA, F.; GUERRA, M. (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, 12(1), 225.

ROA, F.; GUERRA, M. (2015) Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 146(3): 243-249.

RUIZ, L.J. (2004) **Variabilidad de la guadua (*Guadua angustifolia* Kunth) em la cuenca Cauca, departamento de la Cauca**. Popayán: Corporación Autónoma Regional del Cauca, CRC, 44p.

RUIZ-SANCHEZ, E.; SOSA, V.; MEJÍA-SAULES, M.T. (2008) Phylogenetics of *Otatea* inferred from morphology and chloroplast DNA sequence data and recircumscription of Guaduinae (Poaceae: Bambusoideae). **Systematic Botany**, 33:277–283.

RUIZ-SANCHEZ, E. (2011) Biogeography and divergence time estimates of woody bamboos: insights in the evolution of Neotropical bamboos. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, 88: 67-75.

SALSE, J.; BOLOT, S.; THROUDE, M.; JOUFFE, V.; PIEGU, B.; QURAIISHI, U. M.; CALCAGNO, T.; COOKE, R.; DELSENY, M.; FEUILLET, C. (2008) Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. **The Plant Cell**, 20(1): 11-24.

SÁNCHEZ-KEN, J.G.; CLARK, L.G.; KELLOGG, E.A. & KAY, E.E. (2007) Reinstatement and emendation of subfamily Micrairoideae (Poaceae). **Systematic Botany**, 32: 71-80.

SCHMIDT, R.; LONGHI-WAGNER, H.M. (2009) A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências** 7(1): 71-128.

SCHUBERT, I. (2007) Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, 10(2): 109-115.

SCHWEIZER, D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, 58(4): 307-324.

SCHWEIZER, D. (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. **Human Genetics**, 57(1): 1-14.

SHASTRY, S. V. S.; RANGA RAO, D. R.; MISRA, R. N. (1960) Pachytene analysis in *Oryza*-I. Chromosome morphology in *Oryza sativa*. **Indian Journal of Genetics**, 20: 15-21.

SHE, C. W.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C. (2006) CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants. **Biotechnic & Histochemistry**, 81(1): 13-21.

SINGH, R.J. (2003) **Plant Cytogenetics** – 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, 463p.

SODERSTROM, T. R. (1981) Some evolutionary trends in the Bambusoideae (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 68(1): 15-47.

SOLTIS, D. E.; VISGER, C. J.; SOLTIS, P. S. (2014) The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. **American Journal of Botany**, 101(7): 1057-1078.

SORENG, R.J.; PETERSON, P.M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F.O.; JUDZIEWICZ, E.J.; FILGUEIRAS, T.S.; DAVIS, J.I.; MORRONE, O. (2015) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematic and Evolution**, 53:117–137.

SOUZA, L. G. R.; CROSA, O.; SPERANZA, P.; GUERRA, M. (2012) Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). **Annals of botany**, 109(5): 987-999.

SOUZA, G.; CROSA, O.; GUERRA, M. (2015) Karyological, morphological, and phylogenetic diversification in *Leucocoryne* Lindl (Allioideae, Amaryllidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 301(8): 2013-2023.

SUMNER, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75(1): 304-306.

SUMNER, A.T. (1990) **Chromosome Banding**. Unwin Hyman, London.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C.M.A.; SALAMIN, N. & HODKINSON, T.R. (2009) Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): A multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae *s.s.*, **Journal of Plant Research**, 122: 95-108.

SWIFT, H. (1950) The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 36(11): 643.

SZINAY, D.; BAI, Y.; VISSER, R.; DE JONG, H. (2010) FISH applications for genomics and plant breeding strategies in tomato and other solanaceous crops. **Cytogenetic and Genome Research**, 129(1-3): 199-210.

THOMAS JR, C. A. (1971) The genetic organization of chromosomes. **Annual Review of Genetics**, 5(1): 237-256.

TRIPLETT, J. K.; CLARK, L. G.; FISHER, A. E.; WEN, J. (2014) Independent allopolyploidization events preceded speciation in the temperate and tropical woody bamboos. **New Phytologist**, 204(1): 66-73.

VANZELA, A. L.; CUADRADO, A.; GUERRA, M. (2003) Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 26(2): 199-201.

VOSA, C. G.; MARCHI, P. (1972) Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. **Nature**, 237(75): 191-192.

VOSA, C.G. (1985). Chromosome banding in plants. In: Sharma, A.K. and Sharma, A., (eds) **Chromosome and Cell Genetics**, Gordon and Breach Science Publishers, London, pp. 79-104.

WALLRATH, L. L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. **Current Opinion in Genetics & Development**, 8(2): 147-153.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; SCHNEEWEISS, G. M.; PARKER, J. S.; STUESSY, T. F. (2008) Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South

American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. **Annals of Botany**, 101(7), 909-918.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; SCHNEEWEISS, G.M. (2013) **Karyotype diversity and evolutionary trends in Angiosperms**. In: Leitch, I.J. et al (eds) *Plant Genome Diversity*, vol.2. Springer-Verlag Wien. pp. 209-230.

WU, M.; LAN, S.; CAI, B.; CHEN, S.; CHEN, H.; ZHOU, S. (2015) The complete chloroplast genome of *Guadua angustifolia* and comparative analyses of neotropical-paleotropical bamboos. **PLoS ONE**, 10(12): e0143792.

YANG, H. M.; ZHANG, Y. X.; YANG, J. B.; LI, D. Z. (2013) The monophyly of *Chimonocalamus* and conflicting gene trees in Arundinarieae (Poaceae: Bambusoideae) inferred from four plastid and two nuclear markers. **Molecular phylogenetics and evolution**, 68(2): 340-356.

YEASMIN, L.; ALI, MD. N.; GANTAIT, S. CHAKRABORTY, S. (2015) Bamboo: an overview on its genetic diversity and characterization. **3 Biotech**, 5: 1 – 11.

YOUNG, S.M.; JUDD, W.S. (1992) Systematics of the *Guadua angustifolia* complex (Poaceae: Bambusoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 79(4): 737-769.

ZHANG, Y. X.; ZENG, C. X.; LI, D. Z. (2012) Complex evolution in Arundinarieae (Poaceae: Bambusoideae): Incongruence between plastid and nuclear GBSSI gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 63(3): 777-797.

ZHOU, M.; XU, C.; SHEN, L.; XIANG, W.; TANG, D. (2016) Evolution of genome sizes in Chinese Bambusoideae (Poaceae) in relation to karyotype. **Trees**, p. 1-8.

4. Capítulo II – Cariótipo e tamanho do genoma de espécies de bambu neotropicais: *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, *Guadua angustifolia* Kunth e *Chusquea tenella* Nees (Poaceae)*

*Manuscrito a ser submetido ao periódico *Comparative Cytogenetics*

Resumo

A subfamília Bambusoideae (Poaceae) abrange os bambus herbáceos (tribo Olyreae), bambus lenhosos de linhagem temperada (tribo Arundinarieae) e de linhagem paleo- e neotropical (tribo Bambuseae), compreendendo 1.641 espécies distribuídas em 120 gêneros. Os bambus lenhosos são gramíneas perenes de múltiplos usos, principalmente como recurso florestal não-madeireiro, mão-de-obra para artesanatos e alimentação. O grupo neotropical da tribo Bambuseae, endêmicas das Américas, é composto por 20 gêneros e 373 espécies. O Brasil é o país de maior diversidade e grau de endemismo de espécies do grupo, ocorrendo especialmente nos domínios Mata Atlântica e Amazônia. O gênero *Guadua* inclui as espécies de maior estatura, como *G. chacoensis* e *G. angustifolia*, importantes para o desenvolvimento socioeconômico de povos indígenas e rurais nas Américas. O gênero *Chusquea* é o mais rico em espécies dentro do grupo, das quais *C. tenella* é uma das principais representantes da tribo Bambuseae na Ilha de Santa Catarina. Estudos citogenéticos em Bambusoideae são bastante insipientes, principalmente em relação à descrição de cariótipos e de estimativas do tamanho do genoma, se concentrando basicamente nas linhagens temperadas e paleotropicais. A comparação entre as características dos cariótipos traz subsídios para estudos de evolução e caracterização das espécies do grupo, atualmente ainda pouco estudado. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar aspectos citogenéticos de *G. chacoensis*, *G. angustifolia* e *C. tenella*, através do bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI, FISH com sondas de DNAr 5S e 45S, além de estimar o tamanho do genoma, ou conteúdo de DNA nuclear. A análise dos cromossomos metafásicos de *G. chacoensis* e *G. angustifolia* revelaram número somático $2n=46$, enquanto que para *C. tenella*, primeiro registro para a espécie, foi de $2n=44$. O bandeamento cromossômico evidenciou um par de bandas CMA⁺/DAPI para cada espécie; assim como a FISH, que revelou um par de sítios de DNAr 5S e

de 45S, estando o último colocalizado com o par de bandas CMA⁺/DAPI . Os cariótipos se mostraram simétricos, devido a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, e estáveis, uma vez que foram observados poucos polimorfismos nas marcações citogenéticas empregadas. Através da citometria de fluxo, o tamanho do genoma de *G. chacoensis* foi estimado em 3,98 pg DNA/2C, de *G. angustifolia* em 3,99 pg DNA/2C, e de *C. tenella* em 4,77 pg DNA/2C, sendo este o primeiro registro para *G. chacoensis* e para o gênero *Chusquea*. Com base na estimativa de origem do grupo neotropical, números cromossômicos e marcações citogenéticas observadas, os cariótipos das três espécies analisadas podem ser considerados paleopoliploides diploidizados.

Palavras-chave: Bambus lenhosos. Cariótipo. Diploidização. Evolução.

4.1 Introdução

A subfamília Bambusoideae (Poaceae), representada pelos bambus, compreende 120 gêneros e 1.641 espécies descritas (SORENG et al., 2015), apresentando distribuição natural em todos os continentes, exceto Europa e Antártica, entre as latitudes 46°N e 47°S e até 4.300 m de altitude (JUDZIEWICZ et al., 1999). Atualmente, os bambus estão divididos entre as tribos Olyreae (bambus herbáceos), Arundinarieae (bambus lenhosos temperados) e Bambuseae (bambus lenhosos tropicais; SUNGKAEW et al., 2009; KELCHNER & BPG, 2013).

A tribo Bambuseae é dividida em dois grupos geográficos, compreendendo as linhagens paleotropicals e neotropicais. A linhagem neotropical, por sua vez, é composta por 373 espécies distribuídas em 20 gêneros (SORENG et al., 2015). Nativo das Américas, este grupo apresenta ocorrência a partir do México até a América do Sul (BPG, 2012), onde o Brasil constitui o principal centro de diversidade e endemismo de espécies (BYSTRIAKOVA et al., 2004).

O gênero *Guadua* Kunth (subtribo Guaduinae) é composto por 32 espécies, incluindo as de maior estatura e importância econômica dentro do grupo neotropical, como *G. chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson e *G. angustifolia* Kunth, cujos colmos podem atingir até 30 m de altura e 20 cm de diâmetro (CLARK et al., 2015). Os colmos destas espécies são amplamente utilizados na construção civil e como matéria-prima para artesanatos por populações rurais e indígenas na América do Sul (HERNANDEZ & MARÍN, 2011; GRECO, 2013). Ainda, espécies deste gênero são importantes componentes estruturais da mais extensa floresta natural de bambus, localizada na bacia Amazônica (JUDZIEWICZ et al., 1999; CLARK et al., 2015).

O gênero *Chusquea* Kunth (subtribo Chusqueinae) é o mais diverso dentro dos bambus lenhosos neotropicais, abrangendo 169 espécies descritas. Estes bambus ocorrem principalmente em regiões montanhosas, também podendo ser encontrados em campos de altitude ou planícies tropicais (FISHER et al., 2014). O Brasil é um dos centros de diversidade do gênero, contando com 44 espécies, das quais 41 são endêmicas (Flora do Brasil, 2017). A espécie *Chusquea tenella* Nees é comumente encontrada em sub-bosques da Mata Atlântica brasileira, e é uma das principais representantes da tribo Bambuseae na Ilha da Santa Catarina, onde é frequentemente associada a ambientes alterados e em regeneração (GRECO, 2013).

Estudos genômicos estimam que a subfamília Bambusoideae teria se divergido durante o período Eoceno, há cerca de 50 milhões de anos, e

que as diferentes linhagens teriam períodos de divergência distintos. A linhagem dos bambus lenhosos neotropicais teria surgido há cerca de 20-25 milhões de anos, durante o Mioceno, dentre as quais a subtribo Chusqueinae seria a mais antiga, surgindo há cerca de 15 milhões de anos, e Guaduinae há cerca de 10 milhões de anos (RUIZ-SANCHEZ, 2011; WU et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Os poucos estudos citogenéticos em Bambusoideae se concentram em espécies das linhagens temperadas e paleotropicais (JIA et al., 2016; ZHOU et al.; 2016). Apesar de as espécies neotropicais apresentarem grande importância econômica e ecológica, o conhecimento sobre a organização do cariótipo destas é bastante insipiente, baseando-se principalmente na determinação do número cromossômico somático ($2n$).

O cariótipo é o mais alto nível de organização estrutural e funcional do genoma de uma espécie, sendo considerado o resultado final de forças que atuam ao longo da história evolutiva de um determinado grupo taxonômico (GUERRA, 2008). Além da determinação do número e morfologia cromossômica, outras técnicas citogenéticas são amplamente empregadas para a caracterização do cariótipo de diversas espécies de plantas, como o bandeamento cromossômico com fluorocromos base-específicos (como o DAPI – 4'-6-diamino-2-fenilindol – e o CMA – Cromomicina A₃) e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossomal 45S e 5S (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; BERJANO et al., 2009; KOLANO et al., 2013). Portanto, a interpretação das variações nos padrões de distribuição de bandas heterocromáticas ou de sítios de DNAr, feita através da comparação entre cariótipos, pode resolver questões taxonômicas, relações filogenéticas e de mecanismos de especiação e evolução de plantas (DOBIGNY et al., 2004; SCHUBERT, 2007; GUERRA, 2008).

Assim como a caracterização do cariótipo, o tamanho do genoma de espécies de bambu neotropicais é muito pouco estudado. O tamanho do genoma é considerado um fator determinante na seleção de organismos adequados para o sequenciamento, no planejamento de clones para bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*), seleção de marcadores moleculares como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites, amplamente empregados no estudo do genoma em escala individual e populacional, como diversidade e variabilidade genética, estrutura populacional, melhoramento e fidelidade genética de plantas regeneradas *in vitro* (FAY et al., 2005; KRON et al., 2007; LEITCH & BENNETT, 2007; NIRMALA et al., 2014). Atualmente, a citometria de fluxo é técnica mais utilizada na estimativa do conteúdo de DNA nuclear,

ou tamanho do genoma, de espécies de plantas, uma vez que analisa um grande número de núcleos isolados em um curto espaço de tempo (DOLEŽEL et al., 2007).

Neste trabalho, foram usadas as técnicas citogenéticas de bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S, assim como a citometria de fluxo, com o objetivo de determinar o número cromossômico somático, caracterizar o cariótipo e estimar o tamanho do genoma de três espécies de bambu neotropicais, *Guadua chacoensis*, *G. angustifolia* e *Chusquea tenella* (Poaceae, Bambusoideae).

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material vegetal

Três espécies de bambu neotropicais foram analisadas: *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & Peterson, *Guadua angustifolia* Kunth e *Chusquea tenella* Ness (Poaceae). Os indivíduos de *C. tenella* foram coletados numa população natural na localidade “Ponta do Goulart” em Florianópolis, SC, Brasil (27°33’41’’S; 48°31’20’’O), enquanto que os de *G. chacoensis* e *G. angustifolia* foram coletados da coleção de espécies de bambu da Fazenda Experimental da Ressacada da Universidade Federal de Santa Catarina (27°41’06’’S; 48°32’38’’O).

Mudas das três espécies foram mantidas em vasos de 5 L em substrato orgânico, e acondicionadas em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA, UFSC).

4.2.2 Caracterização citogenética

4.2.2.1 Preparação cromossômica

Após o pré-tratamento com 8-HQ (2 Mm) por 24 horas a 10°C, as pontas de raízes foram fixadas em solução etanol:ácido acético (3:1, v/v) por 2 a 24 horas em temperatura ambiente e, em seguida, armazenadas em *freezer* a -20°C. Os meristemas radiculares foram submetidos a digestão enzimática em 10 µL de solução contendo celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (Sigma) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, estes foram macerados em uma gota de ácido acético 45% (GUERRA & SOUZA, 2002), e a lamínula retirada após congelamento em nitrogênio líquido.

As lâminas que apresentaram as melhores metáfases foram selecionadas após a coloração com 10 µL de solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v), e em seguida descoradas em solução etanol:ácido acético (3:1, v/v) por 30 minutos, e em etanol absoluto por 1 hora, secas ao ar e envelhecidas por 3 dias a temperatura ambiente.

4.2.2.2 Bandeamento cromossômico com CMA/DAPI

A dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Barros e Silva & Guerra (2010). As lâminas selecionadas para cada espécie foram coradas com 10 μ L de CMA (0,5 mg/ml) por 1 hora, lavadas com água destilada, secas ao ar, e novamente coradas com 10 μ L de DAPI (2 μ g/ml) por 30 minutos, mantendo-as em câmara úmida e escura. Após a retirada do excesso de DAPI, as lâminas foram montadas em tampão Glicerol:McIlvaine pH 7,0 (1:1, v/v) contendo $MgCl_2$ 2,5 mM, e novamente envelhecidas por mais 3 dias ao abrigo da luz.

As células foram observadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB, e as imagens capturadas através de câmera de vídeo Cohu CCD acoplada ao *software* Leica QFISH. Posteriormente, as imagens foram editadas em brilho e contraste pelo *software* Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

4.2.2.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para cada espécie, as lâminas selecionadas foram descoradas em etanol:ácido acético (3:1, v/v) por 30 minutos, e após em etanol absoluto por 1 hora, ambas as etapas a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram pré-tratadas com RNase (20 mg) e pepsina, pós-fixadas com paraformaldeído 4%, desidratadas em série alcoólica e secas ao ar, conforme Pedrosa et al. (2001).

A fim de localizar os sítios de DNAr 5S, um clone de 500 pb (D2) proveniente de *Lotus japonicus* (PEDROSA et al., 2002) marcado com Cy3-dUTP (Amersham) foi utilizado como sonda. Enquanto que, para a localização dos sítios de DNAr 45S, foi utilizado como sonda um fragmento de 6,5 kb (R2) de DNAr 18S-5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (WANZENBÖCK et al., 1997) marcado com digoxigenina-dUTP (Roche). Ambas as sondas foram marcadas por *nick translation*.

A FISH foi realizada conforme Pedrosa et al. (2002), com pequenas modificações. A mistura de hibridização foi composta de 50% de formamida (v/v), 10% de dextrano sulfato (p/v), 2xSSC e 5 ng/ μ l de cada uma das sondas. Tanto os cromossomos quanto as sondas foram desnaturados a 75°C por 5 minutos, e em seguida hibridizados a 37°C por até 48 horas em câmara úmida. Os banhos pós-hibridização foram realizados em 0,1xSSC a 42°C, e o nível de estringência final da hibridização foi de aproximadamente 76%. A sonda de DNAr 45S foi detectada usando anticorpo primário anti-digoxigenina produzido em

ovelha conjugado com FITC (Roche), e amplificada pelo anticorpo secundário contra anti-digoxigenina de ovelha produzido em asno conjugado com FITC (Vector), em BSA 3% (p/v). Para cada etapa de detecção, as lâminas foram mantidas por 1 hora a 37°C em câmara úmida. As lâminas foram contra-coradas e montadas em solução de DAPI (2 µg/ml):Vectashield (Vector; 1:1, v/v).

As imagens das melhores células foram observadas, capturadas e editadas conforme descrito anteriormente para bandeamento cromossômico com CMA/DAPI.

4.2.2.4 Medições cromossômicas e Idiogramas

Para cada espécie estudada, no mínimo 5 metáfases completas e com visível morfologia cromossômica foram analisadas. Através do *software* Adobe Photoshop CS3 versão 10.0, foi realizada a contagem do número cromossômico somático (2n), medição do braço curto (bc) e longo (bl) de cada cromossomo, tamanho total (T) de cada cromossomo, razão entre braços (RB=bl/bc), além do tamanho e posição de blocos heterocromáticos (CMA/DAPI) e dos sítios de DNAr 5S e 45S.

O valor médio de RB de cada par cromossômico foi usado para classificá-los em relação a posição do centrômero, ou seja, como metacêntrico (M; $RB < 1,5$), submetacêntrico (SM; $1,5 \leq RB < 3$) ou acrocêntrico (A; $RB \geq 3$), de acordo com Guerra (1986).

Os idiogramas representando os complementos haploides de cada espécie analisada foram montados usando o *software* Corel Draw versão X6, ordenando os cromossomos de maior para o de menor tamanho.

4.2.3 Estimativa do tamanho do genoma

4.2.3.1 Citometria de fluxo

O tamanho do genoma das três espécies foi estimado através da citometria de fluxo, conforme protocolo descrito por Doležel et al. (2007). Seguindo o modelo de padronização interna (DOLEŽEL, 1991), os núcleos das amostras e do padrão de referência foram isolados, corados e analisados simultaneamente. O padrão interno de referência usado foi *Glycine max* var. Polanka, cujo tamanho do genoma é estimado em 2,5 pg DNA/2C ou 1206 Mpb (DOLEŽEL et al., 1994).

O isolamento e suspensão dos núcleos foi realizado segundo a metodologia proposta por Galbraith et al. (1983). Fragmentos de folhas

frescas (cerca de 30 mg) foram maceradas juntamente com fragmentos de folhas de *G. max*, com o auxílio de uma lâmina, em placas de petri adicionando-se 1,5 ml de tampão de extração de núcleos WPB (*Woody Plant Buffer*; LOUREIRO et al., 2007). Em seguida, a suspensão foi filtrada em malha de *nylon* de 20 nm, corada com 20 µl de iodeto de propídio (1 mg/ml), e lida em citômetro de fluxo PARTEC CyFlow equipado com *laser* de luz verde de 488 nm. Para cada espécie, foram analisados três indivíduos diferentes em triplicatas, onde 10.000 núcleos foram medidos em cada leitura.

Os histogramas de intensidade de fluorescência relativa obtidos foram analisados quanto às médias, áreas e coeficientes de variação através do *software* FlowMax versão 2.4 (Partec). O conteúdo absoluto de DNA nuclear (pg), ou o tamanho do genoma, (onde 1 pg DNA/2C é equivalente a 978 Mpb; DOLEŽEL et al., 2003) foi estimado com base na fluorescência média emitida pelos núcleos em fase G1 do ciclo celular, de acordo com a equação (DOLEŽEL & BARTOŠ, 2005):

$$\text{Quantidade de DNA } \left(\frac{\text{pg}}{2C} \right) = \left[\frac{\text{fluorescência média do pico G1 da amostra}}{\text{fluorescência média do pico G1 do padrão}} \right] \times \text{conteúdo de DNA } \left(\frac{\text{pg}}{2C} \right) \text{ do padrão}$$

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização citogenética

As espécies de bambus lenhosos neotropicais analisadas apresentaram os seguintes números cromossômicos somáticos: $2n=46$ para *Guadua chacoensis* (Figura 2.1) e para *G. angustifolia* (Figura 2.2), e $2n=44$ para *Chusquea tenella* (Figura 2.3).

O bandeamento cromossômico com CMA/DAPI e a FISH sequencial com sondas de DNAr 5S e 45S revelaram um padrão cariotípico notadamente estável nos complementos cromossômicos das três espécies analisadas. Somente um par de bandas CMA⁺/DAPI⁻ foi observado, este localizado na região terminal do braço longo do par I de *G. chacoensis* (Figura 2.1a) e de *G. angustifolia* (Figura 2.2a), e do braço curto do par VI de *C. tenella* (Figura 2.3a). Uma das bandas CMA⁺/DAPI⁻ do par de *C. tenella* se mostrou frequentemente com sinal mais fraco. Não foram observadas bandas CMA⁻/DAPI⁺ nos complementos cromossômicos das espécies analisadas.

A FISH com sondas de DNAr 5S e 45S identificou somente um par de sítios para cada família de DNAr, estes ocorrendo em cromossomos distintos. Nas três espécies, o par de sítios de DNAr 45S se encontra colocalizado com o par de bandas CMA⁺/DAPI⁻. O par de sítios de DNAr 5S se localiza na região intersticial do braço longo do par VI de *G. chacoensis* (Figura 2.1b) e do par X de *G. angustifolia* (Figura 2.2b), e no braço curto do par X de *C. tenella* (Figura 2.3b).

Assim como o padrão de bandas heterocromáticas e número de sítios de DNAr, a morfologia cromossômica das três espécies se apresentou bastante similar. Os complementos são formados por cromossomos submetacêntricos (SM) e metacêntricos (M), caracterizando um cariótipo simétrico (PASZKO, 2006). Dentre os 23 pares cromossômicos observados para *G. chacoensis* e *G. angustifolia*, foram observados 14 SM + 9M e 12 SM + 11 M, respectivamente. Já dentre os 22 pares cromossômicos de *C. tenella*, foram observados 9 SM + 13 M.

Quanto ao tamanho total dos cromossomos, as espécies de *Guadua* apresentaram cromossomos maiores em relação à *C. tenella*, variando de 7,82 a 2,21 μm em *G. chacoensis* e de 7,63 a 2,00 μm em *G. angustifolia*. Em *C. tenella*, a variação observada foi de 4,41 a 1,98 μm .

Os cromossomos das três espécies foram pareados dois a dois de acordo com as marcações citogenéticas, tamanho e localização do

centrômero, e posteriormente organizados na forma de cariógramas (Figuras 2.1c, 2.2c e 2.3c). A morfologia cromossômica, assim como tamanho, razão entre braços e os padrões de distribuição de bandas heterocromáticas e de sítios de DNAr 5S e 45S estão sintetizados em idiogramas (Figuras 2.1d, 2.2d e 2.3d).

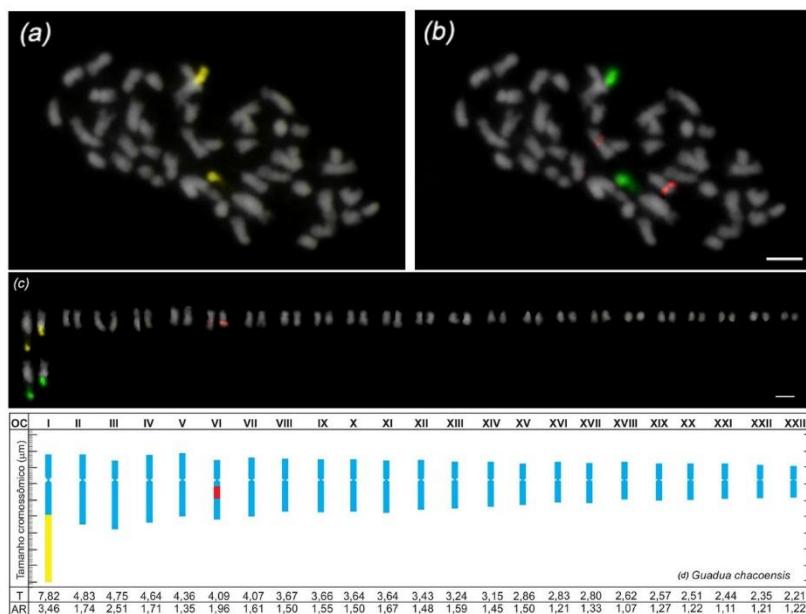


Figura 2.1. Caracterização do cariótipo de *Guadua chacoensis* após bandeamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S em cromossomos metafásicos. **(a)** Distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ (amarelo); **(b)** Localização de sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) na mesma célula; **(c)** Cariograma proposto para os 23 pares cromossômicos; **(d)** Idiograma do complemento haploide, mostrando bandas CMA⁺/DAPI⁻ (amarelo) e sítios de DNAr 5S (vermelho), onde OC: ordem cromossômica, T: tamanho total dos cromossomos (μm), AR: razão entre braços (“arm ratio”). As barras em (b) e (c) correspondem a 5 μm .

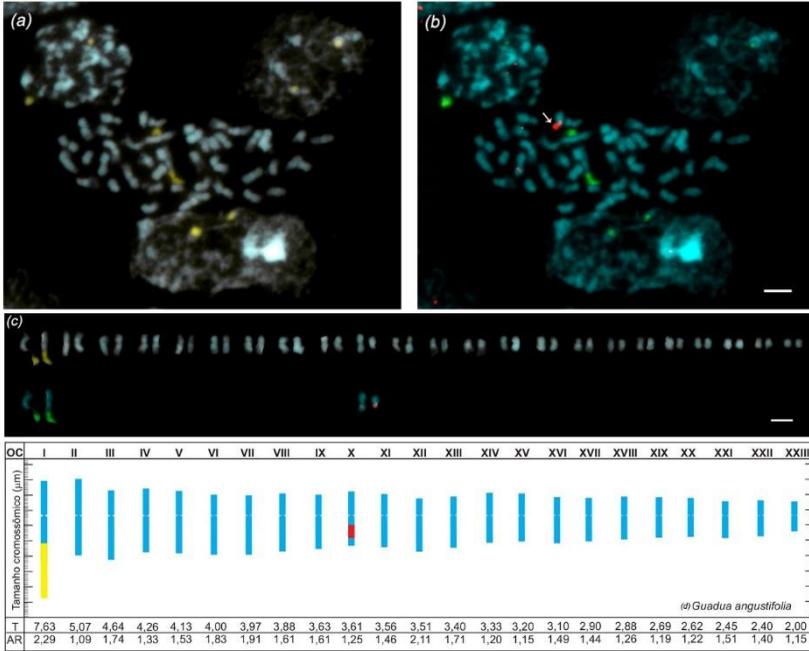


Figura 2.2. Caracterização do cariótipo de *Guadua angustifolia* após bandeamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S em cromossomos metafásicos. **(a)** Distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI (amarelo); **(b)** Localização de sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) na mesma célula. Cabeça da seta indica possível sinal inespecífico; **(c)** Cariograma proposto para os 23 pares cromossômicos; **(d)** Idiograma do complemento haploide, mostrando bandas CMA⁺/DAPI (amarelo) e sítios de DNAr 5S (vermelho), onde OC: ordem cromossômica, T: tamanho total dos cromossomos (μm), AR: razão entre braços (“arm ratio”). As barras em (b) e (c) correspondem a 5 μm .

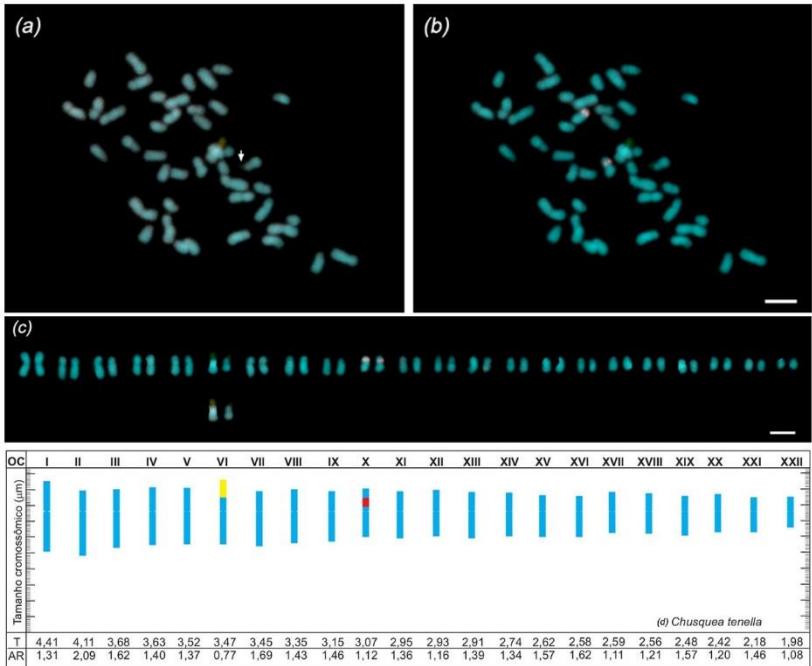


Figura 2.3. Caracterização do cariótipo de *Chusquea tenella* após bandeamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S em cromossomos metafásicos. **(a)** Distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ (amarelo). Cabeça da seta indicando banda CMA⁺/DAPI⁻ de sinal mais fraco; **(b)** Localização de sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) na mesma célula; **(c)** Cariograma proposto para os 22 pares cromossômicos; **(d)** Idiograma do complemento haploide, mostrando bandas CMA⁺/DAPI⁻ (amarelo) e sítios de DNAr 5S (vermelho), onde OC: ordem cromossômica, T: tamanho total dos cromossomos (μm), AR: razão entre braços (“arm ratio”). As barras em (b) e (c) correspondem a 5 μm .

4.3.2 Estimativa do tamanho do genoma

O tamanho do genoma, ou conteúdo de DNA nuclear, de *Guadua chacoensis*, *G. angustifolia* e *Chusquea tenella* foi estimado através da técnica de citometria de fluxo, utilizando *Glycine max* var. Polanka (2,5 pg DNA/2C) como padrão interno de referência. Os histogramas de intensidade de fluorescência relativa apresentaram boa resolução para as três espécies analisadas, com os coeficientes de variação (CV) das médias dos picos G1, tanto para as espécies de bambu quanto para o padrão interno de referência, inferiores à 5% (Figura 2.4).

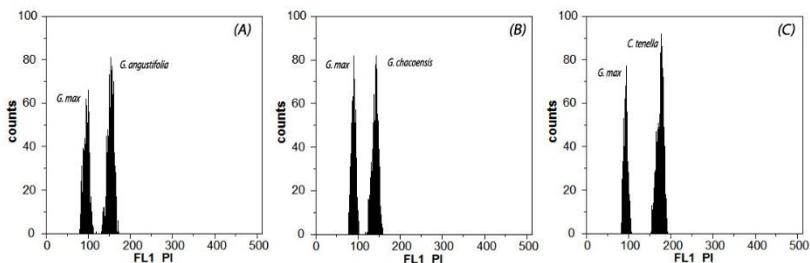


Figura 2.4. Histogramas de intensidade de fluorescência relativa obtidos a partir da análise por citometria de fluxo de núcleos isolados e corados com iodeto de propídio de (A) *G. angustifolia*; (B) *G. chacoensis*, e; (C) *C. tenella*. O padrão interno de referência utilizado foi *G. max*.

O tamanho do genoma estimado para *C. tenella* ($4,77 \pm 0,051$ pg DNA/2C) foi ligeiramente maior ao valor estimado para *G. chacoensis* ($3,98 \pm 0,063$ pg DNA/2C) e *G. angustifolia* ($3,99 \pm 0,066$ pg DNA/2C), cujos valores foram muito similares (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Tamanho do genoma de *G. chacoensis*, *G. angustifolia* e *C. tenella* estimado por citometria de fluxo.

Espécie	Conteúdo de DNA nuclear (pg DNA/2C)	Tamanho do genoma (Mpb)	Número cromossômico
<i>G. chacoensis</i>	$3,98 \pm 0,063^*$	$3896 \pm 62,16$	$2n=46$
<i>G. angustifolia</i>	$3,99 \pm 0,066$	$3902 \pm 65,25$	$2n=46$
<i>C. tenella</i>	$4,77 \pm 0,051$	$4665 \pm 49,02$	$2n=44$

*Desvio padrão da média

4.4 Discussão

4.4.1 Caracterização citogenética

Os números cromossômicos observados para *G. chacoensis* e *G. angustifolia* ($2n=46$) estão de acordo com registros prévios para estas espécies (QUARÍN, 1977; CHEN et al., 2003; VALENCIA et al.; 2012). Outras espécies do gênero *Guadua* tiveram seus números cromossômicos estimados em $2n=46$, como *G. paraguayana* Döll (QUARÍN, 1977) e *G. capitata* (Trin.) Munro (GOULD & SODERSTROM, 1967), e em $2n=48$ como *G. macclurei* R. W. Pohl & Davidse (DAVIDSE & POHL, 1992). O número básico mais frequente para o gênero é $x=12$, sugerindo que $2n=46$ seria resultado de séries de disploidia a nível tetraploide.

O número cromossômico somático $2n=44$ observado em *C. tenella* é o primeiro registro para a espécie. Embora este mesmo número tenha sido observado em *C. oxylepsis* (Hack.) Ekman (HUNZIKER et al., 1989), a maioria das espécies do gênero possuem complementos cromossômicos de $2n=40$, como *C. lehmannii* Pilg., *C. subtessellata* Hitchc. (POHL & DAVIDSE, 1971), *C. scandens* Kunth (DAVIDSE & POHL, 1972), *C. tessellata* Munro (DAVIDSE & POHL, 1978), *C. bambusoides* (Raddi.) Hack (HUNZIKER et al., 1982), *C. capituliflora* Trin. (POHL & CLARK, 1992). Portanto, as espécies do gênero *Chusquea* seriam consideradas tetraploides baseadas no número básico $x=10$ e 11 (CLARK et al., 1989).

Os cariótipos analisados são considerados simétricos, devido a predominância de cromossomos SM e M (PASZKO, 2006), e relativamente estáveis devido a observação de poucos polimorfismos entre eles, isto é, do mesmo número de bandas heterocromáticas e de sítios de DNAr 5S e 45S (GUERRA, 1988). As sutis diferenças observadas entre os cariótipos das espécies analisadas estão relacionadas a localização destes marcadores citogenéticos nos complementos cromossômicos.

Em ambas as espécies de *Guadua*, o par de bandas CMA⁺/DAPI⁺ e de sítios de DNAr 45S ocorrem no braço longo do par I (Figura 2.1a, b, para *G. chacoensis*; Figura 2.2a, b, para *G. angustifolia*). O par de bandas CMA⁺/DAPI⁺ e de sítios de DNAr 45S de *C. tenella*, por outro lado, são localizados no braço curto do par IV (Figura 2.3a, b). A variação na localização destas marcações em relação as espécies de *Guadua* pode ser resultante de modificações estruturais nos cromossomos que ocorrem ao longo da evolução dos cariótipos, as quais envolvem inversões, deleções

ou translocações, contribuindo para o isolamento reprodutivo, e consequentemente, para o surgimento de uma nova espécie (RASKINA et al., 2008). Assim sendo, a caracterização de mais espécies dos gêneros *Guadua* e *Chusquea* é fundamental para o melhor entendimento do papel das variações cromossômicas estruturais nas relações evolutivas do grupo dos bambus lenhosos neotropicais.

Nas três espécies analisadas, os sítios de DNAr 45S se encontraram colocalizados com bandas CMA⁺/DAPI, sugerindo a riqueza em pares de base GC nesta família de genes ribossomais. Esta região CMA⁺/DAPI associada ao DNAr 45S (ou região organizadora de nucléolos; NORs) é principal região heterocromática identificada através de bandeamento com CMA/DAPI (GUERRA, 2000). Em plantas, esta associação é bastante comum, como relatado em *Crotalaria* L. (Fabaceae; MONDIN et al., 2007), *Helictotrichon* Besser (Poaceae; WINTERFELD & RÖSER, 2007), *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae; BERJANO et al., 2009) e *Amaranthus* L. (Amaranthaceae; KOLANO et al., 2013).

Nas espécies de *Guadua*, os pares de sítios de DNAr 5S observados ocorrem em cromossomos diferentes. Em *G. chacoensis*, ocorrem no par VI (Figura 2.1d), enquanto que em *G. angustifolia* ocorrem no par X (Figura 2.2d). Por serem morfológicamente bastante semelhantes, estas duas espécies são frequentemente confundidas (LONDOÑO & PETERSON, 1992). Portanto, a localização dos sítios de DNAr 5S pode ser uma característica citotaxonômica putativa para a distinção entre as duas espécies.

Em Poaceae, os sítios de DNAr 45S apresentam distribuição preferencial na região terminal do braço curto dos cromossomos (ROA & GUERRA, 2012). Já os sítios de DNAr 5S, frequentemente localizados em cromossomos distintos dos sítios de DNAr 45S, ocorrem preferencialmente na região intersticial do braço curto (ROA & GUERRA, 2015). As espécies *G. chacoensis* e em *G. angustifolia* apresentam uma variação nestes padrões de distribuição, uma vez que os sítios de ambas as famílias de DNAr ocorrem no braço longo dos pares cromossômicos.

Em Bambusoideae, são poucos os estudos relativos a caracterização do cariótipo e localização de DNAr, sendo estes os primeiros registros para espécies de bambus lenhosos neotropicais. Em *Bambusa oldhamii* (Munro), *B. gibboides* W.T. Lin e *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz, espécies da linhagem paleotropical, foram observados três pares de sítios de DNAr 45S, enquanto que em *Indosasa gigantea* (T.H. Wen) T.H. Wen, *Pleioblastus gramineus* (Bean) Nakai, *Phyllostachys vivax* McClure e *P. heterocycla* (Carrière) S. Matsum,

espécies da linhagem temperada, foram observados dois sítios de DNAr 45S (PENG et al., 2013; ZHOU et al., 2016).

4.4.2 Paleopoliploides e Diploidização

A poliploidia é atualmente reconhecida como uma das principais forças evolutivas em plantas, e em especial na evolução da família Poaceae (LEVY & FELDMANN, 2002; SOLTIS et al., 2014). Dentro do grupo dos bambus lenhosos, este é o estado citológico mais frequente (HILU, 2004), bem como é uma importante fonte de variabilidade genética tendo em vista o comportamento peculiar de floração do grupo (longos intervalos entre ciclos e geralmente monocárpico; NIRMALA et al., 2014).

Nas diferentes linhagens de bambus lenhosos, a poliploidia seria consequência de eventos independentes de alopoliploidização, onde cinco genomas parentais foram identificados. As espécies temperadas tetraploides seriam compostas por genomas do tipo A e B, as tropicais tetraploides por genomas C e D, e as hexaplóides (geralmente paleotropicais) por genomas C, D e E. No entanto, não foram identificadas espécies diploides atuais com genomas correspondentes aos envolvidos nos eventos de alopoliploidização (TRIPLETT et al., 2014).

Como tendência geral, espera-se o padrão de aditividade dos genomas parentais num genoma de origem alopoliploide (SOLTIS & SOLTIS, 2009). Este padrão pode ser observado em alopoliploides recém-formados de *Nicotiana* (Solanaceae; CLARKSON et al., 2005), de *Tragopogon* (Asteraceae; PIRES et al., 2004; CHESTER et al., 2012), de *Passiflora misera* (Passifloraceae; de MELO & GUERRA, 2003), de *Brassica* (Brassicaceae; HASTEROK et al., 2006) e de *Cucumis* (Cucurbitaceae; ZHANG et al., 2016), entre outros.

Nas espécies de bambu paleotropicais, o padrão de aditividade pode ser identificado, uma vez que três pares de sítios de DNAr 45S foram observados, confirmando a origem alohexaploide do grupo (ZHOU et al., 2016). Tanto nas espécies temperadas, quanto nas neotropicais estudadas, o esperado seria a observação de, no mínimo, quatro bandas heterocromáticas e de quatro sítios de DNAr 45S e de 5S para confirmar a origem alotetraploide dos grupos. No entanto, Peng et al. (2013) e Zhou et al. (2016) observaram dois sítios de DNAr 45S em espécies temperadas, assim como o presente estudo, que observou duas bandas heterocromáticas e dois sítios de cada família de DNAr em espécies neotropicais.

Assim como em números de bandas heterocromáticas, a redução no número de sítios de DNAr 5S e 45S, em relação ao esperado pela aditividade dos genomas parentais, é indicativo do estado diploidizado de genomas poliploides (PONTES et al., 2004; CLARKSON et al., 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; KOVARIK et al., 2008; BERJANO et al., 2009; WINTERFELD et al., 2009, 2012; KOTSERUBA et al., 2010; WÖLK et al., 2015; FIGUEREDO et al., 2016). Diante da estimativa de origem durante o Mioceno dos bambus lenhosos neotropicais (RUIZ-SANCHEZ, 2011; WU et al., 2015; ZHANG et al., 2016) e da ausência de variações cariotípicas em relação a distribuição de bandas heterocromáticas e de sítios de DNAr, sugere-se, portanto, que as três espécies analisadas sejam paleopoliploides diploidizados.

A diploidização é um processo contínuo na evolução de genomas aloploiploides, e que tem como objetivo estabilizar as consequências causadas pelo “choque genômico” decorrentes da combinação e duplicação dos genomas parentais (MA & GUSTAFSON, 2005). Este processo envolve ampla reorganização cromossômica, eliminação de DNA repetitivo, além do silenciamento ou alteração na função de genes duplicados, e consequentemente a redução do tamanho do genoma poliploide (LEITCH & LEITCH, 2008; DODSWORTH et al., 2016). O resultado é a formação de um genoma paleopoliploide com características genética e citológicas de um genótipo diploides, no que se diz respeito a função genica, segregação e pareamento cromossômico (WOLFE, 2001).

Ainda que o presente trabalho aponte os primeiros indícios da condição diploidizada dos genomas de *G. chacoensis*, *G. angustifolia* e *C. tenella*, estudos complementares se fazem necessários para a confirmação desta característica. A identificação de espécies diploides que contenham os genomas parentais envolvidos na aloploidização é fundamental para a comparação entre cariótipos. Ainda, outras técnicas moleculares podem ser aplicadas para a identificação do estado diploidizado dos bambus lenhosos neotropicais, como a identificação do número e do comportamento de genes duplicados (AKHUNOVA et al., 2010; BOUTTE et al., 2016).

4.4.3 Tamanho do genoma

Estes são os primeiros registros para a estimativa do tamanho do genoma de *G. chacoensis* e *C. tenella*, e o primeiro para o gênero *Chusquea*. A primeira (e única) estimativa do tamanho do genoma de uma espécie de bambu neotropical foi para *G. angustifolia*, onde Gielis et al. (1997) estimaram o tamanho do genoma desta espécie em 3,03 pg DNA/2C. Porém, os autores utilizaram glóbulos vermelhos de galinha como padrão interno de referência, o que não é considerado adequado para a estimativa do tamanho do genoma de espécies vegetais (GREILHUBER et al., 2007), podendo ser a causa da variação com o valor observado no presente estudo.

Assim como o número cromossômico e nível de ploidia, o tamanho do genoma de espécies da família Poaceae é altamente variável. O menor genoma conhecido para a família é da espécie diploide *Oropetium thomaeum* (0,5 pg DNA/2C), enquanto que o maior é do híbrido octaploide *Triticale* (51,96 pg DNA/2C). As espécies de bambus neotropicais estudadas se enquadram no valor médio estimado para a família ($10,9 \pm 8,24$ pg DNA/2C; BENNETT & LEITCH, 2012), e na categoria de espécies de Angiospermas com genoma de tamanho pequeno (de 2,8 a 7,0 pg DNA/2C; LEITCH et al., 1998).

Embora os genomas de espécies de gramíneas sejam amplamente estudados, poucos são os estudos sobre o tamanho do genoma de espécies da subfamília Bambusoideae. Em geral, a variação observada no tamanho do genoma de bambus é de 1,67 pg DNA/2C (*Bambusa affinis*) a 5,61 pg DNA/2C (*Pseudosasa japonica*; ZHOU et al., 2016), baseando-se especialmente em espécies de linhagens paleotropicais e temperadas (GIELIS et al. 1997, GUI et al., 2007; KUMAR et al., 2011; JIA et al., 2016; ZHOU et al.; 2016).

A variação no tamanho do genoma em Angiospermas pode estar relacionada ao número cromossômico e ao nível de ploidia (BENNETZEN et al., 2005; SOLTIS et al., 2009). Porém, esta relação não pode ser observada tanto em espécies de bambu cujo tamanho do genoma tenha sido estimado em estudos anteriores (JIA et al., 2016; ZHOU et al., 2016), quanto nas espécies neotropicais analisadas no presente estudo. Ambas com $2n=46$ cromossomos, *G. angustifolia* e *G. chacoensis* apresentaram genoma de menor tamanho em relação à *C. tenella*, com $2n=44$ cromossomos (Tabela 2.1).

Assim como em Angiospermas em geral, considera-se que a variação no tamanho do genoma em gramíneas seja atribuída ao conteúdo e amplificação de DNA repetitivo, principalmente elementos

transponíveis (ET; GAUT, 2002; DEVOS, 2010; MACAS et al., 2015). Em milho (*Zea mays*), estima-se que cerca de 85% do genoma seja composto por ET, especialmente retrotransposons com repetições terminais longas (LTR; SCHNABLE et al., 2009). Porém, no genoma muito menor do arroz (*Oryza sativa*), a porção de retrotransposons LTR no genoma é de cerca de 22% (MA et al., 2004).

Deste modo, espera-se que a porcentagem de diversas famílias de ET seja importante em genomas de espécies de bambu (ZHOU et al., 2011). Peng et al. (2013) realizaram o primeiro e único sequenciamento amplo de uma espécie de bambu (*Phyllostachys heterocycla*), e observaram que 59% do genoma desta espécie é composto por ET, dos quais 36,6% consiste em retrotransposons LTR.

O conhecimento da fração de elementos repetitivos no genoma, bem como a natureza destes, é considerado um fator importante para a confirmação da condição diploidizada de espécies paleopoliploides. Um dos mecanismos reconhecidos no processo de diploidização é a eliminação de sequências de DNA repetitivo, o que reduz, assim, o tamanho do genoma em relação ao padrão de aditividade esperado dos genomas parentais (SOLTIS et al., 2015). Ainda, uma das principais técnicas empregadas no reconhecimento de genomas parentais em aloploiploides é a GISH (hibridização genômica *in situ*), que identifica principalmente sequências repetitivas no genoma, e cuja resolução pode ser comprometida quando aplicada a espécies diploidizadas (CLARKSON, et al., 2005; CHESTER et al., 2010).

4.5 Conclusões

Os números cromossômicos observados para ambas as espécies de *Guadua* confirmam os registros anteriores, enquanto que este é o primeiro registro para *Chusquea tenella*. Os cariótipos das três espécies se apresentaram simétricos e estáveis. Somente duas bandas heterocromáticas, dois sítios de DNAr 45S e dois de DNAr 5S foram observados, o que caracteriza os cariótipos como paleopoliploides diploidizados.

As três espécies apresentaram genoma de tamanho pequeno, sendo esta a primeira estimativa para *G. chacoensis* e para o gênero *Chusquea*. O tamanho do genoma estimado para *G. angustifolia* não corrobora com estimativas anteriores, possivelmente devido ao uso de diferentes padrões internos de referência.

Referências

- AKHUNOVA, A.R., MATNIYAZOV, R.T.; LIANG, H.; AKHUNOV, E.D. (2010) Homoelog-specific transcriptional bias in allopolyploid wheat. **BMC Genomics**, 11(1): 505.
- BARROS e SILVA, A. E.; GUERRA, M. (2010) The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, 85(2): 115-125.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. (2012) **Plant DNA C-values database**. (Release 6.0, Dec. 2012).
- BENNETZEN, J. L.; MA, J.; DEVOS, K. M. (2005) Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Annals of Botany**, 95(1): 127-132.
- BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S.; GUERRA, M. (2009) Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, 280(3-4): 219-227.
- BOUTTE, J.; ALIAGA, B.; LIMA, O.; CARVALHO, J.F. de; AINOUCHE, A.; MACAS, J.; ROUSSEAU-GUEUTIN, M.; CORITON, O.; AINOUCHE, M.; SALMON, A. (2016) Haplotype detection from next-generation sequencing in high-ploidy-level species: 45S rDNA gene copies in the hexaploid *Spartina maritima*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 6(1): 29-40
- BPG (Bamboo Phylogeny Group) (2012). An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, 24(1): 1-10.
- BYSTRIAKOVA, N.; KAPOS, V.; LYSENKO, I. (2004). **Bamboo Biodiversity**. UNEP-WCMC/INBAR.
- CHEN, R.Y.; LI, X.I.; SONG, W.Q.; LIANG, G.I.; ZHANG, P.X., LIN, R.S.; ZONG, W.X., CHEN, C.B.; FUNG, H.L. (2003) **Chromosome atlas of major economic plants genome in China**, v.4, Chromosome atlas of various bamboo species. Science Press, Beijing.

CHESTER, M.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. (2010). Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). **Genes**, 1(2): 166-192.

CHESTER, M.; GALLAGHER, J. P.; SYMONDS, V. V.; DA SILVA, A. V. C.; MAVRODIEV, E. V.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D. E. (2012) Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(4): 1176-1181.

CLARK, L. G.; DAVIDSE, G.; ELLIS, R. P. (1989) Natural hybridization in bamboos: evidence from *Chusquea* sect. *Swallenochloa* (Poaceae: Bambusoideae). **National Geographic Research (USA)**, 5: 459-476.

CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. (2015) Bamboo taxonomy and habitat. In: Liese, W.; Kohl, M. (eds) **Bamboo, tropical forestry**. Springer International Publishing, Switzerland, pp 1–30.

CLARKSON, J. J.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; LEITCH, A. R. (2005) Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). **New Phytologist**, 168(1): 241-252.

DAVIDSE, G.; POHL, R.W. (1972) Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on some grasses from Central America and the West Indies. **Canadian Journal of Botany**, 50: 1441-1452.

DAVIDSE, G.; POHL, R. W. (1978) Chromosome numbers of tropical American grasses (Gramineae): 5. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 65(2): 637-649.

DAVIDSE, G.; POHL, R.W. (1992) New taxa and nomenclatural combinations of Mesoamerican grasses (Poaceae). **Novon**, 2(2): 81-110.

de MELO, N. F.; GUERRA, M. (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, 92(2): 309-316.

DEVOS, K. M. (2010) Grass genome organization and evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, 13(2): 139-145.

DOBIGNY, G.; DUCROZ, J.-F.; ROBINSON, T.J.; VOLOBOUEV, V. (2004) Cytogenetics and cladistics. **Systematic Biology**, 53: 470–484.

DODSWORTH, S.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. (2016) Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms? **Botanical Journal of the Linnean Society**, 180(1): 1-5.

DOLEŽEL, J. (1991) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, 2: 143–154.

DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVÁ, M.; NOVÁK, F. J. (1994) Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, 36(3): 351.

DOLEŽEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, 51: 127–128.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, 95(1): 99-110.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plant using flow cytometry. **Nature Protocols**, 2(9): 2233-2244.

FAY, M. F.; COWAN, R. S.; LEITCH, I. J. (2005) The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. **Annals of Botany**, 95(1): 237-246.

FIGUEREDO, A.; OLIVEIRA, Á. W. D. L.; CARVALHO-SOBRINHO, J. G.; SOUZA, G. (2016) Karyotypic stability in the paleopolyploid genus *Ceiba* Mill. (Bombacoideae, Malvaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 39(4): 1087-1093.

FISHER, A. E.; CLARK, L. G.; KELCHNER, S. A. (2014) Molecular phylogeny estimation of the bamboo genus *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) and description of two new subgenera. **Systematic Botany**, 39(3): 829-844.

FLORA DO BRASIL (2017) *Chusquea* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13085>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. (1983) Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. **Science**, 220 (4601): 1049-1051.

GAUT, B. S. (2002) Evolutionary dynamics of grass genomes. **New Phytologist**, 154(1): 15-28.

GIELIS, J.; VALENTE, P.; BRIDTS, C.; VERBELEN, J.-P. (1997) Estimation of DNA content of bamboos using flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. **The Bamboos**. London: Academic Press, pp.215-223.

GOULD, F.W.; SODERSTROM, T.R. (1967) Chromosome numbers of tropical American grasses. **Arn. Jour. Bot.**, 54: 676-683.

GRECO, T.M. (2013) **Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na ilha de Santa Catarina, Brasil**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, CCB, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Florianópolis, Brasil.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIRO, J. (2007) Nuclear DNA content measurement. In.: Doležel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J. (Eds.) **Flow Cytometry with Plant Cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**, 67-101.

GUERRA, M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, 10:741-743.

GUERRA, M. (1988) **Introdução à citogenética geral**. Guanabara Koogan, 142p.

GUERRA, M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, 23(4), 1029-1041.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. (2002) **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 201p.

GUERRA, M. (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, 120(3-4): 339-350.

GUI, Y.; WANG, S.; QUAN, L.; ZHOU, C.; LONG, S.; ZHENG, H.; JIN, L.; ZHANG, X.; MA, N.; FAN, L. (2007). Genome size and sequence composition of moso bamboo: a comparative study. **Science in China Series C: Life Sciences**, 50(5): 700-705.

HASTEROK, R.; WOLNY, E.; HOSIAWA, M.; KOWALCZYK, M.; KULAK-KSIAZCZYK, S.; KSIAZCZYK, T.; HENNEN, W.K.; MALUSZYNSKA, J. (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. **Annals of Botany**, 97(2): 205-216.

HERNANDEZ, L.M.; MARÍN, D. (2011) Propagación y crecimiento de *Guadua amplexifolia* Presl., *Guadua angustifolia* Kunth y *Elytrostachys typica* McClure, em três tipos de substratos. **Bioagro**, 23(3): 191-198.

HILU, K. W. (2004). Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). **Australian Journal of Botany**, 52(1): 13-22.

HUNZIKER, J. H.; WULFF, A. F.; SODERSTROM, T. R. (1982) Chromosome studies on the Bambusoideae (Gramineae). **Brittonia**, 34(1): 30-35.

HUNZIKER, J. H.; WULFF, A. F.; WULF, A.; SODERSTROM, T. R. (1989) Chromosome studies on *Anomochloa* and other Bambusoideae (Gramineae). **Darwiniana**, 41-45.

JIA, F.; ZHOU, M.; CHEN, R.; YANG, H.; GAO, P.; XU, C. (2016) Karyotype and genome size in four bamboo species. **Scientia Silvae Sinicae**, 52(9): 57-66.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; STERN, M.J. (1999) **American bamboos**. Washington: Smithsonian. 392p.

KELCHNER, S.A.; BPG (Bamboo Phylogeny Group) (2013) Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 67: 404-413.

KOLANO, B.; SARACKA, K.; BRODA-CNOTA, A.; MALUSZYNSKA, J. (2013) Localization of ribosomal DNA and CMA3/DAPI heterochromatin in cultivated and wild *Amaranthus* species. **Scientia Horticulturae**, 164: 249-255.

KOTSERUBA, V.; PISTRICK, K.; BLATTNER, F. R.; KUMKE, K.; WEISS, O.; RUTTEN, T.; FUCHS, J.; ENDO, T.; NASUDA, S.; GHUKASYAN, A.; HOUBEN, A. (2010) The evolution of the hexaploid grass *Zingieria kochii* (Mez) Tzvel. ($2n=12$) was accompanied by complex hybridization and uniparental loss of ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 56(1): 146-155.

KOVARIK, A.; DADEJOVA, M.; LIM, Y.K.; CHASE, M.W.; CLARKSON, J.; KNAPP, S.; LEITCH, A.R. (2008) Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics. **Annals of Botany**, 101: 815-823.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 38: 847-876.

KUMAR, P. P.; TURNER, I. M.; RAO, A. N.; ARUMUGANATHAN, K. (2011) Estimation of nuclear DNA content of various bamboo and rattan species. **Plant Biotechnology Reports**, 5(4): 317-322.

LEITCH, I. J.; CHASE, M. W.; BENNETT, M. D. (1998) Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. **Annals of Botany**, 82 (Supplement A): 85-94.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. (2007) **Genome size and its uses: the impact of flow cytometry**. In.: Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes (Eds. Doležel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J.), 153-176.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. **Science**, 320(5875): 481-483.

LEVY, A. A.; FELDMAN, M. (2002) The impact of polyploidy on grass genome evolution. **Plant physiology**, 130(4): 1587-1593.

LONDOÑO, X.; PETERSON, P.M. (1992) *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambuseae), its taxonomic identity, morphology, and affinities. **Novon**, 2(1): 41-47.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: test with 37 species. **Annals of Botany**, 100:875–888.

MA, J.; DEVOS, K. M.; BENNETZEN, J. L. (2004) Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. **Genome Research**, 14(5): 860-869.

MA, X. F.; GUSTAFSON, J. P. (2005) Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. **Cytogenetic and genome research**, 109(1-3): 236-249

MACAS, J.; NOVAK, P.; PELLICER, J.; ČÍŽKOVÁ, J.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; NEUMANN, P.; FUKOVÁ, I.; DOLEŽEL, J.; KELLY, L.J.; LEITCH, I. J. (2015) In depth characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe Fabaeae. **PLoS ONE**, 10(11): e0143424.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. (2007) Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8 S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, 30(1): 65-72.

NIRMALA, C.; BISHT, M.S.; PREMILATA, T. (2014) Germplasm evaluation in bamboos: from chromosomes to molecular markers. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, 13(3&4): 99-104.

PASZKO, A. (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**, 258: 39-48.

PEDROSA, A.; JANTSH, M.F.; MOSCONE, E.A.; AMBROS, P.F.; SCHWEIZER, D. (2001) Characterization of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). **Chromosoma**, 110: 203-213.

PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics**, 161:1661-1672.

PENG, Z.; LU, Y.; LI, L.; ZHAO, Q.; FENG, Q.; GAO, Z.; LU, H.; HU, T.; YAO, N.; LIU, K.; et al. (2013) The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heteroclycla*). **Nature Genetics**, 45: 456–461.

PIRES, J. C.; LIM, K. Y.; KOVARÍK, A.; MATYÁSEK, R.; BOYD, A.; LEITCH, A. R.; LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D. E. (2004) Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. **American Journal of Botany**, 91(7): 1022-1035.

POHL, R. W.; CLARK, L. G. (1992) New chromosome counts for *Chusquea* and *Aulonemia* (Poaceae: Bambusoideae). **American journal of botany**, 79(4): 478-480.

POHL, R.W.; DAVIDSE, G. (1971) Chromosome numbers of Costa Rican grasses. **Brittonia**, 23(3): 293-324.

PONTES, O.; NEVES, N.; SILVA, M.; LEWIS, M. S.; MADLUNG, A.; COMAI, L.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. (2004) Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(52): 18240-18245.

QUARÍN, C.L. (1977) Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina subtropical. **Hickenia**, 1: 73-78.

RASKINA, O.; BARBER, J. C.; NEVO, E.; BELYAYEV, A. (2008) Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 120(3-4): 351-357.

ROA, F.; GUERRA, M. (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, 12(1), 225.

ROA, F.; GUERRA, M. (2015) Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 146(3): 243-249.

RUIZ-SANCHEZ, E. (2011) Biogeography and divergence time estimates of woody bamboos: insights in the evolution of Neotropical bamboos. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, 88: 67-75.

SCHNABLE, P. S.; WARE, D.; FULTON, R. S.; STEIN, J. C.; WEI, F.; PASTERNAK, S.; et al. (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**, 326(5956): 1112-1115.

SCHUBERT, I. (2007) Chromosome evolution. **Current opinion in plant biology**, 10(2): 109-115

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. **Annual Review of Plant Biology**, 60: 561-588.

SOLTIS, D.E.; ALBERT, V.A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; dePAMPHILIS, C.W.; WALL, P.K.; SOLTIS, P.S. (2009) Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, 96(1): 336-348.

SOLTIS, D. E.; VISGER, C. J.; SOLTIS, P. S. (2014) The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. **American Journal of Botany**, 101(7): 1057-1078.

SOLTIS, P.S.; MARCHANT, D.B.; PEER, Y.V. de; SOLTIS, D.E. (2015) Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Genetics & Development**, 35: 119-125.

SORENG, R.J.; PETERSON, P.M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F.O.; JUDZIEWICZ, E.J.; FILGUEIRAS, T.S.; DAVIS, J.I.; MORRONE, O. (2015) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematic and Evolution**, 53:117–137.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C.M.A.; SALAMIN, N. & HODKINSON, T.R. (2009) Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): A multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s., **Journal of Plant Research** 122: 95-108.

TRIPLETT, J. K.; CLARK, L. G.; FISHER, A. E.; WEN, J. (2014) Independent allopolyploidization events preceded speciation in the temperate and tropical woody bamboos. **New Phytologist**, 204(1): 66-73.

VALENCIA, J.; RODRÍGUEZ, N.; HERRERA, J.C.; CAMACHO, G. (2012) Caracterización morfológica del cariotipo de *Guadua angustifolia* Kunth. var. *angustifolia* (Bambusoide: Poaceae). **Revista de Investigaciones Universidad del Quindío (Col.)**, 23(2): 17-23.

WANZENBÖCK, E.-M.; SCHÖFER, C.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 11:1007-1016.

WEISS-SCHNEEWEISS, H., TREMETSBERGER, K., SCHNEEWEISS, G. M., PARKER, J. S., & STUESSY, T. F. (2008) Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochoeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. **Annals of Botany**, 101(7), 909-918.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. (2007) Chromosomal localization and evolution of satellite DNAs and heterochromatin in grasses (Poaceae), especially tribe Aveneae. **Plant Systematics and Evolution**, 264(1): 75-100.

WINTERFELD, G.; SCHNEIDER, J.; RÖSER, M. (2009) Allopolyploid origin of Mediterranean species in *Helictotrichon* (Poaceae) and its consequences for karyotype repatterning and homogenisation of rDNA repeat units. **Systematics and Biodiversity**, 7(3), 277-295.

WINTERFELD, G.; SCHNEIDER, J.; PERNER, K.; RÖSER, M. (2012). Origin of Highly Polyploid Species: Different Pathways of Auto- and Allopolyploidy in 12–18x Species of *Avenula* (Poaceae). **International Journal of Plant Sciences**, 173(4): 399-411.

WOLFE, K. H. (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. **Nature Reviews Genetics**, 2(5): 333-341.

WÖLK, A.; WINTERFELD, G.; RÖSER, M. (2015) Genome evolution in a Mediterranean species complex: phylogeny and cytogenetics of *Helictotrichon* (Poaceae) allopolyploids based on nuclear DNA sequences (rDNA, topoisomerase gene) and FISH. **Systematics and Biodiversity**, 13(4): 326-345.

WU, M.; LAN, S.; CAI, B.; CHEN, S.; CHEN, H.; ZHOU, S. (2015) The complete chloroplast genome of *Guadua angustifolia* and comparative analyses of neotropical-paleotropical bamboos. **PLoS ONE**, 10(12): e0143792.

ZHANG, X.-Z.; ZENG, C.-X.; MA, P.-F., HAEVERMANS, T.; ZHANG, Y.-X., ZHANG, L.-N., GUO, Z.-H.; LI, D.-Z. (2016) Multi-locus plastid phylogenetic biogeography supports the Asian hypothesis of the temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Molecular phylogenetics and evolution**, 96: 118-129.

ZHANG, Z. T.; YANG, S. Q.; LI, Z. A.; ZHANG, Y. X.; WANG, Y. Z.; CHENG, C. Y.; LI, J.; CHEN, J.F.; LOU, Q. F. (2016) Comparative chromosomal localization of 45S and 5S rDNAs and implications for genome evolution in *Cucumis*. **Genome**, 59(7): 449-457.

ZHOU, M. B.; LIU, X. M.; TANG, D. Q. (2011) Transposable elements in *Phyllostachys pubescens* (Poaceae) genome survey sequences and the full-length cDNA sequences, and their association with simple-sequence repeats. **Genetics and Molecular Research**, 10(4): 3026-3037.

ZHOU, M.; XU, C.; SHEN, L.; XIANG, W.; TANG, D. (2016) Evolution of genome sizes in Chinese Bambusoideae (Poaceae) in relation to karyotype. **Trees**, 1-8.