



**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

**Mecanismos de Evolução Cariotípica em *Epidendrum* L.
(Orchidaceae: Epidendroideae)**

Felipe Nollet Medeiros de Assis

**AREIA-PB
2013**



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

**Mecanismos de Evolução Cariotípica em *Epidendrum* L.
(Orchidaceae: Epidendroideae)**

Tese apresentada por Felipe Nollet Medeiros de Assis ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Agronomia (área de concentração em Ecologia, Manejo e Conservação de Recursos Naturais)

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Emília Barros e Silva

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

A848m Assis, Felipe Nollet Medeiros de.

**Mecanismos de evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae:
Epidendroideae) / Felipe Nollet Medeiros de Assis. - Areia: UFPB/CCA,
2013.**

121 f. : il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade
Federal da Paraíba, Areia, 2013.

Bibliografia.

Orientador: Leonardo Pessoa Felix.

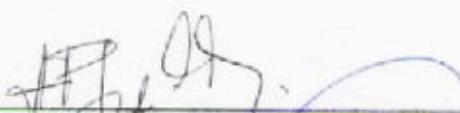
*1. Orchidaceae – Taxonomia 2 . Gênero *Epidendrum* –
Evolução cariotípica 3. Epidendroideae – Subfamília I. Felix,*

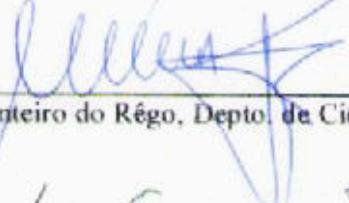
Felipe Nollet Medeiros de Assis

**Mecanismos de Evolução Cariotípica em *Epidendrum* L.
(Orchidaceae: Epidendroideae)**

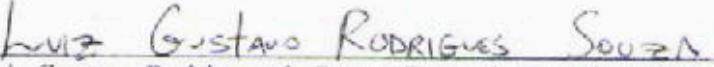
Tese de Doutorado submetida à apreciação pela banca examinadora

Membros titulares:


Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix, Depto. de Fitotecnia, CCA, UFPB


Prof. Dr. Mailson Monteiro do Régo, Depto. de Ciências Biológicas, CCA, UFPB


Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho, Depto. de Botânica, CCB, UFPE


Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues de Souza, Depto de Botânica, CCB, UFPE

Membros suplentes:

Prof. Dr^a. Elizanilda Ramalho do Régo, Depto. de Ciências Fundamentais e Sociais, CCA, UFPB

Prof. Dr^a. Dilma Maria de Brito Melo Trovão, Depto. de Biologia, CCBS, UEPB

Dedico esta tese a três mães:

Simírames Medeiros de Assis (*in memoriam*), porque me deste a vida e, apesar dos poucos anos que pudemos permanecer juntos, o seu amor de mãe é uma certeza que guardo comigo, a fim de que eu possa te reencontrar um dia...

Sírames Medeiros (Tia Linda), porque me educaste com amor, em todos os aspectos, e só assim pude chegar até aqui...

Minha querida Vovó Teté (*in memoriam*), por todo o amor e carinho que só uma mãe pode dar...

AGRADECIMENTOS

A Deus... obrigado Senhor, por todas as realizações, por todas as lições, e por me manter firme em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Leonardo Pessoa Felix, por me aceitar como orientado, pelos conhecimentos científicos, pela disponibilidade constante, pela orientação, pela confiança, amizade e, acima de tudo, por ser um exemplo de moralidade que pretendo seguir.

A Prof^a. Ana Emilia Barros e Silva, pela coorientação, apoio, conselhos e esclarecimentos.

Ao Prof. Marcelo Guerra, por disponibilizar o laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE, e por todo o apoio para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de doutoramento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pelo financiamento desta pesquisa.

Ao meu irmão Victor Hugo, pelo amor, cuidado, atenção e carinho, e por me dar tanto orgulho de ver seus passos em direção a um futuro brilhante.

A Enoque Medeiros Neto, por estar sempre ao meu lado. Obrigado pela parceria, pelo companheirismo nos momentos mais difíceis e por todo o apoio, sempre incondicional.

A grande amiga/irmã Lânia Ísis, pela amizade sincera, apoio constante, e por sempre equilibrar meu temperamento.

A grande amiga Emmanuelly Xavier, principalmente pela amizade firme, e por todo o apoio durante as estadas em Recife, pelo conforto sempre oferecido em todos os aspectos.

A Erton Mendonça, que se tornou um verdadeiro irmão para mim, em qualquer circunstância.

A Álex Willian e Jéssica Nascimento, por essa amizade que me faz tão feliz, e por todo o cuidado e acolhimento que me ofertam sempre.

Aos amigos do laboratório: Juliana Castro, Luciana Ledra, Luciana Firmino, Saulo Antônio, Sarah Nascimento, Helen, Sócrates, Cláudio Montenegro, obrigado pelo apoio, amizade e companheirismo.

Ao amigo Fábio Pinheiro, pela parceria neste trabalho, e pelos espécimes concedidos através do Instituto de Botânica de São Paulo/IBT.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	05
2.1. Orchidaceae.....	05
2.1.1. Taxonomia e Aspectos gerais da família.....	05
2.1.2. Citogenética de Orchidaceae, com ênfase na subfamília Epidendroideae e na subtribo Laeliinae.....	07
2.2. O gênero <i>Epidendrum</i> L.....	09
2.2.1. Caracterização geral.....	09
2.2.2. Considerações taxonômicas.....	09
2.2.3. Citogenética e evolução de <i>Epidendrum</i>	11
2.3. Mecanismos de evolução cariotípica.....	12
2.3.1. Poliploidia.....	14
2.3.2. Disploidia.....	17
2.4. Hibridação e especiação.....	18
2.5. Heterocromatina.....	19
2.5.1. Organização molecular.....	21
2.6. Bandeamento com Fluorocromos.....	23
2.7. Quantificação do tamanho do genoma.....	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
Capítulo 1 – Múltiplos mecanismos de evolução cariotípica estão envolvidos na variabilidade cromossômica numérica em <i>Epidendrum secundum</i> Jacq. (Orchidaceae: subgênero <i>Amphiglottium</i>).....	41
Capítulo 2 – Diversidade cariotípica em espécies e híbridos pertencentes ao gênero <i>Epidendrum</i> L. (Orchidaceae) subgênero <i>Amphiglottium</i> , em inselberges do Nordeste e Sudeste do Brasil.....	67
Capítulo 3 – Distribuição da Heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear em representantes do gênero <i>Epidendrum</i> L. (Orchidaceae: subgêneros <i>Amphiglottium</i> e <i>Epidendrum</i>).....	93

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 Histogramas citométricos de intensidade de fluorescência relativa, obtidos a partir de núcleos foliares corados com Iodeto de Propídeo em diferentes populações de *Epidendrum secundum*: **A.** Atibaia (SP) com $2C = 3,70$ pg, $4C = 7,65$ pg e $8C = 14,20$ pg; **B.** Serra do Rio do Rastro (SC) com $2C = 3,74$ pg, $4C = 7,72$ pg e $8C = 15,48$ pg; **C.** Venezuela com $2C = 3,90$ pg e $4C = 7,99$ pg; **D.** Serra do Rio do Rastro (SC) com $2C = 3,93$ pg, $4C = 7,96$ pg e $8C = 15,77$ pg; **E.** EMA 588 com $2C = 3,97$ pg, $4C = 8,02$ pg e $8C = 15,67$ pg; **F.** Bolívia com $2C = 3,98$ pg e $4C = 8,06$ pg; **G.** Pico das almas (BA) com $2C = 3,98$ pg, $4C = 8,04$ pg e $8C = 15,81$ pg; **H.** Itatiaia (RJ) com $2C = 4,05$ pg e $4C = 8,05$ pg; **I.** JPC 114 com $2C = 4,06$ pg e $4C = 8,12$ pg; **J.** Jundiaí (SP) com $2C = 4,17$ pg e $4C = 7,70$ pg; **K.** Cananéia (SP) com $2C = 4,17$ pg, $4C = 8,32$ pg e $8C = 16,43$ pg; **L.** Apiaí (SP) com $2C = 4,23$ pg, $4C = 8,31$ pg e $8C = 16,05$ pg; **M.** LPF 13256 com $2C = 4,25$ pg, $4C = 9,48$ pg e $8C = 20,36$ pg; **N.** Ibitipoca (MG) com $2C = 4,27$ pg, $4C = 8,62$ pg e $8C = 17,60$ pg; **O.** Epífita com $2C = 4,46$ pg e $4C = 8,01$ pg; **P.** Esperança (PB) com $2C = 4,51$ pg, $4C = 9,11$ pg e $8C = 20,32$ pg; **Q.** Camocim de São Félix (PE) com $2C = 8,08$ pg e $4C = 14,84$ pg; **R.** Serra de Maranguape (CE) com $2C = 8,44$ pg e $4C = 15,33$ pg. Setas indicam picos referentes a $2C$, $4C$, $8C$ e padrão, respectivamente. Os diferentes padrões foram diferenciados pelas cores dos histogramas: em preto, *Oxalis ubraticola* com $2C = 16,5$ pg DNA e em azul, *Tulbaghia smilieri* com $2C = 38,91$ pg DNA.....

49

Figura 2 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população de JPC114 com $2n = 50$ (**a-c**) e $2n = 56$ (**d-f**), coradas com CMA (**a, d**), DAPI (**b, e**) e imagens dos dois fluorocromos (**c, f**). Setas amarelas indicam regiões $CMA^+/DAPI^-$. Insertos em **c** indicam, da esquerda para a direita, regiões terminais distendidas $CMA^+/DAPI^-$, regiões terminais simples $CMA^+/DAPI^-$ e regiões pericentroméricas puntiformes $CMA^+/DAPI^-$, respectivamente. A barra em **f** corresponde a $10\mu m$...

53

Figura 3 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população Atibaia (SP) com $2n = 56$ (**a-c**) e $2n = 56 + 1B$ (**d-f**), coradas com CMA (**a, d**), DAPI (**b, e**) e imagens dos dois fluorocromos (**c, f**). Setas amarelas indicam regiões $CMA^+/DAPI^-$. Insertos em **c** indicam: banda terminal $CMA^-/DAPI^+$ (canto superior esquerdo), região pericentromérica $CMA^0/DAPI^-$ (canto superior direito) e região terminal $CMA^0/DAPI^-$ em cromossomos acrocêntricos (canto inferior direito). Inserto em **f** destaca cromossomo B. A barra em **f** corresponde a $10\mu m$

54

Figura 4 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população Nova Friburgo (RJ) com $2n = 58$ (**a-c**) e Esperança (PB) com $2n = 68$ (**d-f**), coradas com CMA (**a, d**), DAPI (**b, e**) e imagens dos dois fluorocromos (**c, f**). Setas amarelas indicam regiões terminais $CMA^+/DAPI^-$. Cabeça de seta em **f** indica banda pericentromérica $CMA^+/DAPI^-$. Setas brancas indicam cromossomos maiores. A barra em **f** corresponde a $10\mu m$

55

Figura 5 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população Camocim de São Félix (PE) com $2n = 84$ (**a-c**) e Fagundes (PB) com $2n = ca.90$ (**d-f**), coradas com CMA (**a, d**), DAPI (**b, e**) e imagens dos dois fluorocromos (**c, f**). Setas amarelas indicam regiões $CMA^+/DAPI^-$. A barra em **f** corresponde a $10\mu m$

56

Figura 6 Principais hipóteses relacionadas aos mecanismos envolvidos na diversificação cariológica iter e intrapopulacionais em *E. secundum*, com base nos dados da variação cromossômica numérica, nos padrões de distribuição de regiões heterocromáticas ricas em CG e AT, e na quantificação do DNA nuclear. Os esquemas dos cromossomos foram baseados nos tipos de cromossomos em relação ao padrão de regiões heterocromáticas (Figura 2c, 3c, insertos). Os cromossomos alinhados a esquerda são encontrados nos representantes atuais. Os cromossomos alinhados a direita são encontrados comumente em outros representantes do gênero *Epidendrum* (Assis, em preparação), e provavelmente representam cromossomos ancestrais em *E. secundum*. Com base na menor freqüência de ocorrência de bandas $CMA^-/DAPI^+$ nas populações analisadas no presente trabalho, possivelmente este tipo cromossômico foi herdado por hibridização e mantido em algumas populações por introgessão.....

59

Capítulo 2

Figura 1 Dendograma da matriz de distâncias, pelo método de agrupamento por ligação simples, referente à análise morfométrica em *E. flammeeum*, *E. secundum* e o possível híbrido, ocorrentes em simpatria na população de São João do Tigre, Paraíba.....

76

Figura 2 Análise de Componentes Principais em 18 espécimes, com base em 15 caracteres morfológicos florais contínuos (Tabela 1). Os espécimes foram encontrados em simpatria no município de São João do Tigre, Paraíba. **S** = *Epidendrum secundum*; **F** = *Epidendrum flammeeum*; **H** = possível híbrido. Os componentes principais 1 e 2 explicam 76,67% e 9,94% da variação total, respectivamente.....

76

Figura 3 Células mitóticas de espécies simpátricas em uma população de São João do Tigre, PB: *Epidendrum flammeeum* com $2n = 50 + 1B$ (a-c), *E. secundum* com $2n = 62 + 1B + 1$ microcromossomo (d-f), e possível híbrido com $2n = 56$ (g-i); coradas com CMA (a, d, g), DAPI (b, e, h) e imagens dos dois fluorocromos (c, f, i). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻, e cabeças de setas indicam o microcromossomo corado com CMA (d) e com DAPI (e). Insero em c destaca cromossomo B, em f destaca cromossomo B (completamente heterocromático) e microcromossomo (em cinza). A barra em i corresponde a 10µm.....

79

Figura 4 Cariogramas das espécies do gênero *Epidendrum* e do possível híbrido ocorrentes em simpatria no município de São João do Tigre, Paraíba. A. *Epidendrum flammeeum*; B. *E. secundum*; C. possível híbrido. Todos os cariogramas foram organizados por ordem decrescente de tamanho. A barra em C corresponde a 10 µm. A linha pontilhada indica a posição do centrômero.....

80

Figura 5 Células mitóticas de espécies simpátricas em uma população de Nova Friburgo, RJ: *Epidendrum xanthinum* com $2n = 28$ (a-c), *E. secundum* com $2n = 56$ (d-f), e possível híbrido com $2n = 42$ (g-i); coradas com CMA (a, d, g), DAPI (b, e, h) e imagens dos dois fluorocromos (c, f, i). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas CMA⁺/DAPI⁻. Insertos menores em c destacam cromossomos com bandas CMA⁺/DAPI⁻ pericentroméricas adjacentes a bandas terminais CMA⁻/DAPI⁺, enquanto o inserto maior destaca banda DAPI⁺/CMA⁻ intersticial. Insero em i destaca cromossomos possivelmente herdados de *E. xanthinum*. A barra em i corresponde a 10µm.....

81

Figura 6 Cariogramas das espécies do gênero *Epidendrum* e do possível híbrido ocorrentes em simpatria em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. A. *E. xanthinum*; B. *E. secundum*; C. possível híbrido. Todos os cariogramas foram organizados por ordem decrescente de tamanho. A barra em C corresponde a 10 µm. A linha pontilhada indica a posição do centrômero.....

82

Figura 7 Histogramas citométricos de intensidade de fluorescência relativa, obtidos a partir de núcleos foliares corados com iodeto de propídio em representantes do gênero *Epidendrum*, oriundos de diferentes populações simpátricas: **A-C**: *E. flammeeum*, *E. secundum* e possível híbrido, respectivamente (São João do Tigre, Paraíba); **D-F**: *E. xanthinum*, *E. secundum* e possível híbrido, respectivamente (Nova Friburgo, Rio de Janeiro). Foram utilizados como padrões internos espécimes de *Oxalis umbraticola* com $2C = 16,5$ pg (A, D, F) e *Tulbaghia simmleri* com $2C = 38,91$ pg (B, C, E): **A.** *E. flammeeum* com $2C = 5,04$ pg, $4C = 9,90$ pg e $8C = 20,41$ pg; **B.** *E. secundum* com $2C = 4,82$ pg, $4C = 9,26$ pg e $8C = 19,38$ pg; **C.** possível híbrido entre *E. flammeeum* x *E. secundum* com $2C = 4,63$ pg, $4C = 8,61$ pg e $8C = 18,26$ pg; **D.** *E. xanthinum* com $2C = 4,48$ pg e $4C = 9,10$ pg; **E.** *E. secundum* com $2C = 3,68$ pg, $4C = 7,61$ pg e $8C = 15,68$ pg; **F.** possível híbrido entre *E. xanthinum* x *E. secundum* com $2C = 4,37$ pg e $4C = 8,70$ pg.....

83

Capítulo 3

Figura 1 Célula mitótica de *Epidendrum cinnabarinum* com $2n = 224$ (a-c). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻, e cabeça de seta indica cromossomo B de condensação tardia. A barra em c corresponde a 10µm.....

104

Figura 2 Células mitóticas de *E. denticulatum* com $2n = 38$ (a-c), *Epidendrum fulgens* com $2n = 24$

(d-f) e *E. radicans* com $2n = 24$ (g-i), coradas com CMA (a, d, g), DAPI (b, e, h) e imagens dos dois fluorocromos (c, f, i). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas terminais $CMA^+/DAPI^-$. Insertos destacam cromossomos com bandas terminais $DAPI^+/CMA^-$ discretas. A barra em i corresponde a $10\mu\text{m}$

105

Figura 3 Célula mitótica de *E. ciliare* com $2n = 40$ (a-c), coradas com CMA (a), DAPI (b) e imagens dos dois fluorocromos (c). Setas amarelas indicam bandas $CMA^+/DAPI^-$. A barra em c corresponde a $10\mu\text{m}$

106

Figura 4 Células mitóticas de *Epidendrum nocturnum* com $2n = 40$ (a-c) e $2n = 60$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e imagens dos dois fluorocromos (c, f). Setas amarelas indicam regiões pericentroméricas $CMA^+/DAPI^-$. Cabeças de setas amarelas indicam regiões terminais $CMA^+/DAPI^-$. Setas azuis em c indicam regiões pericentroméricas $CMA^-/DAPI^+$, enquanto cabeças de setas azuis indicam regiões terminais $CMA^-/DAPI^+$. Inserto em f destaca cromossomo com braço curto completamente $DAPI^+/CMA^-$ e braço longo $CMA^0/DAPI^-$. A barra em f corresponde a $10\mu\text{m}$

107

Figura 5 Células mitóticas de *Epidendrum pseudodifforme* com $2n = 40$ (a-c) e *E. viviparum* com $2n = 40$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e imagens dos dois fluorocromos (c, f). Setas amarelas indicam regiões pericentroméricas $CMA^+/DAPI^-$. Cabeças de setas amarelas indicam regiões terminais $CMA^+/DAPI^-$. A barra em f corresponde a $10\mu\text{m}$

108

Figura 6 Histogramas citométricos de intensidade de fluorescência relativa, obtidos a partir de núcleos foliares corados com iodeto de propídio, em representantes do gênero *Epidendrum* oriundos de diferentes populações. A-C: subgênero *Amphiglottium*. D-G: subgênero (Eu-) *Epidendrum*. A. *E. cinnabarinum* com $2C = 20,21\text{ pg}$ e $4C = 49,70\text{ pg}$; B. *E. denticulatum* com $2C = 4,06\text{ pg}$ e $4C = 8,10\text{ pg}$; C. *E. fulgens* com $2C = 3,23\text{ pg}$, $4C = 6,59\text{ pg}$ e $8C = 12,47\text{ pg}$; D. *E. latilabre* com $2C = 4,33\text{ pg}$ e $4C = 8,76\text{ pg}$; E. *E. nocturnum* com $2C = 3,37\text{ pg}$ e $4C = 6,80\text{ pg}$; F. *E. paniculatum* com $2C = 3,41\text{ pg}$ e $4C = 6,93\text{ pg}$; G. *E. pseudodifforme* com $2C = 3,94\text{ pg}$ e $4C = 8,26\text{ pg}$. Foi utilizado como padrão interno espécimes de *Oxalis umbraticola* com $2C = 16,5\text{ pg}$, com exceção da quantificação para *E. cinnabarinum*, onde foi utilizado como padrão interno espécimes de *Tulbaghia simmleri* com $2C = 38,91\text{ pg}$

109

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1 Números Cromossômicos conhecidos em <i>Epidendrum</i> L. (organizada <i>sensu</i> Dressler, 1993).....	27
--	-----------

Capítulo 1

Tabela 1 Populações de <i>Epidendrum secundum</i> (subgênero <i>Amphiglottium</i>), com seus respectivos locais de coleta, tamanho do genoma 2C e endoreduplicações 4C e 8C em picogramas (pg) e seus respectivos desvios padrões (DP).....	48
---	-----------

Tabela 2 Populações de <i>Epidendrum secundum</i> (subgênero <i>Amphiglottium</i>) com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (2n), fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF), variação no tamanho cromossômico (μm), número de regiões heterocromáticas terminais (CMA⁺/DAPI⁻ ; CMA⁻/DAPI⁺ ; CMA⁰/DAPI⁻) e pericentroméricas (CMA⁺/DAPI⁻), e indicação da figura para análise cromossômica.....	50
---	-----------

Capítulo 2

Tabela 1 Variáveis utilizadas para as análises morfométricas.....	77
--	-----------

Tabela 2 Espécies do gênero <i>Epidendrum</i> L. (subgênero <i>Amphiglottium</i>), com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (2n), fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF), variação no tamanho cromossômico (μm), tamanho do genoma (pg).....	78
---	-----------

Tabela 3 Espécies do gênero <i>Epidendrum</i> L. (subgênero <i>Amphiglottium</i>) com seus respectivos locais de coleta, número de bandas terminais heterocromáticas (CMA⁺/DAPI⁻ ; CMA⁻/DAPI⁺ ; CMA⁰/DAPI⁻), número de bandas intersticiais (DAPI⁺/CMA⁻) e números de bandas pericentroméricas (CMA⁺/DAPI⁻).....	78
---	-----------

Capítulo 3

Tabela 1 Dados citogenéticos e de conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero <i>Epidendrum</i> , com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (2n), fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF), variação no tamanho cromossômico, tamanho do genoma em picogramas, contagens prévias. Os dados destacados em negrito referem-se ao presente trabalho (PT), enquanto os demais se referem aos dados disponíveis na literatura.....	103
---	------------

“O que vejo na natureza é uma estrutura magnífica que só compreendemos de modo muito imperfeito, e que não tem como não encher uma pessoa racional de um sentimento de humildade”

Albert Einstein

Mecanismos de Evolução Cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)

RESUMO O gênero *Epidendrum* L. é composto por aproximadamente 1.500 espécies de distribuição exclusivamente neotropical, sendo frequente a ocorrência de hibridação, poliploidia e reprodução assexuada. Além disso, algumas espécies apresentam taxonomia complexa, como em *E. secundum*, que apresenta ampla variação cromossômica numérica. O presente trabalho objetivou testar as hipóteses sobre as causas da variabilidade cromossômica numérica em *E. secundum*, investigar a origem híbrida em indivíduos com morfologia floral intermediária entre *E. flammeum* x *E. secundum*, e entre *E. xanthinum* x *E. secundum*, bem como analisar a diversidade de heterocromatina e conteúdo de DNA em espécies pertencentes aos subgêneros *Amphiglottium* e *Epidendrum*. Para tanto, realizou-se a quantificação de DNA nuclear através de citometria de fluxo, análise da distribuição da heterocromatina através do bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI, e para os representantes encontrados nas zonas de hibridação, realizou-se também a análise da morfometria floral. As análises mitóticas apresentaram diferentes contagens cromossômicas que variaram de $2n = 24$ em *E. fulgens* até $2n = 224$ em *E. cinnabarinum*, com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos em todas as espécies. Foram identificadas regiões cromossômicas terminais e pericentroméricas CMA⁺/DAPI⁻, algumas regiões terminais CMA⁻/DAPI⁺ e CMA⁰, de tamanho, número e posição variáveis. As regiões pericentroméricas geralmente apresentaram-se CMA⁰/DAPI⁻ na maioria das espécies. Os tecidos foliares de todos os espécimes analisados apresentaram um ou dois ciclos de endoreduplicação. Para as 18 populações de *E. secundum* analisadas, 16 apresentaram indivíduos diploides, com em média $2C = 4,08$ pg DNA, e em duas populações foram identificados indivíduos tetraploides, com em média $2C = 8,24$ pg DNA. Em algumas populações foram identificados citótipos com cromossomos B em número variável, algumas vezes inteiramente CMA⁺/DAPI⁻. Em relação às análises dos possíveis híbridos, três zonas de hibridação foram investigadas. Em São João do Tigre (PB), *E. flammeum* apresentou $2n = 50$ e conteúdo de DNA $2C = 5,04$ pg DNA, *E. secundum* apresentou $2n = 62$ cromossomos e $2C = 4,82$ pg DNA. Indivíduos híbridos apresentaram $2n = 56$, com $2C = 4,63$ pg DNA. Em Nova Friburgo (RJ), *E. xanthinum* apresentou $2n = 28$ com $2C = 4,48$ pg DNA. Os espécimes de *E. secundum* nesta população apresentaram $2n = 56$ e $2C = 3,68$ pg DNA. O provável híbrido apresentou $2n = 42$ com $2C = 4,37$ pg DNA. A Análise de Componentes Principais e de Agrupamento confirmaram a natureza intermediária dos caracteres morfológicos florais entre os possíveis híbridos e os prováveis parentais. Apesar da ocorrência de números cromossômicos discrepantes em *E. secundum*, as populações não apresentaram conteúdos de DNA com variações significativas pelo teste de Tukey, sugerindo que o aumento no número de cromossomos acrocêntricos é principalmente originada por fissões cêntricas. Altos níveis de compatibilidade reprodutiva sugerem que a hibridação e a introgressão são importantes para os estágios iniciais de especiação em *Epidendrum*. A diversificação cariológica observada parece relacionada a eventos de disploidia e poliploidia, cuja alteração no número fundamental pode ser o resultado de reorganizações intra e intergenômicas complexas.

Palavras-chave: Cromossomos B, Disploidia, Endoreduplicação, Evolução Cariotípica, Fissão cêntrica, Heterocromatina, Morfometria, Poliploidia, Tamanho do genoma.

Mechanisms of karyotype evolution in *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)

ABSTRACT The genus *Epidendrum* L. comprises approximately 1,500 species of exclusively neotropical distribution, with frequent occurrence of hybridization, polyploidy and asexual reproduction. In addition, some species show complex taxonomy, such as *E. secundum*, which shows extensive chromosome number variation. This study aimed to test the hypotheses about the causes of chromosome number variability in *E. secundum*; to investigate the hybrid origin in representatives with intermediate floral morphology between *E. flammeum* x *E. secundum*, and between *E. xanthinum* x *E. secundum*; and to analyze the heterochromatin diversity and DNA content in species belonging to the subgenus *Amphiglottium* and *Epidendrum*. To this end, we performed the quantification of nuclear DNA content by flow cytometry, analysed the heterochromatin distribution using CMA/DAPI fluorochrome banding, and performed the analysis of floral morphology on representatives found in hybridization zones. Mitotic analyzes showed different chromosome counts ranging from $2n = 24$ in *E. fulgens* to $2n = 224$ in *E. cinnabarinum*, with metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes in all species. CMA⁺/DAPI⁻ pericentromeric and terminal chromosome regions, and some CMA⁻/DAPI⁺ and CMA⁰ terminal regions were identified, with variation in size, number and position. Pericentromeric regions generally was CMA⁰/DAPI⁻ in most species. The leaf tissues of all specimens examined presented one or two endoreduplication cycles. To 18 populations of *E. secundum* analyzed, 16 presented diploid individuals, with an average of $2C = 4.08$ pg DNA, and in two populations were identified tetraploid individuals, with an average of $2C = 8.24$ pg DNA. In some populations were identified cytotypes with B chromosomes in variable number, sometimes entirely CMA⁺/DAPI⁻. In relation to putative hybrid analysis, three hybrid zones were investigated. In São João do Tigre (PB), *E. flammeum* presented $2n = 50$ and $2C = 5.04$ pg DNA, *E. secundum* presented $2n = 62$ chromosomes and $2C = 4.82$ pg DNA. Hybrid individuals had $2n = 56$, with $2C = 4.63$ pg DNA. In Nova Friburgo (RJ), *E. xanthinum* presented $2n = 28$ with $2C = 4.48$ pg DNA. The specimens of *E. secundum* in this population presented $2n = 56$ and $2C = 3.68$ pg DNA. The putative hybrids presented $2n = 42$ with $2C = 4.37$ pg DNA. The Principal Component and Cluster Analysis confirmed the intermediate nature of floral morphology among putative hybrids and possible parents. Despite the occurrence of different chromosome numbers in *E. secundum*, populations showed no significant DNA content variation by Tukey test, suggesting that the increase in the number of acrocentric chromosomes is mainly caused by centric fissions. High levels of reproductive compatibility suggest that hybridization and introgression are important in early stages of speciation in *Epidendrum*. Karyological diversification observed seems related to diploid and polyploid events, whose changes in fundamental number may be the result of complex intra and intergenomic reorganizations.

Keywords: B chromosomes, Centric fission, Disploidy, Endoreduplication, Genome size, Heterochromatin, Karyotype evolution, Morphometry, Polyploidy.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Epidendrum* L., com aproximadamente 1.500 espécies de distribuição exclusivamente neotropical (Hágsater & Soto Arenas, 2005), apresenta ampla variabilidade morfológica inter e intraespecífica (Pinheiro & Barros, 2005, 2007a) e um grande número de características plesiomórficas em relação a outros gêneros da subfamília Epidendroideae, que dificultam a compreensão de suas relações filogenéticas (Pinheiro *et al.*, 2009). A classificação infragenérica do gênero baseia-se unicamente em caracteres morfológicos, que tem sido considerado um depositório de espécies taxonomicamente "mal resolvidas" (Dressler, 1993). Nenhuma das espécies anteriormente incluídas em *Epidendrum* por Linnaeus (1753) permanece no gênero, e atualmente constituem gêneros distintos. Em termos taxonômicos o gênero é bastante complexo, e o estabelecimento de um tratamento taxonômico formal é dificultado por um conjunto de fatores, como por exemplo, a sua grande riqueza em espécies, a escassez de análises moleculares e de revisões taxonômicas. A ocorrência de números cromossômicos discrepantes, inclusive entre diferentes populações de uma mesma espécie, dificulta o entendimento das relações genéticas entre as espécies e populações pertencentes ao gênero *Epidendrum*.

Análises cariológicas podem revelar diferentes estratégias de evolução cromossômica que, diferente de outros caracteres, apresentam fenótipo em metáfase independente da expressão gênica, condições ambientais, idade ou estádio de desenvolvimento (Guerra, 2012). A análise da variação cariotípica, em diversos níveis, tem contribuído de forma significativa para o estabelecimento de delimitações taxonômicas filogeneticamente mais coerentes (ver, por exemplo, Souza *et al.*, 2012). Técnicas de coloração diferencial com fluorocromos, combinadas com análises da variação na quantidade do DNA nuclear, podem facilitar o entendimento da variação cromossômica em grupos filogeneticamente relacionados, por permitir a ponderação da diversidade genética a partir de três aspectos relacionados: níveis de ploidia, conteúdo de DNA e distribuição da heterocromatina. Estas análises podem ser úteis para o entendimento das relações genéticas em complexos taxonômicos que reúnem características relacionadas à hibridação, poliploidia e reprodução assexuada (Souza *et al.*, 2012), como se verifica no gênero *Epidendrum*, especialmente nas espécies pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*.

Especiação híbrida significa, em termos evolutivos, que a hibridação apresenta uma função crucial na origem de uma nova espécie (Mallet, 2007), bem como na diversificação dos caracteres fenotípicos. Outro fenômeno bastante comum em populações simpátricas é o retrocruzamento entre o indivíduo híbrido e um dos seus progenitores, sendo referido como introgressão (Pinheiro *et al.*, 2010). Ambos os fenômenos são considerados promotores importantes da especiação em diversos grupos vegetais, e foram identificados em *Epidendrum*, com base na análise Bayesiana de microssatélites nucleares e plastidiais (Pinheiro *et al.*, 2010; López-Pujol *et al.*, 2011). As angiospermas destacam-se pela sua habilidade de tolerar os impactos genômicos resultantes da hibridação e da poliploidia, que surgem da acomodação de genomas divergentes e duplicados em um mesmo núcleo (Leitch & Leitch, 2008). Tal plasticidade genotípica agrupa diversos tipos de ajustes, como por exemplo, a recombinação entre os diferentes genomas, a conversão gênica, o silenciamento gênico, inversões, translocações e deleções, que conduzem a contribuições genômicas desiguais (Mallet, 2007; Leitch & Leitch, 2008). Diversos híbridos interespecíficos em *Epidendrum* têm sido relatados por alguns autores (Dunsterville, 1979; Hágster, 1984; Dressler, 1989; Pansarin & Amaral, 2007; Pinheiro *et al.*, 2010), porém pouco se sabe sobre os efeitos da hibridação na evolução cariotípica do gênero.

Em termos cariológicos, apenas 2,8% das espécies de *Epidendrum* foram estudadas citologicamente, e esta caracterização é representada apenas por contagens cromossômicas (Guerra, 2000; Conceição *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2009; Felix & Guerra, 2010; Assis *et al.*, 2013). Apesar de escassas, as informações cromossômicas disponíveis em *Epidendrum* indicam que a ocorrência da poliploidia é bastante elevada e recorrente, como se observa em *E. nocturnum* Jacq. (do grupo *Subumbellatae*) com $2n = 40$, 80, *E. orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. e *E. cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (do subgênero *Amphiglottium*) com $2n = 120$ e $2n = 240$, respectivamente. Contudo, torna-se difícil estabelecer com segurança os níveis de ploidia no gênero e especialmente em *E. secundum*, que apresenta elevada variação cromossônica numérica (Assis *et al.*, 2013), em virtude da escassez de dados cariológicos. Informações importantes, como o seu número cromossômico básico (x), permanecem obscurecidas principalmente pela baixa representatividade de espécies do gênero *Epidendrum* com conteúdo de DNA nuclear quantificado, sendo conhecido apenas, até o presente momento, para *E. obliquum* Schltr. (como *E. steinbachii*), que apresenta $2C = 2.98 (\pm 0,11)$ pg DNA (Jones *et al.*, 1998).

O presente trabalho objetivou identificar os principais mecanismos relacionados à evolução cariotípica em *Epidendrum*, a partir da análise cariológica da variação cromossômica numérica, bem como do aumento no número de espécies com conteúdo de DNA nuclear conhecido, e dos padrões de distribuição de regiões heterocromáticas através da dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI em espécies e híbridos interespécíficos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Orchidaceae

A família Orchidaceae, considerada uma das mais diversificadas e taxonomicamente complexas dentre as angiospermas (Pridgeon *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2012), apresenta cerca de 800 gêneros e 25.971 espécies (Joppa *et al.*, 2011). As orquídeas possuem distribuição cosmopolita, embora a maioria das espécies ocorra nas regiões tropicais. O Brasil apresenta cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies (Souza & Lorenzi, 2008; Barros *et al.*, 2013). Além do grande número de espécies, a família também apresenta adaptações a diversos tipos de habitats, principalmente epífitas e rupícolas, bem como aproximadamente 30% de espécies terrestres (Gravendeel *et al.*, 2004). Suas espécies e híbridos apresentam elevado potencial ornamental, e perfazem 8% das vendas na floricultura mundial (Chugh *et al.*, 2009). Além disso, alguns gêneros são tradicionalmente utilizados na indústria alimentícia, a exemplo de *Vanilla* Plum. ex Mill. (baunilha).

2.1.1. Taxonomia e Aspectos gerais da família

As orquídeas são plantas herbáceas e perenes, que podem ser facilmente reconhecidas pela simetria zigomorfa de suas flores, nas quais os estames são adnatos basalmente ao estilete, formando uma estrutura denominada ginostêmio (Dressler, 1981). Caracterizam-se ainda por apresentar grãos de pólen agrupados em políneas, fruto do tipo cápsula seca, sementes desprovidas de cotilédones, e por suas relações micorrízicas (*sensu* APG III, 2009).

A dispersão de sementes através do vento é quase universal na família Orchidaceae, que relaciona estratégias nutricionais especializadas à associação com

fungos micorrízicos. Uma destas estratégias é a microspermia micotrófica, comum em espécies que são dependentes de fungos holoparasitas, que auxilia na assimilação do carbono. Estas interações especializadas possivelmente apresentam um padrão evolutivo que relaciona características do habitat, micotrofia e especiação floral (Benzing, 1987; Phillips *et al.*, 2012). A produção de grande quantidade de sementes também é uma estratégia evolutiva bastante eficiente, através da qual as espécies procuram aumentar as chances de estabelecimento das plântulas em função da especificidade de seus habitats, permitindo a fixação de poucos indivíduos em locais distantes de sua origem, de maneira dispersa, gerando populações disjuntas (Pinheiro & Barros, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que a diversificação floral em Orchidaceae é bastante ampla, podendo ocorrer diferentes mecanismos evolutivos em um mesmo gênero (Melo & Borba, 2011). Em *Acianthera* Scheidw., por exemplo, a convergência morfológica floral é evidente em algumas espécies alopátricas [*A. hamosa* (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase, *A. limae* (Porto & Brade) Pridgeon & M.W.Chase e *A. modestíssima* (Rchb.f. & Warm.) Pridgeon & M.W.Chase], onde a polinização está associada ao mesmo grupo de insetos. Contudo, observa-se em *A. prolifera* (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase, cuja polinização é realizada por outro grupo de insetos, que os mesmos caracteres morfológicos podem divergir por irradiação adaptativa (Melo & Borba, 2011), em virtude da pressão de seleção do polinizador. De fato, muitas espécies formam pequenas populações disjuntas, com menor probabilidade de fluxo gênico entre elas, suportando a hipótese de deriva genética a partir da origem de novas combinações genotípicas e, consequentemente, favorecendo a especiação (Tremblay *et al.*, 2005). Por outro lado, estudos realizados em algumas populações disjuntas em Orchidaceae revelaram baixa diferenciação genética entre elas, e a diversificação nesses grupos possivelmente é conduzida pela pressão de seleção de fatores bióticos e ambientais (Phillips *et al.*, 2012), adicionando novos desafios para o entendimento das relações taxonômicas e filogenéticas em Orchidaceae.

Nos últimos anos, a família Orchidaceae tem chamado a atenção dos pesquisadores, em virtude principalmente da taxonomia controversa, tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos florais. A partir da década de 90, um grande número de estudos filogenéticos baseados em dados moleculares foi publicado, e Orchidaceae está se tornando, dentre as angiospermas, uma das famílias mais estudadas em termos de suas relações infra-familiais (Chase *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011; Chemisquy & Morrone, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Atualmente, reconhece-se formalmente que a família Orchidaceae é monofilética, e está subdividida em cinco subfamílias: Apostacioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae, Epidandroideae. As duas primeiras são bastante consensuais: Apostasioideae e Cypripedioideae. A terceira subfamília, Vanilloideae, é questionada por alguns autores (Cameron *et al.*, 1999) e pouco conhecida entre os botânicos, porém é fortemente suportada por diversas linhas de evidências, inclusive moleculares. Outras evidências suportaram a inclusão de Spiranthoideae *sensu* Dressler (1993) em Orchidoideae, e a inclusão de Tropidieae na subfamília Epidandroideae (para uma leitura mais detalhada, ver Chase *et al.*, 2003).

2.1.2. Citogenética de Orchidaceae, com ênfase na subfamília Epidandroideae e na subtribo Laeliinae

A família é relativamente pouco conhecida em termos de números cromossômicos, com aproximadamente 11% de espécies citologicamente conhecidas (Felix & Guerra, 2010). Contudo, a variação no tamanho e no número de cromossomos é bastante elevada, principalmente na subfamília Epidandroideae. Os representantes das subfamílias Apostasioideae e Orchidoideae geralmente apresentam cromossomos pequenos, enquanto os representantes das subfamílias Cypripedioideae e Vanilloideae apresentam cromossomos maiores (APG III, 2009). Os números cromossômicos em Orchidaceae variam de $2n = 12$ em *Erycina pusilla* (L.) N.H.Williams & M.W.Chase (Felix & Guerra, 1999) até $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (Felix & Guerra, 2010), ambas as espécies pertencentes à subfamília Epidandroideae.

Tão variável quanto os números cromossômicos são os registros de quantificação do genoma em Orchidaceae, que varia em 168 vezes, a partir de $1C = 0,33$ pg em *Trichocentrum morenoi* (Dodson & Luer) M.W.Chase & N.H.Williams à 55,4 pg em *Pogonia ophioglossoides* (L.) Ker Gawl. A maioria das espécies analisadas apresenta genomas em torno de 8,5 pg, e genomas maiores (> 20 pg) são restritos a espécies das subfamílias Cypripedioideae e Vanilloideae (Leitch *et al.*, 2009). Com relação à ecologia das espécies cujos níveis de ploidia são elevados, é possível que a família Orchidaceae tenha uma correlação positiva entre quantidade de DNA e habitat terrestre (Leitch *et al.*, 2009), o mesmo ocorrendo com a poliploidia no gênero *Oncidium* Sw., que parece relacionada ao habitat terrestre ou rupícola (Felix & Guerra, 2000).

De forma geral, as análises cariológicas em Epidendroideae são escassas, e estão principalmente relacionadas a contagens cromossômicas, enquanto informações relacionadas ao padrão de distribuição da heterocromatina, conteúdo de DNA, número e posição de sítios de DNAr, dentre outras características citogenéticas importantes estão restritas a poucas subtribos (Cymbidiinae, Dendrobiinae e Maxillariinae), que apresentam variação no número e no padrão de distribuição de sítios de DNAr em algumas espécies. Em muitos casos, esta variação está relacionada à poliploidia, e o número de sítios aumenta em relação ao parente diploide. Entretanto, esta não é uma regra geral em Orchidaceae. No gênero *Paphiopedilum* Pfitzer, não há nenhuma evidência de poliploidia, e as diferenças nos números cromossômicos e no padrão de distribuição dos sítios de DNAr neste gênero estão relacionadas à aneuploidias, em uma série formada por fissões e fusões cêntricas (Lan & Albert, 2011). Geralmente, o padrão de distribuição de sítios de DNAr 45S é mais polimórfico em plantas do que o 5S, porém Lan & Albert (2011) verificaram que os sítios de DNAr 5S são muito mais variáveis em número e localização física em *Paphiopedilum*, possivelmente ocorrendo pela atividade de elementos transponíveis, translocações ou inversões.

A subtribo Laeliinae destaca-se dentre as demais subtribos em Epidendroideae por apresentar gêneros de elevado valor horticultural, a exemplo de *Cattleya* Lindl. e *Laelia* Lindl., e também alguns gêneros que perfazem uma grande fração da flora de orquídeas dos neotrópicos, tais como *Epidendrum* L., *Encyclia* Hook. e *Prosthechea* Knowles & Westc. (van den Berg *et al.*, 2000). Laeliinae apresenta aproximadamente 2,5% de suas espécies com registros de números cromossômicos, porém alguns gêneros são mais estudados citologicamente em detrimento de outros. O gênero *Cattleya* apresenta cerca de 50% de suas espécies analisadas cariologicamente, enquanto em *Encyclia*, apenas sete espécies apresentam registros cromossômicos (Felix & Guerra, 2010). Apesar de apresentar uma variação cariológica significativa, $2n = 40$ é o número cromossômico mais frequente na subtribo (Tanaka & Kamemoto, 1984), com número básico $x = 20$, sugerindo que a poliploidia constitui-se em um importante mecanismo relacionado à evolução cariotípica em Laeliinae (Felix & Guerra, 2010).

A variação em números cromossômicos na subfamília Epidendroideae foi extensamente revisada por Felix & Guerra (2010), onde as principais diferenças cariológicas entre as tribos Epidendreae, Cymbidieae, Podochileae e Vandaeae, que juntas congregam a maioria das espécies da subfamília Epidendroideae, é a predominância de $n = 20$ em Epidendreae, $n = 21$ in Cymbidiae e $n = 19$ nas duas

últimas tribos. Múltiplos de $n = 7$, especialmente $n = 21$ ou próximo deste valor predomina na maioria dos gêneros da subfamília Orchidoideae.

Dentre as orquídeas no geral, $n = 21$ é um número cromossômico recorrente que parece estar relacionado ao provável número básico $x = 7$ proposto para a família (Felix & Guerra, 1999, 2000, 2005, 2010). Partindo da análise da variação cromossômica numérica registrada para a família, uma hipótese razoável relaciona eventos recorrentes de poliploidia a disploidias, resultando na grande diversidade de números cromossômicos observada em diversas linhagens da família Orchidaceae, não obstante a ocorrência de hibridação entre espécies com diferentes números cromossômicos, que adiciona maior variabilidade cromossômica a diversos gêneros, notavelmente em *Epidendrum* (Pinheiro *et al.*, 2010).

2.2. O gênero *Epidendrum* L.

2.2.1. Caracterização geral

O gênero *Epidendrum* foi inicialmente descrito por Linnaeus (1737), cujo lectótipo é baseado em *E. nocturnum* Jacq. O gênero apresenta cerca de 1.500 espécies distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos (Carolina do Norte) até o Norte da Argentina (Chase *et al.*, 2003; Hágster & Soto Arenas, 2005; Pinheiro & Barros, 2007a). A plasticidade fenotípica em *Epidendrum* favorece a ocupação de habitats bastante variados, e como consequência, ocorrem espécies terrestres, rupícolas e epífitas (Pinheiro *et al.*, 2009).

O gênero caracteriza-se morfológicamente por apresentar caules longos, cilíndricos ou pseudobulbosos, algumas vezes cespitosos, folhas dísticas, inflorescências variáveis, flores ressupinadas ou não, as margens ventrais do ginostêmio coalescentes com o unguículo do labelo, e o rostelo fendido e mais ou menos paralelo ao eixo do ginostêmio, estigma com lobos laterais bem desenvolvidos, e antera com duas, quatro, seis ou oito (geralmente quatro) políneas sésseis (para uma descrição morfológica mais detalhada ver Dressler, 1984). De acordo com Hágster & Soto Arenas (2005), *Epidendrum* encontra-se morfológicamente bem definido.

2.2.2. Considerações taxonômicas

Análises filogenéticas, baseadas em dados de sequências não-codificantes de DNA ribossomal (ITS), têm demonstrado que os tratamentos taxonômicos tradicionais em *Epidendrum*, que se baseavam apenas em caracteres morfológicos, tornava-o polifilético (van den Berg *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2003). O gênero é considerado um depositório de espécies taxonomicamente incertas (Dressler, 1993), e alguns aspectos da taxonomia e evolução do grupo permanecem inconclusivos. Contudo, alguns estudos baseados em dados moleculares têm sido úteis em esclarecer algumas questões controversas relacionadas à classificação infragenérica no gênero, como por exemplo, o desmembramento de todas as espécies pseudobulbosas de *Epidendrum* para a criação do gênero *Auliza* (*sensu* Brieger, 1976, 1977), claramente artificial. Posteriormente, Pridgeon *et al.* (2009) incluíram estas espécies novamente em *Epidendrum*, com base na comparação de sequências de regiões ITS de DNA nuclear ribossomais em 250 espécies de *Epidendrum*, confirmando a delimitação proposta inicialmente por van den Berg *et al.* (2000), que também utilizou sequências de DNA nuclear ribossomais (ITS) e plastidiais. Alguns autores já criticavam a utilização de caracteres morfológicos individuais utilizados para a segregação do gênero (Dressler, 1967), que frequentemente tem conduzido a criação de complexos taxonômicos de difícil interpretação.

Inicialmente, *Epidendrum* foi dividido em quatro subgêneros: *Epidendrum*, *Spathium*, *Strobilifera* e *Amphiglottium* (Lindley, 1852, 1859, e posteriormente Cogniaux, 1898, 1902; Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976, 1977), com base apenas em caracteres morfológicos florais. O subgênero *Amphiglottium* é o único subgênero em *Epidendrum* formalmente reconhecido e considerado monofilético sob uma perspectiva filogenética (Pinheiro *et al.*, 2009), e encontra-se organizado em quatro seções: *Imbricata*, *Bifaria*, *Ancipta*, e *Amphiglottium*. Esta última foi subdividida em três subseções (*Integra*, *Carinata* e *Tuberculata*). No entanto, apenas as subseções *Integra* e *Tuberculata* são consideradas monofiléticas, enquanto a subseção *Carinata* apresentou-se claramente polifilética, e as espécies agruparam-se em outros dois clados nas análises realizadas por Pinheiro *et al.* (2009), um clado Andino e um clado Atlântico, demonstrado também a forte relação entre a diversificação de *Epidendrum* e os ambientes nos quais ocorrem.

Epidendrum secundum é uma das espécies mais variáveis e taxonomicamente menos compreendida do gênero (Brieger, 1976, 1977), com um grande número de

sinônimos, tais como *E. ansiferum* Rchb., *E. crassifolium* Lindl., *E. ellipticum* Graham. e *E. elongatum* Jacq. (Pinheiro & Barros, 2007a). Contudo, trata-se apenas de uma espécie altamente polimórfica, apresentando elevada variação morfológica contínua entre suas populações (Pinheiro & Barros, 2007a). Com base na morfologia dos calos do labelo, *E. secundum* encontra-se taxonomicamente delimitado no subgênero *Amphiglottium*, subseção *Tuberculata* (Pinheiro & Barros, 2007b; Pinheiro *et al.*, 2009). Encontra-se distribuído pela América do Sul, ocorrendo em uma variedade de habitats tais como os Andes, planalto central do Brasil, campos rupestres, ao longo da costa do Atlântico e em inselberges na Caatinga (Pinheiro & Barros, 2007a; Assis *et al.*, 2013), e demonstram grande habilidade em colonizar novos habitats.

2.2.3. Citogenética e evolução de *Epidendrum*

Apenas 2,8% das espécies de *Epidendrum* são conhecidas citologicamente (Tabela 1), e estas demonstram variações cromossômicas entre espécies proximamente relacionadas e entre populações de uma mesma espécie. Em termos de variação cromossômica numérica, os registros variam de $2n = 24$ em *E. strobiliferum* Rchb.f. e *E. fulgens* Brongn. (Tanaka & Kamemoto, 1984) até $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* (Felix & Guerra, 2010). O número cromossômico diploide mais frequente é consistentemente $2n = 40$, ocorrendo em 70% das espécies para as quais já se têm registros (Assis *et al.*, 2013).

Algumas espécies apresentam notável variação, especialmente *Epidendrum secundum* Jacq., *E. ciliare* L., *E. nocturnum*, *E. radicans* Pav. ex Lindl. e *E. xanthinum* Lindl., formando séries poliploidies divergentes, com diversos casos de disploidias e aneuploidias que, aliados ao pequeno número de espécies com registro cromossômico, dificulta o estabelecimento de um número básico para o gênero. Apesar da escassez de dados, alguns números cromossômicos no gênero são interpretados por alguns autores como séries de outros números básicos, por exemplo, $x = 19$, originando $2x = 38$, $3x = 57$, como se observa em alguns representantes do gênero (*E. denticulatum* e *E. secundum*, respectivamente) (Assis *et al.*, 2013). Possivelmente, $x = 19$ é decorrente de uma duplicação de $x = 10$, com disploidia descendente de um cromossomo para produzir o número neobásico $x = 19$ (Hágsater & Soto Arenas, 2005). Outras linhagens de *Epidendrum* apresentam números cromossômicos divergentes, como em *E. fulgens* e *E. mosenii*, sendo $n = 12$ possivelmente resultante de disploidia ascendente. *Epidendrum*

secundum é um exemplo marcante de polimorfismo cromossômico numérico no gênero, apresentando diversos números cromossômicos atualmente conhecidos, com $2n = 28$, 30 , 40 , 42 , 48 , 50 , 52 , 54 , 56 , 58 , 68 , 80 e 84 (Pinheiro & Barros, 2009; Felix & Guerra, 2010; Assis *et al.*, 2013).

Apesar de o gênero *Epidendrum* apresentar um elevado número de espécies, pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva e mecanismos de polinização de suas espécies. De forma geral, o mecanismo de polinização por decepção é bastante comum em Orchidaceae, assim como a existência de mecanismos que evitam a autopolinização. Contudo, *E. secundum* é auto-compatível, mas é necessário um polinizador para a transferência do pólen (Pansarim & Amaral, 2008). O polinizador geralmente é um lepidóptera diurna, e as políneas se aderem à superfície ventral da probóscide. Assim como *E. secundum*, as espécies *E. ibaguense* Kunth in F.W.H.von Humboldt e *E. radicans* apresentam também uma baixa especificidade de polinizador, com mais de 23 espécies de Lepidóptera atuando como polinizadores em populações naturais (Pansarim & Amaral, 2008), sendo possivelmente polinizadas através de mecanismos do tipo decepção.

Como consequência da baixa especificidade de polinizadores, a hibridação em populações simpátricas entre diversas espécies tem sido relatada na literatura, além de outras evidências, como por exemplo, sementes férteis geradas de retro-cruzamentos entre os parentais e o possível híbrido (Pansarim & Amaral, 2008). Contudo, esta não é uma regra geral para o gênero, uma vez que *E. paniculatum* Ruiz & Pav. é auto-incompatível ao nível do estigma, e se observa a produção de 95% de frutos gerados de fecundações cruzadas, enquanto nenhum fruto é gerado por autopolinização manual, bem como não são formadas sementes por apomixia (Pansarim, 2003). *E. denticulatum* Barb.Rodr. produz néctar extrafloral para a atração de duas espécies de formigas (*Ectatomma tuberculatum* Oliver e *Camponotus sericeiventris* Guérin-Méneville) que protegem as inflorescências da herbivoria, e desta forma aumentam a probabilidade de sucesso da polinização (Almeida & Figueiredo, 2003).

A hipótese de que espécies com elevadas diferenças em nível de ploidia são isoladas reprodutivamente, por causa de barreiras instantâneas pós-zigóticas, foi testada por Pinheiro *et al.* (2010) em populações simpátricas de *Epidendrum fulgens* ($2n = 2x = 24$) e *E. puniceoluteum* F.Pinheiro & F.Barros ($2n = 4x = 52$), os quais verificaram zonas de hibridação e introgressão em todas as populações analisadas. Em *Epidendrum* (subgênero *Amphiglottium*), a hibridação e consequentemente o fluxo gênico entre

espécies com números cromossômicos divergentes parece ser um fenômeno bastante comum (Pinheiro *et al.*, 2010). A ocorrência tanto da hibridação como da introgessão nestas populações, entre espécies com diferentes níveis de ploidia, são um forte indicativo de que ambos são processos evolucionários importantes na diversificação do gênero em diferentes níveis, partindo da variação cromossômica numérica à diversificação morfológica. Contudo, estudos adicionais são necessários para esclarecer como estas espécies mantêm sua identidade taxonômica.

2.3. Mecanismos de evolução cariotípica

Diferentes organismos apresentam conjuntos de cromossomos distintos, e as mudanças cariotípicas em diversos grupos de plantas têm sido reconhecidas como forças importantes na evolução das espécies vegetais (Grant, 1981; Rieseberg, 1997; Levin, 2002; Guerra, 2012). Em geral, o cariotípico de espécies proximamente relacionadas apresenta mais semelhanças do que entre espécies distamente relacionadas (Sumner, 2003). As mutações que se acumulam ao longo do tempo podem imprimir diferenças no cariotípico das espécies, alterando principalmente o número, o tamanho e a morfologia dos cromossomos, bem como os padrões de distribuição e composição da heterocromatina e sítios de DNA, e são consideradas, portanto, evidências da evolução. Dessa forma, os dados cariológicos podem ser utilizados pela taxonomia como uma ferramenta útil na inferência das relações filogenéticas entre as espécies (Greilhuber & Ehrendorfer, 1988; Guerra, 2012). Questões relacionadas à filogenia podem ser esclarecidas pela reunião de evidências evolucionárias, como por exemplo, taxas de mutação, eventos geológicos, centros de origens, evidências fósseis e moleculares, bem como pela identificação e caracterização dos cariotípicos em plantas (Kellogg, 2003; Moscone *et al.*, 2007; Lan & Albert, 2011). A comparação de cariotípicos conduz a um melhor entendimento de como as espécies divergem (Guerra, 2008).

Muitos fenômenos relacionados às alterações estruturais e/ou numéricas responsáveis pela divergência cariotípica em diversos grupos vegetais são atualmente bastante conhecidos. Considerável diversidade cariotípica pode ser vista em relação ao número básico, localização física de sequências de DNA, e pela organização de regiões homólogas em diferentes famílias de plantas e populações (Levin, 2002; Guerra, 2008), sugerindo que as variações encontradas entre cariotípicos são parte de processos

evolucionários contínuos, recorrentes e não raramente eventos macroevolucionários (Ramsey & Schemske, 1998).

As causas destas diferenças cromossômicas podem ser atribuídas ao grande conjunto de processos evolucionários completamente estocásticos (Levin, 2002). Divergência adaptativa, pressão de seleção e deriva genética relacionada à colonização de novos habitats, hibridação interespecífica, duplicação de genes, proliferação de elementos genéticos móveis, alo- e autopoliploidia, são alguns mecanismos bastante frequentes, que podem imprimir mudanças significativas nos cariotípos, e têm sido intensamente estudados nas últimas décadas (Stebbins, 1971; Grant, 1981; San Miguel *et al.*, 1996; Ramsey & Schemske, 1998; Lynch & Conery, 2000; Tremblay *et al.*, 2005; Doyle *et al.*, 2008; Mayrose *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2011; McIntyre, 2012). Dentre os diversos processos relacionados à evolução cariotípica em plantas, a poliploidia e a disploidia serão abordadas nas próximas seções, em virtude das inúmeras evidências de sua ocorrência no gênero *Epidendrum*.

2.3.1. *Poliploidia*

A poliploidia é um fenômeno evolucionário bastante comum dentre as angiospermas, e pode ser definida como a formação de números cromossômicos elevados (Grant, 1981), que ocorre através da multiplicação ou duplicação de um complemento cromossômico inteiro (Guerra, 2008), com ou sem hibridação, aumentando assim o nível de ploidia em algumas espécies, estando frequentemente associada à especiação e a origem de novas adaptações (Levin, 2002). O termo foi cunhado por Winkler (1916), ao estudar enxertos vegetativos em *Solanum* L., proporcionando subsídios para as hipóteses iniciais sobre a importância da poliploidia para a especiação vegetal. Goldblatt (1980) considera que espécies com números cromossômicos acima de $n = 9$ e 10 apresentam poliploidia em sua história evolucionária. Além disso, a partir destes números, estimou que aproximadamente 80% das monocotiledôneas são poliploides.

Análises de distribuição de K_s (algoritmo Kennard-Stone) de 178 pares de parálogos em *Eschscholzia californica* Cham. (a linhagem irmã de todas as eudicotiledôneas) revelaram 89% de pares duplicados, produzindo a primeira evidência inconteste da duplicação em uma eudicotiledônea ancestral (Cuj *et al.*, 2006). Com base em diversas análises moleculares, tais como mapeamento genômico comparativo,

estudos micro-colineares, e análises de marcadores de sequências gênicas, Adams & Wendel (2005) sugerem que o genoma de mais de 90% das angiospermas atuais retêm evidências de uma ou mais duplicações de todo o genoma. Estas evidências agora suportam as hipóteses propostas inicialmente por Stebbins (1950) de que as angiospermas têm experienciado repetidos ciclos de poliploidização.

Diversos mecanismos podem levar a formação de poliploides em plantas. A hibridação interespecífica frequentemente precede a poliploidia (Kellogg, 2003), fenômeno que origina indivíduos alopóliploides (Abbott & Lowe, 2004; Guerra, 2008). Porém, a poliploidia pode ocorrer a partir de um único indivíduo ou híbrido intervarietal, o qual se denomina autopoliploide (Guerra, 2008). Os conceitos de autopoliploidia e alopóliploidia estão usualmente baseados em critérios taxonômicos (de origem intraespecífica *versus* interespecífica, respectivamente) ou em critérios citológicos (formação de multivalentes *versus* bivalentes, respectivamente), embora nenhum destes critérios possa ser sempre aplicado (Guerra, 2008), principalmente este último, devido, por exemplo, à ocorrência de genes que impedem a formação de multivalentes na meiose (Leitch & Leitch, 2008).

A duplicação somática, em nível de zigoto, embrião ou estágio meristemático de um ciclo de vida de uma planta, irão consequentemente levar a produção de tecidos poliploides e possivelmente a geração de descendentes poliploides (Soltis *et al.*, 2003; Bennett, 2004). A duplicação somática (endoreduplicação) pode ser considerada como um ciclo celular modificado, onde ocorre a inibição das quinases dependentes da ciclina (CDK) metafásicas e um aumento da atividade das CDKs da fase S, ou inibindo a mitose pela ativação do Complexo Promotor da Anáfase (APC), que degrada as ciclinas mitóticas (Wang *et al.*, 2007). Por exemplo, *Primula kewensis*, uma das primeiras alopóliploides descritas, surgiu a partir de ramos tetraploides férteis do diploide estéril do híbrido entre *P. floribunda* Wall. x *P. verticillata* Forssk. (Ramsey & Schemske, 1998).

A frequência de endopoliploidia e a probabilidade de formação de diferentes tecidos endopoliploides não são bem conhecidas. Contudo, estudos genéticos indicam que a autopoliploidia é muito mais comum do que se concebia tradicionalmente, e concomitantemente revela as razões para o sucesso destes organismos (Soltis *et al.*, 2003). Um exemplo de autopoliploide bem conhecido ocorre em *Vicia faba* L., cujos indivíduos normais diploides contêm células tetraploides e octaploides no córtex e no cerne de seus caules, onde ocasionalmente iniciam um novo crescimento, especialmente

em virtude de ferimentos ou calos, tornando-se importantes fontes de novos indivíduos poliploides (Ramsey & Schemske, 1998).

A segunda principal rota para a formação de poliploides é a “não-redução gamética” ou a “restituição nuclear meiótica” durante a micro- e megasporogênese (Ramsey & Schemske, 1998; Levin, 2002; Leitch & Leitch, 2008). Este processo gera gametas não-reduzidos, também referidos como gametas $2n$, que contém o número cromossômico somático completo. Conforme Sumner (2003) e Petronczki *et al.* (2003), os principais fatores que influenciam a segregação dos cromossomos na meiose são a ausência de quiasmas, a coesão insuficiente entre as cromátides, e a má orientação dos microtúbulos, que podem gerar tensão insuficiente nos cinetócoros, resultando em instabilidade e reorientação do bivalente. A poliespermia, ou seja, a fertilização de uma célula ovo por mais de um núcleo espermático, é considerada uma rota incomum na formação de poliploides, ocorrendo em alguns grupos de plantas, como por exemplo, *Fritillaria orientalis* Adam., *Lilium martagon* L., e em algumas espécies de orquídeas (Kordyum, 2008).

As condições para o estabelecimento de poliploides e a prevalência em grupos como pteridófitas e angiospermas não são bem compreendidas, permanecendo como o foco principal dos biólogos de populações (Sang *et al.*, 2004). Fatores ecológicos e genéticos, tais como a autogamia, a ocupação de novos nichos, o tamanho das populações, a diferenciação no tempo de floração, diferenças no desempenho fisiológico e a produção de gametas não reduzidos podem contribuir para o estabelecimento. Alguns autores sugerem que triploides podem influenciar no estabelecimento de autotetraploides através de um mecanismo denominado ponte triploide (Lo *et al.*, 2010), pela união de gametas x e $2x$. Triploides podem produzir gerações tetraploides através de retrocruzamentos com diploides ou cruzamentos com outros triploides. Indivíduos triploides de *Crataegus suksdorfii* (Sarg.) Kruschke. apresentam origem alo- e autopoliploide em populações naturais, enquanto indivíduos tetraploides são formados via ponte triploide, envolvendo o retrocruzamento da geração alotriploide com o parental diploide *C. suksdorfii*, seguido de introgressão gênica com *C. douglasii* Lindl. em simpatria (Lo *et al.*, 2010).

A poliploidia é muito mais complexa do que uma mera interação que surge entre dois genomas, é um fenômeno que reflete a elevada plasticidade do genoma em angiospermas (Leitch & Leitch, 2008) e envolve amplo espectro de ajustamentos moleculares e fisiológicos (Adams & Wendel, 2005), complexas reorganizações

genéticas, incluindo trocas entre genomas, mobilidade de (retro)-transposons, alterações na expressão gênica e nos padrões de metilação de DNA, silenciamento genético induzido epigeneticamente, perda de sequências curtas, remodelação da cromatina, inversões e translocações (Shoemaker *et al.*, 2006), além de novos fenótipos que emergem através da poliploidia (Bowers *et al.*, 2003; Sumner, 2003; Levy & Feldman, 2004; Melayah *et al.*, 2004; Leitch & Leitch, 2008). Em alguns poliploides, tais reajustes podem levar a restauração da segregação dissômica, ou seja, a diploidização, ocultando os sinais da aloploidia. Dados de genética comparativa indicam que as espécies diploides de *Brassica* L. ($n = 9$) são diploidizadas, talvez representando hexaploides ancestrais, mas também indicando que o genoma em *Brassica* evoluiu através de fusões cromossômicas e frequentes reorganizações (Soltis & Soltis, 1999; Lysak *et al.*, 2007). Alguns genes, como o gene 5B em *Triticum* L., *Dendranthema indica* L. e *Crossostephium chinense* (L.) Makino, podem estar envolvidos na diploidização em poliploides antigos, regulando a formação de bivalentes na meiose (Riley & Chapman, 1958; Wang *et al.*, 2007).

Acredita-se que a poliploidia é o mecanismo pelo qual algumas espécies evoluíram números cromossômicos muito altos, como *Sedum suaveolens* Kimm., com $2n = 640$ ca. $80x$, a maior contagem cromossônica entre as angiospermas (Uhl, 1978) e *Ophioglossum pycnostichum* (Fern.) A. & D. Löve (uma pteridófita) com $2n = 1260$ ca. $84x$, a maior contagem entre as plantas (Löve *et al.*, 1977). Na família Orchidaceae, *Epidendrum cinnabarinum* apresenta $2n = 240$, sendo a maior contagem cromossônica dentre todas as orquídeas para as quais já se apresentam analisadas (Felix & Guerra, 2005).

2.3.2. *Disploidia*

Outro mecanismo importante na evolução e diferenciação dos cariótipos, diretamente relacionado aos aspectos da variação cromossônica numérica em grupos relacionados filogeneticamente, bem como alterações nos níveis de simetria do complemento cromossômico, é certamente a disploidia (Guerra, 2008). Este fenômeno genético direciona os cariótipos ao aumento ou diminuição no número cromossômico haploide, podendo incluir um único cromossomo, um par de cromossomos ou mais de um par cromossômico (Grant, 1981; Guerra, 2008), frequentemente formando uma série disploide. Difere da poliploidia e aneuploidia por não produzir alterações quantitativas

ou qualitativas nos genes (Guerra, 1988). Contudo, nem sempre é fácil determinar a natureza e a direção destes eventos. Em virtude dos cariótipos serem estruturas dinâmicas, é imprescindível a reconstrução de cariótipos ancestrais, com base na caracterização detalhada de cariótipos atuais, a fim de que a direção evolucionária da variação cariotípica seja bem compreendida (Hu *et al.*, 2011).

A variação disploide pode ser originada por translocações Robertsonianas, fusões ou fissões cêntricas e translocações recíprocas (Guerra, 2008). Este fenômeno tem sido relatado em muitos grupos vegetais, como em Asteraceae, cuja seção *Odontognathius* apresenta uma interessante série disploide, onde *Carthamus nitidus* Boiss. apresenta $x = 12$, e *C. divaricatus* (Beg. et Vacc.) Pamp. apresenta $x = 11$. O restante da seção apresenta $x = 10$. Em Brassicaceae, a displodia descendente apresenta um papel fundamental na evolução do grupo. Através de sequenciamento e mapeamento genético foi possível determinar, além de outros reajustes, a ocorrência de três fusões cromossômicas que levaram ao cariótipo $n = 5$ de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a partir de $n = 8$, como encontrado em *A. lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz e outras Brassicaceae (Hu *et al.*, 2011).

Um tipo interessante de displodia foi relatado em Triticeae, cujo número básico evoluiu de $x = 12$ para $x = 7$ através da perda de cinco centrômeros funcionais. Quatro deles correspondem aos cromossomos de *Oryza sativa* L.: Os4, Os5, Os6, e Os9, o quinto pode corresponder tanto ao Os3 quanto Os11. Em quatro dos cinco cromossomos, ambos os braços foram translocados ao mesmo cromossomo e mantiveram a orientação original, sugerindo que cada redução disploide originou-se de uma única translocação (Luo *et al.*, 2009). Em todos os cromossomos derivados de Triticeae, um cromossomo foi inserido em um único momento na região centromérica de outro cromossomo.

Em muitos outros gêneros, o mecanismo que leva a displodia permanece desconhecido, por causa de mudanças estruturais e subsequentes fusões ou fissões que alteram a posição relativa dos centrômeros, ocultando as evidências das translocações, ou qualquer outra reorganização estrutural envolvida na modificação do cariótipo (Guerra, 2008). No gênero *Epidendrum*, por exemplo, a ocorrência de uma série disploide complexa ($2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80$ e 84), cujo número básico não está claramente estabelecido, dificulta a determinação de uma relação segura entre o número fundamental e a direção da variação disploide.

2.4. Hibridação e especiação

‘Especiação híbrida’ significa que a hibridação apresenta uma função principal na origem de uma espécie nova (Mallet, 2007). Em plantas, este fenômeno geralmente está relacionado à poliploidia ou outras alterações cromossômicas em larga escala (Ainouche & Jenczewski, 2010), que contribuem de forma significativa para a diversificação das espécies em diversos níveis, observada entre espécies diferentes e entre populações de uma mesma espécie, originando variantes morfológicas, números cromossômicos discrepantes (Ainouche *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2010), bem como diferentes padrões de distribuição e composição da heterocromatina (Souza *et al.*, 2012). Além disso, a organização de dois ou mais genomas diferentes em um único núcleo requer o silenciamento gênico e a deleção de algumas sequências, em virtude da redundância funcional entre genes homeólogos, isto é, genes que codificam proteínas que realizam funções semelhantes entre espécies. Como consequência, a hibridação frequentemente adiciona consideráveis problemas taxonômicos por favorecer a introgressão de alguns caracteres (Wei-Ping, 2006).

Acreditava-se que espécies com números cromossômicos diferentes ou poliploides são isoladas reprodutivamente, em virtude de barreiras pós-zigóticas instantâneas (Mallet *et al.*, 2007), visto que poliploides, quando se acasalam com diploides, podem gerar uma progênie com ploidias ímpares (triploides). Estes descendentes podem ser viáveis, mas geralmente produzem gametas estéreis com complementos cromossômicos desbalanceados (aneuploidia). Contudo, zonas de hibridação e introgressão simpátricas entre espécies com diferentes números cromossômicos foram identificadas em orquídeas (Pinheiro *et al.*, 2010), com ocorrência de geração F2.

A hibridação interespecífica pode ser facilitada pela ausência de polinizadores específicos entre algumas espécies, como por exemplo, no gênero *Epidendrum* (Pansarin & Amaral, 2008; Pinheiro *et al.*, 2010). Porém, os mecanismos relacionados ao estabelecimento de uma espécie híbrida ainda gera fortes discussões. Acredita-se que híbridos poliploides podem apresentar uma variedade de vantagens em relação as suas espécies parentais, como por exemplo, elevada heterozigose e características fenotípicas extremas, que podem favorecer a ocupação de novos habitats, alcançando novos picos adaptativos inacessíveis às espécies parentais (Mallet, 2007).

2.5. Heterocromatina

Em 1928, Heitz distinguiu heterocromatina de eucromatina com base na compactação diferencial na interfase (Grewal & Jia, 2007). A eucromatina apresenta-se menos condensada, consequentemente mais acessível à maquinaria da transcrição, sendo composta principalmente por regiões gênicas (Djupedal & Ekwall, 2008). Em contrapartida, a heterocromatina é altamente condensada, compactada através da organização dos nucleossomos, transcrecionalmente silenciada (Grewal & Moazed, 2003; Djupedal & Ekwall, 2008), apresentando heteropicnose: coloração diferente do padrão esperado para o restante da cromatina (clara na prófase e escura na metáfase).

Em eucariontes, a organização da cromatina em estruturas altamente ordenadas governa os diversos processos cromossômicos (Hall *et al.*, 2002). A formação e manutenção da heterocromatina integram diversos tipos de informação, incluindo a localização cromossômica, localização nuclear e a ocorrência de elementos de DNA repetitivo (Grewal & Jia, 2007). Geralmente estas regiões são encontradas nos centrômeros, telômeros, e algumas vezes formando blocos intersticiais (Hall *et al.*, 2002). A heterocromatina constitutiva caracteriza-se por permanecer condensada através do ciclo celular, rica em sequências repetidas em tandem e transposons, e seu estado heterocromático é uma característica cromossômica herdável (Pedrosa *et al.*, 2001; Partridge *et al.*, 2002).

A heterocromatina é também encontrada em *loci* regulados durante o desenvolvimento, onde o estado da cromatina pode mudar em resposta a sinais celulares ou atividade gênica, dessa forma denominada de heterocromatina facultativa (Grewal & Moazed, 2003). A heterocromatina facultativa é formada por regiões de eucromatina, epigenéticamente reprimidas. Neste caso, os cromossomos homólogos diferem, um se torna heterocromático e o outro permanece eucromático, proporcionando uma oportunidade interessante para o estudo dos mesmos genes em dois diferentes estados (Brown, 1966). Um exemplo bastante conhecido é a compensação da dosagem gênica em fêmeas de mamíferos, que envolve a inativação heterocromática de um dos dois cromossomos X nas células somáticas (Grewal & Moazed, 2003). Alguns experimentos em *Schizosaccharomyces pombe* Lindner revelaram um mecanismo dependente do bloqueio de RNAm durante a meiose, ou através da perda de fatores de eliminação de RNA, incluindo as proteínas Mmi1 e Red1, que suprime as regiões gênicas (Zofall *et al.*, 2012). A maquinaria de eliminação de RNA aumenta durante a meiose e interage com a

metiltransferase Clr4 (necessária para a formação da heterocromatina), processo que pode ser revertido em resposta a sinais nutricionais e pela ação do fator antisilenciamento Ep1 (Zofall *et al.*, 2012). Contudo, pouco se sabe em relação às modificações que ocorrem na heterocromatina facultativa em plantas, durante a diferenciação celular, que coordena a regulação da expressão gênica no curso do desenvolvimento.

A heterocromatina constitutiva é formada principalmente por cromatina de replicação tardia, que se apresenta positivamente corada para banda C, formada por DNA repetitivo, com a ocorrência de pouco ou nenhum gene (Fransz *et al.*, 2006; Feitosa & Guerra, 2011). Uma característica importante da heterocromatina é a habilidade de propagação, assim influenciando a expressão gênica de sequências próximas, em um processo referido como silenciamento (Grewal & Jia, 2007).

As análises dos padrões de distribuição de bandas nos complementos cromossômicos das angiospermas em geral são dificultadas pela alta variabilidade da heterocromatina constitutiva. De acordo com Guerra (2000), nas análises dos padrões de bandas heterocromáticas em diferentes espécies, devem-se considerar a heterogeneidade da heterocromatina, sua variação qualitativa e quantitativa entre espécies, a frequência de polimorfismos no número e tamanho das bandas em uma mesma espécie, e ainda que tanto a heterocromatina quanto a eucromatina podem sofrer mudanças relativas em um curto período de tempo.

Diferentes técnicas de coloração podem revelar diferentes frações da heterocromatina constitutiva, e espécies muito diferentes podem apresentar diferenças simultâneas no número, tamanho e morfologia cromossômica, tanto quanto a quantidade e composição das bandas heterocromáticas (Greilhuber, 1982; Sumner, 1990). Em plantas, o padrão de heterocromatina é menos uniforme do que em mamíferos e *Drosophila*, e algumas vezes, por exemplo, os centrômeros são desprovidos de conjuntos de heterocromatina detectável (Pedrosa *et al.*, 2001).

A heterocromatina constitutiva é também encontrada muito comumente nas regiões terminais (teloméricas) dos cromossomos (Sumner, 2003), embora nem sempre seja detectada pelo bandeamento C, provavelmente por causa do pequeno tamanho e número de repites (Guerra, 2008). As regiões terminais dos cromossomos da maioria das espécies são compostas por um minisatélite repetido em tandem Tn(An)Gn, um motivo formado por 7 pares de bases em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – TTTAGGG (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2011). Os telômeros apresentam inúmeras funções

ou efeitos relacionados com os diversos aspectos da organização dos cromossomos em todo o ciclo celular, com importantes implicações para o funcionamento da célula. A sequência de DNA nos telômeros forma motivos que recrutam proteínas específicas, as quais evitam a aderência entre cromossomos, organizam os cromossomos na interfase, participam do pareamento dos cromossomos na meiose, e protegem os cromossomos ao evitar a degradação de suas extremidades (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2011; Sumner, 2003).

2.5.1. *Organização molecular*

Enzimas que modificam histonas, complexos de remodelação da cromatina e a metilação do DNA são componentes de mecanismos epigenéticos complexos, que compactam e organizam o genoma em discretos domínios na cromatina (Grewal & Jia, 2007). O DNA da heterocromatina constitutiva é tipicamente metilado (Grewal & Jia, 2007; Feitosa & Guerra, 2011). A metilação da lisina 9 da histona H3 sinaliza a proteína HP1 (ou homólogas desta, em organismos diferentes), resultando no bloqueio da transcrição, enquanto a metilação da lisina 4 na histona H3 e a acetilação de histonas impedem o espalhamento da heterocromatina, permitindo desta forma a transcrição (Grewal & Jia, 2007). Em geral, metilação e acetilação de histonas têm efeito antagônico, enquanto a metilação de DNA e de histonas têm efeito sinergístico. Em *Arabidopsis*, ocorrem quatro classes de metiltransferases de DNA: DRM1 e DRM2 (metiltransferases de reorganização dos domínios) responsáveis pela metilação *de novo* do DNA (Fransz *et al.*, 2006); MET1 (metiltransferase) é uma DNA metiltransferase de manutenção, responsável pela metilação de CpG em sítios hemimetilados; CMT3 (cromometil-transferase) que contém um cromodomínio, é única em plantas, estando envolvida na metilação *de novo* em CpG e não-CpG e na manutenção da metilação em CpNpG. Plantas também apresentam um gene DNMT2, que codifica uma metiltransferase de função desconhecida (Fransz *et al.*, 2006). A heterocromatina contribui para a regulação epigenética ao inibir a expressão de um gene, servir de base para o recrutamento de diversos efetores em domínios cromossômicos específicos, estabiliza as sequências de DNA repetitivo no genoma ao impedir a recombinação entre repites homólogos (Grewal & Moazed, 2003; Grewal & Jia, 2007).

A maquinaria do RNAi está diretamente associada com a formação da heterocromatina constitutiva, a partir de transcritos pericentroméricos (siRNA) que

sinalizam as RITS (complexo de silenciamento transcrecional induzido por RNAi), e posteriormente recrutam metiltransferases e histonas do tipo HP1, necessárias ao silenciamento das regiões centroméricas (Partridge *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2005). Contudo, a heterocromatina sempre foi considerada inacessível à RNA polimerase II. Estudos recentes mostram que a heterocromatina pericentromérica, para permanecer silenciada, necessita tanto da transcrição pela RNA polimerase II, quanto da inibição pela maquinaria do RNAi, situação conhecida como “o paradoxo da heterocromatina silenciada” (Djupedal & Ekwall, 2008).

Uma possível solução foi proposta por alguns pesquisadores. Kloc *et al.* (2008) e Chen *et al.* (2008) observaram em *Schizosaccharomyces pombe* que a proteína Swi6 (ortóloga da HP1) é perdida em virtude da fosforilação da serina 10 na H3 durante a mitose, permitindo que os transcritos heterocromáticos se acumulassem na fase S. O processamento rápido destes transcritos em siRNA promove a restauração da dimetilação da lisina 9 na H3 e HP1 após a replicação, no momento em que a coesina é recrutada (Chen *et al.*, 2008; Djupedal & Ekwall, 2008; Kloc *et al.*, 2008), desta forma proporcionando a herança destes mecanismos epigenéticos reguladores da expressão gênica da célula mãe para as células filhas.

2.6. Bandeamento com Fluorocromos

Devido à utilidade do bandeamento cromossômico na caracterização de cariótipos, muitas técnicas nas últimas décadas têm sido aprimoradas para a visualização da heterocromatina. Os estudos citogenéticos passaram a incorporar o uso de fluorocromos, corantes que apresentam propriedades fluorescentes base-específicas que permitem caracterizar sequências repetitivas pela proporção de pares de bases GC (guanina/citosina) e AT (adenina/timina) (Schweizer & Ambros, 1994). O uso de fluorocromos tem permitido distinguir alguns tipos de heterocromatina em plantas (Schweizer, 1976).

Dentre os fluorocromos que apresentam afinidade pelas bases AT se destacam o DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), o Hoechst 33258 e a Quinacrina, enquanto que a Cromomicina A3 (CMA) e a Mitramicina apresentam afinidade por regiões ricas em GC (Schweizer & Ambros, 1994; Sumner, 2003). Dos fluorocromos acima citados, os mais comumente utilizados na citogenética vegetal são o CMA e o DAPI, principalmente na forma de dupla coloração, técnica onde a mesma lâmina é corada com um fluorocromo e

contracorada com outro, respectivamente nesse caso, o CMA seguido do DAPI. As reações dos fluorocromos com os cromossomos dependem principalmente da composição das bases nitrogenadas da molécula de DNA, de tal forma que cada região do cromossomo pode apresentar reações positivas (+), negativas (-) ou neutras (0) com um dado fluorocromo (Schweizer, 1981).

O uso em conjunto dos dois fluorocromos CMA/DAPI tem permitido comparar cariotipos e esclarecer relações evolutivas em vários gêneros vegetais (Moraes *et al.*, 2007). Hizume *et al.* (1989), por exemplo, conseguiram caracterizar e identificar todos os cromossomos de *Pinus densiflora* Sieb. Almeida *et al.* (2007) utilizando CMA/DAPI, além de outras técnicas como FISH e GISH, analisaram varias espécies relacionadas do gênero *Spondias* L. e demonstraram que o umbu-caja não é resultado da hibridação de *S. tuberosa* Arruda Câmara com *S. monbin* L. como supunham. Moraes & Guerra (2010) confirmaram que *Emilia sonchifolia* (L.) DC. é um dos parentais de *E. forsbergii* Nicolson utilizando os padrões de distribuição das bandas CMA/DAPI, sítios de DNA ribossomal 5S e 45S, além da técnica GISH, a qual forneceu dados mais precisos para a afirmar que *E. forsbergii* tem uma origem híbrida.

Poucos são os estudos dos padrões de distribuição da heterocromatina na família Orchidaceae. Kao *et al.* (2001) estudaram os padrões de acúmulo de heterocromatina de nove espécies do gênero *Phalaenopsis* Blume; D'Emerico *et al.* (2005) estudaram a heterocromatina constitutiva de algumas espécies do gênero *Ophrys* L.; Cabral *et al.* (2006) analisando os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva em quatro espécies do gênero *Maxillaria* Ruiz & Pav., observaram que os sítios de DNA 5S e 45S co-localizam com algumas das bandas CMA⁺. Koehler *et al.* (2008) analisaram filogeneticamente 48 espécies utilizando ítron plastidial trnL e espaçador intergênico trnL-F, além do estudo dos padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva em 18 espécies de Maxillariinae, onde foi possível esclarecer os fenômenos envolvidos na evolução cariotípica do grupo. As espécies analisadas apresentaram um número maior de cromossomos contendo bandas DAPI⁺/CMA⁻ do que cromossomos com bandas CMA⁺/DAPI⁻. A partir destas análises os autores sugerem que a fusão e/ou fissão cêntrica é o principal mecanismo envolvido na diferenciação diploide do número cromossômico para algumas espécies do gênero *Christensonella* Szlach., especialmente em *C. ferdinandiana* (Barb.Rodr.) Szlach. Para o trabalho de Koehler *et al.* (2008) o padrão de distribuição da heterocromatina provou ser uma fonte valiosa de informação relacionada aos padrões evolutivos dentro do grupo. Apesar de o número cromossômico

$2n = 40$ na subtribo Laeliinae representar 70% das espécies para as quais existem contagens cromossômicas, o uso da técnica de bandeamento com fluorocromos e o uso de marcadores cito-moleculares revelam uma grande variabilidade cariotípica nestas espécies, o que não seria possível verificar apenas pelo uso de técnicas com coloração convencional.

2.7. Quantificação do tamanho do genoma

O conteúdo de DNA nuclear e o tamanho do genoma (valor C) são importantes caracteres biológicos que podem fornecer um forte conjunto de dados unificadores para a biologia com utilizações práticas e preditivas (Bennett & Leitch, 2011). Bennett (1998) ressalta a crescente atenção dos pesquisadores sobre as interações entre o tamanho do genoma e alguns caracteres de interesse para melhoristas e ecologistas de plantas, a exemplo da regulação do desenvolvimento, do controle da divisão celular e tolerância a baixas temperaturas (MacGillivray & Grime, 1995), da produção de biomassa (Jasienski & Bazzaz, 1995) e da adaptação a alterações climáticas (Grime, 1986, 1996). No atual contexto ecológico mundial, a perda de genes e também de informações sobre a utilização dos espécimes vegetais é iminente, o que torna evidente a importância das pesquisas sobre genomas de plantas (Bennett, 1998).

A disponibilidade de técnicas rápidas, a exemplo da citometria de fluxo para a quantificação de DNA, tem permitido a análise de um considerável número de espécies e populações (Garcia *et al.*, 2006), e estes dados estão sendo amplamente utilizados para a resolução de questões taxonômicas e evolutivas em plantas (Bennett & Leitch, 2011). O princípio da técnica consiste na extração de núcleos livres a partir de tecidos vegetais fragmentados em um tampão, que mantém a estabilidade nuclear em suspensões líquidas, propiciando um ambiente apropriado para a coloração específica e estequiométrica do DNA nuclear (Loureiro *et al.*, 2007). A suspensão de núcleos é corada com fluorocromo específico, principalmente o iodeto de propídeo ou brometo de etídeo, que apresentam a propriedade de se ligar ao DNA de forma quantitativa e intercalar (Loureiro & Santos, 2004). Ao passar pelo citômetro de fluxo, as partículas da suspensão são estimuladas por um laser de comprimento de onda de 525 nm, e emitem uma fluorescência que é direcionada para um detector, que estima o tamanho do genoma em picogramas de DNA, que posteriormente pode ser convertido em mega pares de bases usando o fator de conversão 1g DNA = 978 Mpb (Dolezel *et al.*, 2003).

Contudo, apesar da facilidade da técnica, poucas espécies vegetais apresentam conteúdo de DNA conhecido. Considerando que as angiospermas apresentam cerca de 352.000 espécies descritas (Paton *et al.*, 2008), dados de quantificação de DNA são conhecidos para apenas 6.287 espécies, o que representa 1,8% do total de angiospermas conhecidas (Bennett & Leitch, 2011). Estes dados apresentam valores que variam de 1C = 0,0648 pg em *Genlisea margaretae* Hutch. até 1C = 152,23 pg em *Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch., representando uma escala de variação de 2.400 vezes (Bennett & Leitch, 2011).

O conteúdo de DNA de um genoma nuclear não replicado em uma célula haploide é denominado valor C (Swift, 1950), em alusão à constância teórica deste valor (Swift, 1950; Bennett & Leitch, 1997). Em virtude do DNA apresentar genes, a concepção inicial considerava que, quanto mais complexo o organismo, maior a quantidade de genes e, portanto, de DNA. Paradoxalmente, observou-se que diversos organismos unicelulares simples podem apresentar centenas de vezes mais DNA do que organismos multicelulares complexos, dando origem ao termo “Paradoxo do valor C” (Thomas, 1971; Petrov, 2001). Atualmente se sabe que esta variação não reflete diferenças em número de genes, mas diferenças na quantidade de sequências de DNA não-codificantes, frequentemente altamente repetitivas (Leitch *et al.*, 2009). Contudo, novas questões surgem a partir destas descobertas, principalmente relacionadas aos mecanismos evolutivos que dirigem estas variações, sobre os tipos de elementos repetitivos que imprimem estas diferenças e quais as suas consequências, constituindo o “enigma do valor C” (Gregory, 2001). Um grande debate existe entre os pesquisadores sobre a constância intraespecífica do valor C. Contudo, fatores tais como mudanças na atividade de retrotransposons, alterações cromossômicas como duplicações, aneuploidias, ocorrência de cromossomos B, e até mesmo a existência de cromossomos sexuais dimórficos, dentre outras possibilidades, podem ser a causa da variação no conteúdo de DNA em uma espécie (Garcia *et al.*, 2006).

Tabela 1 Números cromossômicos conhecidos em *Epidendrum* L. (organizada *sensu* Dressler, 1993)

Táxons	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fontes*
<i>Epidendrum angustatum</i> (T.Hashim.) Dodson (como <i>Neolehmannia angustata</i>)	36		GJ94
<i>E. appendiculatum</i> Hashimoto	38		GJ94
<i>E. avicula</i> Lindl. (como <i>Lanium avicula</i> (Lindl.) Benth)	40		TK84, GJ94, DA09
<i>E. blepharistes</i> Barker ex Lindl. (como <i>E. funckii</i> Rchb. F.)	40		GJ94
<i>E. burtonii</i> Benn. Christ.	80		TK84
<i>E. calanthum</i> Rchb.f. e Warsc.	30		PI09
<i>E. ciliare</i> L.	20	40, 80, 160	TK84, G85
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm.	108, 124	224, 240	FG10, AS13, PT
<i>E. cochlidium</i> Lindl.	28		PI09
<i>E. cooperianum</i> Bateman (como <i>E. longispathum</i> Barb. Rodr.)	40		TK84
<i>E. cristatum</i> Ruiz and Pavon (como <i>E. raniferum</i> Lindl.)	20	40	TK84
<i>E. cristatum</i> (como <i>E. tigrinum</i> Sessé and Moc.)	40		B57
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	40, 38		TK84, PI09, AS13
<i>E. difforme</i> Jacq. (como <i>Neolehmannia difforme</i>)	40		TK84
<i>E. diffusum</i> Sw.	20	40	TK84
<i>E. ellipticum</i> Grah.	56, 68		TK84, FG10
<i>E. flammeum</i> E.M.Pessoa e M.Alves	50		PT
<i>E. flexuosum</i> G. Mey	28		PI09
<i>E. fulgens</i> Brongn.	24		B57, PI09, AS13, PT
<i>E. ibaguense</i> Kunth.	70		PI09

Tabela 1 (cont.)

Táxon	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fontes
<i>E. lanipes</i> Lindl.		40	G85
<i>E. latilabre</i> Lindl.		40	FG10, AS13
<i>E. loefgrenii</i> Cogn.		40	TK84
<i>E. magnoliae</i> Muhl. (como <i>E. conopseum</i> R. Br.)	20	40	TK84
<i>E. myrmecophorum</i> Barb. Rodr.		120	PI09
<i>E. nocturnum</i> Jacq.	20	40, 60, 80	TK84, FG10, AS13, PT
<i>E. orchidiflorum</i> Salzm. Ex Lindl.		ca. 120	AS13
<i>E. paniculatum</i> Ruiz e Pav. (como <i>E. floribundum</i> Kunth.)		40	TK84, AS13
<i>E. patens</i> Sw.		40	TK84
<i>E. proligerum</i> Barb. Rodr.		40	AS13
<i>E. propinquum</i> A. Rich. E Galeotti		40	TK84
<i>E. pseudodifforme</i> Hoehne e Schltr.		40	AS13, PT
<i>E. puniceoluteum</i> F. Pinheiro e F. Barros		52	PI09
<i>E. x purpureum</i> Barb. Rodr.		56; 120	TK84, PI09
<i>E. radicans</i> Pav. ex Lindl.	24, 40, 57, 70, 60, 62, 64		TK84, PI09, PT
<i>E. ramosum</i> Jacq.		40	AS13
<i>E. rigidum</i> Jacq.		40	TK84
<i>E. secundum</i> Jacq.	28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 62, 68, 80, 84, 90		FG10, PI09, AS13, PT
<i>E. secundum</i> (como <i>E. brachiphyllum</i> Lindl.)	30		TK84

Tabela 1 (cont.)

Táxon	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fontes
<i>E. secundum</i> (como <i>E. elongatum</i> Jacq.)		56	TK84
<i>E. secundum</i> (como <i>E. lindenii</i> Lindl.)		56	TK84
<i>E. strobiliferum</i> Rchb.f. (como <i>E. mosenii</i> Barb. Rodr.)		24	TK84
<i>E. viviparum</i> Lindl.		40	AS13, PT
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	28, 30, 40, 60, ca. 80		TK84, G88, PI09, PT

*AS13 = Assis *et al.*, 2013; B57 = Blumenschein, 1957; FG10 = Felix & Guerra, 2010; G81 = Goldblatt, 1981; G85 = Goldblatt, 1985; G88 = Goldblatt, 1988; GJ94 = Goldblatt & Johnson, 1994; PI09 = Pinheiro *et al.*, 2009; TK84 = Tanaka & Kamemoto, 1984; PT = Presente Trabalho.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott RJ, Lowe AJ. 2004.** Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*. **82**: 467-474
- Adams KL, Wendel JF. 2005.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 135-141
- Almeida AM, Figueiredo RA. 2003.** Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology*. **63**: 551-558
- Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M. 2007.** Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **155**: 541-547
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A, Yannic G. 2004.** Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist*. **161**: 165-172
- Ainouche ML, Jenczewski E. 2010.** Plant polyploidy. *New Phytologist*. **186**: 1-4
- APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **161**: 105-121
- Assis FNM, Souza BCQ, Medeiros-Neto E, Pinheiro F, Silva AEB, Felix LP. 2013.** Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **172**: 329-344
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W. 2013.** Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>)
- Bennett MD. 1998.** Plant genome values: How much do we know? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **95**: 2011-2016
- Bennett MD. 2004.** Perspectives on polyploidy in plants-ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*. **82**: 411-423
- Bennett MD, Leitch IJ. 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*. **107**: 467-590
- Bennett MD, Leitch IJ. 1997.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*. **79**: 1-124
- Benzing DH. 1987.** Vascular epiphytism: taxonomy participation and adaptative diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **74**: 183-204

Blumenschein A. 1957. Estudos citológicos na família Orchidaceae. PhD Thesis, Universidade de São Paulo.

Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH. 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*. **422**: 433-438

Brieger FG. 1976-1977. Gattungsreihe *Epidendra*. In: Brieger FG, Maatsch R, Senghas K, eds. *Schlechter Die Orchideen*. Paul Parey (Berlin), 509-549

Brown SW. 1966. Heterochromatin. *Science*. **151**: 417-425

Cabral JS, Félix LP, Guerra M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*. **29**: 659-664

Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T, Hills HG, Goldman DH. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American journal of Botany*. **86**: 208-224

Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, Eds. *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo) 69-89

Chen ES, Zhang K, Nicolas E, Cam HP, Zofall M, Grewal SIS. 2008. Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature*. **451**: 734-737

Chugh S, Guha S, Rao U. 2009. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. **122**: 507-520

Conceição LP, Oliveira ALPC, Barabosa LV. 2006. Characterization of the species *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) occurring in Dunas do Abaeté – Salvador, Ba, Brasil. *Cytologia*. **71**: 125-129

Cogniaux A. 1898-1902. Epidendrum. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I, Eds. *Flora Brasiliensis*. Oldenbourg (Munich) 30-186

Cuj L, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, Pamphilis CW. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*. **16**: 738-749

D'Emerico S, Pignone D, Bartolo G, Pulvirenti S, Terrasi C, Stuto S, Scrugli A. 2005. Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **148**: 87-99

Djupedal I, Ekwal K. 2008. The paradox of silent heterochromatin. *Science*. **5876**: 624-625

Dodson CH. 1957. *Oncidium pusillum* and its allies I. *American orchid. Society. Bulletin*. **26**: 170-172

Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trouts and human. *Cytometry*. **51**: 127-128

Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF. 2008. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics*. **42**: 443-461

Dressler RL. 1967. Why do *Euglossine* bees visit orchid flowers? *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*. **5**: 171-180

Dressler RL. 1981. The Orchids: natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 332 p

Dressler RL. 1984. La delimitacion de generos en el complejo *Epidendrum*. *Orquidea*. **9**: 191-409

Dressler RL. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American Orchid Society Bulletin*. **58**: 796-800

Dressler RL. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University press, Cambridge. 514 p

Dunsterville GCK. 1979. Orchids of Venezuela - *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin*. **48**: 447-454

Feitosa L, Guerra M. 2011. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica*. **139**: 305-314

Felix LP, Guerra M. 1999. Chromosome analysis in *Psygmorechis pusilla* (L.) Dodson e Dressler: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. *Caryologia*. **52**: 165-168

Felix LP, Guerra M. 2000. Cytogenetics and cytobotany of some Brazilian species of Cymbidoid orchids. *Genetic and Molecular Biology*. **23**: 957-978

Felix LP, Guerra M. 2005. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. *Plant Systematics and Evolution*. **254**: 131-148

Felix LP, Guerra M. 2010. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **163**: 234-278

Fransz P, ten Hoopen R, Tessadori F. 2006. Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research*. **14**: 71-82

Garcia S, Garnatje T, Twibell JD, Valles J. 2006. Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome*. **49**: 244

Goldblatt P. 1980. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons. In: W.H. Lewis, ed. *Polyploidy*. Plenum Press (New York), 219-239

Goldblatt P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975–1978. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 5

Goldblatt P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982–1983. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 13

Goldblatt P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984–1985. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 23

Goldblatt P, Johnson DE. 1994. Index to plant chromosome numbers 1990–1991. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 40

Grant V. 1981. Plant speciation. New York, Columbia University Press. 528p

Gravendeel B, Smithson A, Slik FJW, Schuitema A. 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philosophical Transitions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. **359**:1523-1535

Gregory TR. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews*. **76**: 65-101

Greilhuber J. 1982. Trends in the chromosome evolution of *Scilla* (Liliaceae). *Stapfia*. **10**: 11-51

Greilhuber J, Ehrendorfer F. 1988. Karyological approaches to plant taxonomy. *ISI Atlas of science: animal and plant sciences*. **1**: 289-297

Grewal SI, Jia S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature*. **8**: 35-46

Grewal SI, Moazed D. 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*. **301**: 798-802

Grime JP. 1986. Prediction of terrestrial vegetation responses to nuclear winter conditions. *International Journal of Environmental Studies*. **28**: 11–19

Grime JP. 1996. Testing predictions of the impacts of global change on terrestrial ecosystems. *Aspects of Applied Biology*. **45**: 3-13

Guerra M. 1988. Introdução à Citogenética Geral. Rio de Janeiro, Guanabara. 142p

Guerra M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots II: systematics and evolution*. CSIRO (Melbourne), 127-136

Guerra M. 2005. What is new on plant cytogenetics? *Genetics and Molecular Biology.* **28:** 444-445

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

Hágsater E. 1984. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: Tan KW, ed. *Proceedings of the Eleventh World Orchid Conference.* 11st World Orchid Conference (Miami), 195-201

Hágsater E, Soto Arenas MA. 2005. *Epidendrum* L. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum, vol 4.* Oxford University Press (Oxford), 236-251

Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science.* **297:** 2232-2237

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal.* **66:** 18-33

Hizume M, Ohgiku A, Tanaka A. 1989. Chromosome banding in the genus *Pinus*: 2-interspecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*. *Botanical Magazine of Tokyo.* **102:** 25-36

Hu TT, Pattyn P, Bakker EG, Cao J, Cheng JF, Clark RM, Fahlgren N, Fawcett JA, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hollister JD, Ossowski S, Ottilar RP, Salamov AA, Schneeberger K, Spannagl M, Wang X, Yang L, Nasrallah ME, Bergelson J, Carrington JC, Gaut BS, Schmutz J, Mayer KF, Van de Peer Y, Grigoriev IV, Nordborg M, Weigel D, Guo YL. 2011. The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nature.* **43:** 476-481

Jasienski M, Bazzaz FA. 1995. Genome size and high C0₂. *Nature.* **376:** 559-560

Jones WE, Kuehnle AR, Arumuganathan K. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany.* **82:** 189-194

Joppa LN, Roberts DL, Pimm SL. 2011. How many species of flowering plants are there? *Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences.* **278:** 554-559

Kao YY, Chang SB, Lin TY, Hsieh CH, Chen YH, Chen WH, Chen CC. 2001. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Annals of Botany.* **87:** 387-395

Kato H, Goto DB, Martienssen RA, Urano T, Furukawa K, Murakami Y. 2005. RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science.* **309:** 467-469

Kellogg EA. 2003. What happens to genes in duplicated genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **100**: 4369-4371

Kloc A, Zaratiegui M, Elpheege N, Martienssen R. 2008. RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication. *Current Biology*. **18**: 490-495

Koehler S, Cabral JS, Whitten WM, Williams NH, Singer RB, Neubig KM, Guerra M, Souza AP, Amaral MCE. 2008. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. *Annals of Botany*. **102**: 491-507

Kordyum EL. 2008. Double fertilization in flowering plants: 1898–2008. *Cytology and Genetics*. **42**: 147-158

Lan T, Albert VA. 2011. Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *BMC Plant Biology*. **11**: 126

Leitch AR, Leitch IJ. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*. **320**: 481-483

Leitch IJ, Kahandawala I, Suda J, Hanson L, Ingrouille MJ, Chase MW, Fay MF. 2009. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*. **104**: 469-481

Levin DA. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York. 240p

Levy AA, Feldman M. 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of the Linnean Society*. **82**: 607-613

Lindley J. 1852-1859. *Epidendrum*. In: Lindley J, ed. *Folia Orchidacea*. J Matthews (London), 1-97

Linnaeus C. 1753. *Species Plantarum*. **2**: 953

Lo EYY, Stefanović S, Dickinson TA. 2010. Reconstructing reticulation history in a phylogenetic framework and the potential of allopatric speciation driven by polyploidy in an agamic complex in *Crataegus* (rosaceae). *Evolution*. **(64)**: 3593-3608

López-Pujol J, Zhang FM, Sun HQ, Ying TS, Ge S. 2011. Centres of plant endemism in China: places for survival or for speciation? *Journal of Biogeography*. **38**: 1267-1280

Loureiro J, Santos C. 2004. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*. **77**: 18-29

Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*. **100**: 875-888

Löve A, Löve D, Sermolli R. 1977. Cytotaxonomical atlas of the pteridophyta. Cramer, Vaduz. 122p

Luo MC, Deal KR, Akhunov ED, Akhunova AR, Andersonb OD, Andersonc JA, Blaked N, Clegge MT, Coleman-Derrb D, Conleyc EJ, Crossmanb CC, Dubcovskya J, Gillf BS, Gub YQ, Hadamf J, Heod HY, Huob N, Lazob G, Maa Y, Matthewsg DE, McGuirea PE, Morrelle PL, Qualseta CO, Renfrob J, Tabanao D, Talbertd LE, Tiana C, Toleno DM, Warburtonh ML, Youb FM, Zhangg W, Dvoraka J. 2009. Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in *Triticeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **106**: 15780-15785

Lynch M, Conery JS. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. **290**: 1151-1155

Lysak MA, Cheung K, Kitschke M, Bures P. 2007. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in *Brassicaceae* species with varying chromosome number and genome size. *Plant Physiology*. **145**: 402-410

MacGillivray CW, Grime JP. 1995. Genome size predicts frost resistance in British herbaceous plants: implications for rates of vegetation response to global warming. *Ecology*. **9**: 320-325

Mallet J. 2007. Hybrid speciation. *Nature*. **446**: 279-283

Mallet J, Beltrán M, Neukirchen W, Linares M. 2007. Natural hybridisation in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology*. **7**: 28

Mayrose I, Zhan SH, Rothfels CJ, Magnuson-Ford K, Barker MS, Rieseberg LH, Otto SP. 2011. Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*. **333**: 1257

McIntyre PJ. 2012. Polyploidy associated with altered and broader ecological niches in the *Claytonia perfoliata* (Portulacaceae) species complex. *American Journal of Botany*. **99**: 655-662

Melayah D, Lim KY, Bonnivard E, Chalhoub B, De Borne FD, Mhiri C, Leitch AR, Grandbastien MA. 2004. Distribution of the Tnt1 retrotransposon family in the amphidiploid tobacco (*Nicotiana tabacum*) and its wild *Nicotiana* relatives. *Biological Journal of the Linnean Society*. **82**: 639-649

Melo MC, Borba EL. 2011. Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*. **293**: 135-145

Moraes AP, Guerra M. 2010. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*. **287**: 113-118

Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research*. **15**: 115-121

Moscone EA, Samuel R, Schwarzacher T, Schweizer D, Pedrosa-Harand A. 2007. Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution. *Chromosome Research*. **15**: 931-943

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. Orchidaceae Brasiliensis, Band 1. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. Orchidaceae Brasiliensis, Band 2. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow

Pansarin ER, Amaral MCE. 2007. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Pansarin ER, Amaral MCE. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Partridge JF, Scott KSC, Bannister AJ, Kouzarides T, Allshire RC. 2002. Cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Current biology*. **12**: 1652-1660

Paton AJ, Brummitt N, Govaerts R, Harman K, Hinchcliffe S, Allkin B, Lughadha EM. 2008. Towards target of the global strategy for plant conservation: a working list of all known plant species – progress and prospects. *Taxon*. **57**: 602–611

Pedrosa A, Jantsch MF, Moscone EA, Ambros PF, Schweizer D. 2001. Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). *Chromosoma*. **110**: 203-213

Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. 2003. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*. **112**: 423-440

Petrov DA. 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics*. **17**: 23-28

Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012. Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology*. **21**: 5208-5220

Pinheiro F, Barros F. 2005. Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo *Epidendrum secundum* e espécies afins (Orchidaceae) através de AFLP. Dissertation, Universidade de São Paulo.

Pinheiro F, Barros F. 2007a. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*. **25**: 129-136

Pinheiro F, Barros F. 2007b. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea*. **34**: 563-570

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*. **38**: 1923-1935

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*. **19**: 3981-3994

Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLF, Salatino A, Barros F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **283**: 165-177

Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen F. 1999. Genera Orchidacearum. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford. 197p

Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2009. Genera Orchidacearum, vol. 5. Epidendroideae (Part two). Oxford University Press, New York. 664p

Ramsey J, Schemske DW. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **29**: 467-501

Rieseberg LH. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **28**: 359-389

Riley R, Chapman V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*. **182**: 713-715

Sang T, Pan J, Zhang D, Ferguson D, Wang C, Pan KY, Hong DY. 2004. Origins of polyploids: an example from peonies (Paeonia) and a model for angiosperms. *Biological Journal of the Linnean Society*. **82**: 561-571

San Miguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*. **274**: 765-768

Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*. **58**: 307-324

Schweizer D. 1981. Counterstain-enhanced chromosome banding. *The American Journal of Human Genetics*. **57**: 1-4

Schweizer D, Ambros PF. 1994. Chromosome banding. Stain combinations for specific regions. *Methods in Molecular Biology*. **29**: 97-112

Shoemaker RC, Schlueter J, Doyle JJ. 2006. Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes. *Current Opinion in Plant Biology*. **9**: 104-109

Soltis DE, Senter AE, Zanis MJ, Kim S, Thompson JD, Soltis PS, Ronse DLP, Endress PK, Farris JD. 2003. Gunnerales are sister to other core eudicots, and exhibit floral features of early-diverging eudicots. *American Journal of Botany*. **90**: 461-470

Soltis DE, Soltis PS. 1999. Polyploidy: origins of species and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. **14**: 348-352

Souza VC, Lorenzi H. 2008. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Nova Odessa, Plantarum. 704p

Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M. 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany*. **109**: 987-999

Stebbins GL. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York. 646p

Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Ltd, London. 216p

Sumner AT. 1990. Chromosome banding. Unwin Hyman Ltd, London. 434p

Sumner AT. 2003. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom. 287p

Swift H. 1950. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **36**: 643-654

Tanaka R, Kamemoto H. 1984. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: Arditti J, ed. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press (Ithaca) 234-283

Thomas CA. 1971. The genetic organization of chromosomes. *Annual Review of Genetics*. **5**: 237-256

Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo R. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *The Biological Journal of the Linnean Society*. **84**:1-54

Uhl C. 1978. Chromosomes of Mexican *Sedum*, II Section *Pachysedum*. *Rhodora*. **80**: 491-512

van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Arenas A, Culham A, Chase MW. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*. **15**: 96-114

Wang X, Tang H, Bowers JE, Feltus FA, Paterson AH. 2007. Extensive concerted evolution of rice paralogs and the road to regaining independence. *Genetics*. **177**: 1753-1763

Wei-Ping LI. 2006. Natural hybridization between *Aster ageratoides* var. *scaberulus* and *Kalimeris indica* (Asteraceae): evidence from morphology, karyotype, and ITS sequences. *Botanical Studies*. **47**: 191-197

Winkler H. 1916. Über die experimentelle Erzeugung Von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zeitschrift für Botanik*. **8**: 417-531

Zofall M, Yamanaka S, Reyes-Turcu FE, Zhang Ke, Rubin C, Grewal SIS. 2012. RNA elimination machinery targeting meiotic mRNAs promotes facultative heterochromatin formation. *Science*. **335**: 96-100

Capítulo 1

Múltiplos mecanismos de evolução cariotípica estão envolvidos na variabilidade cromossômica numérica em *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae: subgênero *Amphiglottium*)

Múltiplos mecanismos de evolução cariotípica estão envolvidos na variabilidade cromossômica numérica em *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae: subgênero *Amphiglottium*)

Felipe Nollet Medeiros de Assis, Luiz Gustavo Rodrigues Souza, Enoque Medeiros Neto, Fábio Pinheiro, Ana Emília Barros e Silva, Leonardo P. Felix

RESUMO O gênero *Epidendrum* L. é composto por aproximadamente 1.500 espécies de distribuição exclusivamente neotropical. Algumas espécies apresentam taxonomia complexa, como *E. secundum*, que exibe características geralmente relacionadas à hibridação, poliploidia e reprodução assexuada, e apresentam contagens cromossômicas prévias de $2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80, 84$. Para testar as hipóteses sobre a origem da variabilidade cromossômica numérica em *E. secundum*, foi realizada a quantificação de DNA nuclear em 18 populações sul-americanas desta espécie. Além disso, foi realizada a análise cariomorfológica, bem como da distribuição da heterocromatina, através do bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI. Em 16 populações foram identificados indivíduos diploides, que apresentaram em média $2C = 4,08$ pg DNA, e em duas populações indivíduos tetraploides, com em média $2C = 8,24$ pg DNA. Nos tecidos foliares de *E. secundum* foram encontrados núcleos com $2C$, $4C$ e $8C$. As análises mitóticas apresentaram diferentes números cromossômicos que variaram de $2n = 50$ até $2n = 90$, com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. Os cromossomos variaram de $0,73$ μm até $4,45$ μm , em sua maioria com menos de 2 μm . Foram identificadas regiões cromossômicas terminais e pericentroméricas CMA^+ /DAPI $^-$, algumas regiões terminais CMA^- /DAPI $^+$ e CMA^0 /DAPI $^-$. As regiões pericentroméricas geralmente apresentaram-se CMA^0 /DAPI $^-$. Na população de Atibaia (São Paulo) foram identificados citótipos com cromossomos B em número variável, estes inteiramente CMA^+ /DAPI $^-$. Apesar da ocorrência de números cromossômicos discrepantes em *E. secundum*, as populações não apresentaram conteúdos de DNA com variações significativas pelo teste de Tukey, sugerindo que o aumento no número de cromossomos acrocêntricos é principalmente originada por fissões cêntricas. A ocorrência de distintos padrões de bandas CMA/DAPI entre as populações, bem como o conjunto variável das características citológicas observado, sugerem que estas populações estão evoluindo independentemente, iniciando a formação de barreiras de isolamento reprodutivo provavelmente em função do isolamento geográfico. Além disso, a suposta origem híbrida para *E. secundum* é corroborada pela ocorrência ativa de processos de hibridação envolvendo esta e outras espécies do subgênero *Amphiglottium*.

Palavras-chave: Cromossomos B, Disploidia, Endoreduplicação, Fissão cêntrica, Heterocromatina, Poliploidia, Tamanho do genoma.

Multiple karyotype evolution mechanisms are involved in numerical chromosome variability in *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae: subgenus *Amphiglottium*)

ABSTRACT The genus *Epidendrum* L. consists of approximately 1,500 species with exclusively Neotropical distribution. Some species have complex taxonomy, such as *E. secundum* that displays features generally related to hybridization, asexual reproduction and polyploidy, and have previous chromosome counts of $2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80, 84$. To test the hypotheses about the origin of chromosome number variation in *E. secundum*, was performed the quantification of nuclear DNA content in 18 South American populations of this species. In addition, karyomorphological analysis, as well as heterochromatin distribution analysis by banding with CMA/DAPI fluorochromes was carried out. Diploid individuals were identified in 16 populations, which in average had $2C = 4.08$ pg DNA, and tetraploid individuals in two populations, with $2C = 8.24$ pg DNA. Leaf tissues in *E. secundum* presented nuclei with $2C$, $4C$ and $8C$. The analyzes showed different mitotic chromosome counts ranging from $2n = 50$ to $2n = \text{ca.} 90$ with metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes. The chromosomes ranged from $0,73 \mu\text{m}$ to $4,45 \mu\text{m}$, mostly less than $2 \mu\text{m}$. CMA $^+$ /DAPI $^-$ terminal and pericentromeric chromosome regions were identified, and some CMA $^-$ /DAPI $^+$ and CMA 0 /DAPI $^-$ terminal chromosome regions. Pericentromeric regions usually were CMA 0 /DAPI $^-$. In Atibaia population (São Paulo) were identified cytotypes with B chromosomes in variable number, completely CMA $^+$ /DAPI $^-$. Although the occurrence of discrepant chromosome numbers in *E. secundum*, populations showed no significant DNA content variation by Tukey test, suggesting that the increase of acrocentric chromosome number is mainly caused by centric fissions. The occurrence of different CMA/DAPI band patterns between populations, as well as the variable clusters of cytological characteristics observed suggests that these populations are evolving independently, starting the formation of reproductive isolation barriers, probably due to the geographical isolation. Furthermore, the putative hybrid origin for *E. secundum* is supported by the occurrence of active hybridization involving this and other species of the subgenus *Amphiglottium*.

Keywords: B chromosomes, Centric fission, Dispoloidy, Endoreduplication, Genome size, Heterochromatin, Polyploidy.

INTRODUÇÃO

O gênero *Epidendrum* L. é composto por aproximadamente 1.500 espécies de distribuição exclusivamente neotropical (Chase *et al.*, 2003; Hágster & Soto Arenas, 2005), com ampla variabilidade morfológica inter e intraespecífica (Pabst & Dungs, 1975; Hágster, 1984; Pinheiro & Barros, 2005, 2007a), e um grande número de características plesiomórficas em relação a outros gêneros da subfamília Epidendroideae (Pinheiro *et al.*, 2009). Algumas espécies apresentam taxonomia bastante complexa, como por exemplo, *E. secundum*, que exibe características geralmente relacionadas à hibridação, poliploidia e reprodução assexuada (Pinheiro *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2013), bem como a habilidade de colonizar diversos tipos de ambientes, sendo facilmente encontrados na Cordilheira dos Andes, no planalto central do Brasil, na Mata Atlântica, em inselbergues da Caatinga, nos Tepuis venezuelanos, e em habitats ruderais (Dunsterville, 1979; Dressler, 1989; Hágster & Soto Arenas, 2005; Pinheiro & Barros, 2007a).

Taxonomicamente, *E. secundum* pertence ao subgênero *Amphiglottium*, seção *Amphiglottium*, subseção *Tuberculata*, caracterizada por apresentar hábito cespitoso, ausência de pseudobulbos, haste floral alongada, folhas dísticas, coriáceas, e inflorescências em corimbo simples com um número variável de pequenas flores, geralmente lilases, com labelo trilobado de margens denteadas, com calo complexo no centro do labelo (Pinheiro & Barros, 2007b). A monofilia da subseção *Tuberculata* é fortemente suportada por dados moleculares e indicam que *E. secundum* é o grupo mais derivado dentro do subgênero *Amphiglottium* (Pinheiro *et al.*, 2009). Contudo, a monofilia de *E. secundum* não é suportada pelo conjunto de dados analisados por Pinheiro *et al.* (2009), com algumas populações mais relacionadas a *E. cochlidium* e *E. xanthinum*, do que com as demais populações de *E. secundum*.

Diversas zonas de hibridação foram encontradas em populações simpátricas do gênero *Epidendrum*, nas quais o fluxo gênico entre espécies com diferentes níveis de ploidia indica que as barreiras de isolamento reprodutivo pré e pós-zigóticas são fracas ou ausentes (Dunsterville, 1979; Hágster, 1984; Dressler, 1989; Pansarin & Amaral, 2007; Pinheiro *et al.*, 2010), adicionando novos desafios para a interpretação de suas relações filogenéticas. De fato, a hibridação natural entre *E. secundum* e outras espécies de *Epidendrum* revelaram uma elevada compatibilidade reprodutiva, inclusive entre espécies que apresentam conteúdo de DNA bastante discrepantes (Assis, em

preparação). Estas novas combinações genômicas podem ser mantidas nas populações, inicialmente através da reprodução vegetativa, uma vez que *E. secundum*, bem como outras espécies do subgênero *Amphiglottium*, reproduzem-se facilmente por brotamento dos nós presentes em suas hastes florais (Assis *et al.*, 2013). Contudo, a importância da hibridação interespecífica para a diversidade biológica em Orchidaceae ainda não está completamente esclarecida (Pinheiro *et al.*, 2010), bem como o estabelecimento de barreiras reprodutivas em *Epidendrum* é de difícil compreensão. Novas evidências sugerem que a diminuição do fluxo gênico, em função do isolamento geográfico, exerce uma importante função no estabelecimento de barreiras de isolamento reprodutivo nos estágios iniciais da diversificação das linhagens em *E. denticulatum* (Pinheiro *et al.*, 2013). Posteriormente, o acúmulo de diferenças genéticas pode moldar os limites entre estas populações, permitindo que algumas características adaptativas sejam selecionadas em direção ao seu “fitness optima” (Rieseberg & Willis, 2007).

Cariologicamente, *Epidendrum secundum* apresenta elevada variação cromossômica numérica, com registros prévios de $2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80, 84$ (Pinheiro *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2013), o que torna o grupo um interessante modelo para estudos de evolução cromossômica numérica em Orchidaceae. Contudo, as causas desta variação ainda são desconhecidas, dificultando também a identificação segura de um número básico para o grupo, bem como de outros aspectos de sua evolução cariotípica. Apesar desta desconcertante variabilidade, algumas hipóteses foram levantadas sobre as possíveis causas dessa variação. Pinheiro *et al.* (2009) encontraram seis citótipos em diferentes populações, sugerindo a poliploidia e a hibridação como as principais causas para a extrema variação cromossômica numérica encontrada em *E. secundum*. Assis *et al.* (2013) verificaram a ocorrência de 10 diferentes citótipos com números cromossômicos muito variáveis, sugerindo que a disploidia e/ou aneuploidias também são importantes mecanismos para a diversificação cariológica em *E. secundum*.

A análise cariotípica mais detalhada, incluindo níveis de ploidia, conteúdo de DNA nuclear e padrões de distribuição de bandas heterocromáticas, têm sido de grande importância na investigação das relações evolutivas e taxonômicas em muitos grupos de plantas, inclusive em Orchidaceae (Kao *et al.*, 2001; D'Emerico *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2012; Jersáková *et al.*, 2013). Para testar as hipóteses sobre as causas da variabilidade cromossômica numérica em *E. secundum*, foi realizada a quantificação de DNA nuclear em 18 populações sul-americanas desta espécie. Além

disso, foi analisada a variação cromossômica numérica, os dados cariomorfológicos, bem como a distribuição da heterocromatina, por meio do bandeamento com fluorocromos em sete dessas 18 populações.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

O DNA nuclear de espécimes pertencentes a 18 populações de *E. secundum* sul-americanas foi quantificado por citometria de fluxo (Tabela 1). Adicionalmente, foram analisados os cariótipos de espécimes pertencentes a sete populações através da coloração diferencial com fluorocromos (Tabela 2). Foram analisados três indivíduos por população, totalizando 54 espécimes estudados no presente trabalho. As espécies foram obtidas através de coletas no campo, ou cedidas gentilmente pelo Instituto de Botânica de São Paulo (IBT). Todos os indivíduos foram mantidos em cultivo no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba – Campus II, Areia, Paraíba.

Quantificação do DNA nuclear

Para a quantificação do DNA, uma suspensão de núcleos oriunda de folhas jovens foi preparada como descrito por Loureiro *et al.* (2007) com 1.500 µL de tampão WPB (Woody Plant Buffer), 1 g de tecido foliar da amostra e do padrão macerados juntos, cuja suspensão foi filtrada em uma malha de 30 µm e posteriormente corada com 25 µL de iodeto de propídeo. O tamanho do genoma foi estimado através de um citômetro de fluxo CyFlow® SL (Partec, Görlitz, Germany). O conteúdo de DNA final para cada acesso foi calculado com base em pelo menos três indivíduos diferentes por população, em três diferentes medições realizadas em três dias distintos. Foram realizados testes preliminares para a escolha do controle interno, utilizando folhas jovens de *Oxalis umbraticola* A. St.-Hil. com $2C = 16,5$ pg DNA (Vaio *et al.*, 2013) e *Tulbaghia simmleri* Beauverd com $2C = 38,91$ pg DNA. Para o processamento dos dados utilizou-se o software FloMax®.

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, coletaram-se pontas de raízes jovens pretratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) por 24 horas a 4°C, e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por 3 horas à temperatura ambiente. As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos e digeridas a 37° C por 30 minutos em solução contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma, Saint Louis, MO) (w/v). O meristema de cada raiz individual foi fragmentado sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45%, coberto com uma lamínula e esmagado, sendo a lamínula posteriormente removida após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente. Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com CMA e DAPI como descrito previamente (Barros e Silva & Guerra, 2010). As lâminas foram coradas com CMA₃ (0.1 mg/ml) durante uma hora, lavadas em água destilada, secas ao ar, coradas com DAPI (1 µg/ml) por 30 minutos, lavadas novamente, secas, e montadas em glicerol e tampão McIlvaine (1:1, v/v, pH 7,0). As melhores metáfases foram capturadas com uma vídeo-câmera Cohu usando o software Leica QFISH®.

Análises e medidas cromossômicas

Para cada citótipo, três metáfases com morfologia cromossômica clara foram medidas utilizando-se o software ImageTool® versão 3.0. A relação entre os braços cromossômicos (comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) foi utilizada para classificar os cromossomos como metacêntricos (1 – 1,4), submetacêntricos (1,5 – 2,9), ou acrocêntricos ($\geq 3,0$), de acordo com Guerra (1986).

RESULTADOS

A Tabela 1 sumariza os dados relativos ao tamanho do genoma em picogramas (pg), referentes aos valores de 2C, 4C e 8C DNA e respectivos desvios padrões. A figura 1 apresenta os histogramas relativos a esses dados e a Tabela 2 contém os dados referentes às demais análises citogenéticas.

Tabela 1 Populações de *Epidendrum secundum* com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (**2n**), relação entre número cromossômico diploide e conteúdo de DNA 2C (**2n/2C**), tamanho do genoma 2C, 4C e 8C em picogramas (**pg**) e seus respectivos desvios padrões (**DP**).

Coletor	Local de Coleta	2n	2n/2C	Tamanho do genoma (pg)					
				2C	DP	4C	DP	8C	DP
IBT 17660*	Atibaia, SP	56	15,13	3,70 b	$\pm 0,20$	7,65	$\pm 0,17$	14,20	$\pm 0,87$
IBT 17923	Serra do Rio do Rastro, SC			3,74 b	$\pm 0,09$	7,72	$\pm 0,14$	15,48	$\pm 0,32$
IBT 18041	Venezuela			3,90 b	$\pm 0,02$	7,99	$\pm 0,46$	-	-
IBT 17983*	Serra do Rio do Rastro, SC	56	14,24	3,93 b	$\pm 0,15$	7,96	$\pm 0,18$	15,77	$\pm 0,21$
EMA 588	Serraria, PB			3,97 b	$\pm 0,11$	8,02	$\pm 0,23$	15,67	$\pm 0,34$
IBT 18047*	Bolívia	28	7,03	3,98 b	$\pm 0,09$	8,06	$\pm 0,14$	-	-
IBT 18055	Pico das almas, BA			3,98 b	$\pm 0,17$	8,04	$\pm 0,22$	15,81	$\pm 0,30$
IBT 17813	Itatiaia, RJ			4,05 b	$\pm 0,18$	8,05	$\pm 0,60$	-	-
JPC 114*	Morro do Chapéu, BA	50	12,31	4,06 b	$\pm 0,16$	8,12	$\pm 0,03$	-	-
IBT 17667	Jundiaí, SP			4,17 b	$\pm 0,70$	7,70	$\pm 0,29$	-	-
IBT 10313	Cananéia, SP			4,17 b	$\pm 0,14$	8,32	$\pm 0,40$	16,43	$\pm 0,02$
IBT 11114	Apiaí, SP			4,23 b	$\pm 0,18$	8,31	$\pm 0,23$	16,05	$\pm 0,48$
LPF 13256	Brejo da Madre de Deus, PE			4,25 b	$\pm 0,07$	9,48	$\pm 0,37$	20,36	$\pm 0,16$
IBT 18052	Ibitipoca, MG			4,27 b	$\pm 0,41$	8,62	$\pm 0,58$	17,60	$\pm 0,76$
Epífita	Não documentado			4,46 b	$\pm 0,89$	8,01	$\pm 0,05$	-	-
LPF 12908*	Esperança, PB	68	15,07	4,51 b	$\pm 0,25$	9,11	$\pm 0,52$	20,32	$\pm 0,10$
LPF 12088*	Camocim de São Félix, PE	84	10,39	8,08 a	$\pm 0,10$	14,84	$\pm 0,21$	-	-
IBT 17893	Serra de Maranguape, CE			8,44 a	$\pm 0,72$	15,33	$\pm 0,23$	-	-

* populações analisadas cariologicamente.

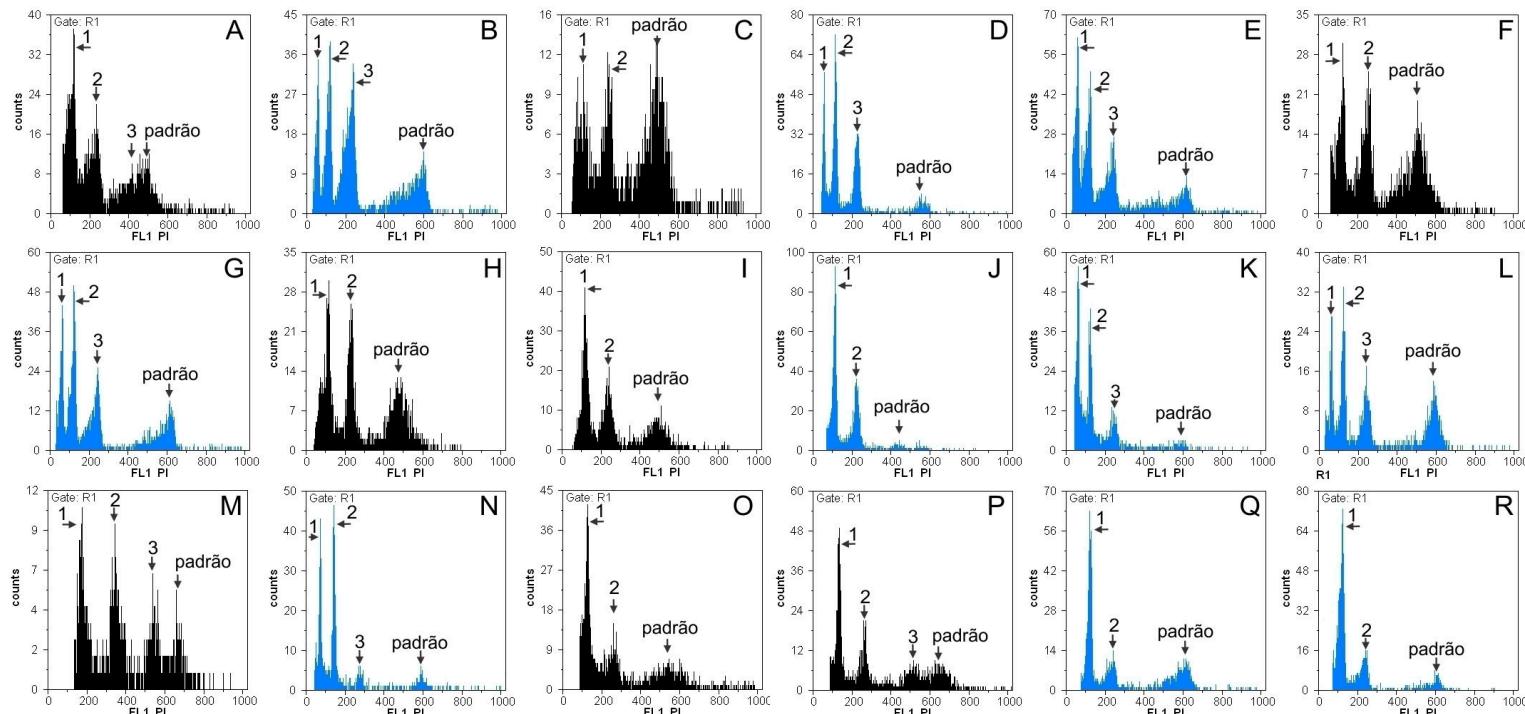


Figura 1 Histogramas citométricos de intensidade de fluorescência relativa, obtidos a partir de núcleos foliares corados com iodeto de propídeo em diferentes populações de *Epidendrum secundum*: **A.** Atibaia (SP) com $2C = 3,70$ pg, $4C = 7,65$ pg e $8C = 14,20$ pg; **B.** Serra do Rio do Rastro (SC) com $2C = 3,74$ pg, $4C = 7,72$ pg e $8C = 15,48$ pg; **C.** Venezuela com $2C = 3,90$ pg e $4C = 7,99$ pg; **D.** Serra do Rio do Rastro (SC) com $2C = 3,93$ pg, $4C = 7,96$ pg e $8C = 15,77$ pg; **E.** EMA 588 com $2C = 3,97$ pg, $4C = 8,02$ pg e $8C = 15,67$ pg; **F.** Bolívia com $2C = 3,98$ pg e $4C = 8,06$ pg; **G.** Pico das almas (BA) com $2C = 3,98$ pg, $4C = 8,04$ pg e $8C = 15,81$ pg; **H.** Itatiaia (RJ) com $2C = 4,05$ pg e $4C = 8,05$ pg; **I.** Morro do Chapéu (BA) com $2C = 4,06$ pg e $4C = 8,12$ pg; **J.** Jundiaí (SP) com $2C = 4,17$ pg e $4C = 7,70$ pg; **K.** Cananéia (SP) com $2C = 4,17$ pg, $4C = 8,32$ pg e $8C = 16,43$ pg; **L.** Apiaí (SP) com $2C = 4,23$ pg, $4C = 8,31$ pg e $8C = 16,05$ pg; **M.** LPF 13256 com $2C = 4,25$ pg, $4C = 9,48$ pg e $8C = 20,36$ pg; **N.** Ibitipoca (MG) com $2C = 4,27$ pg, $4C = 8,62$ pg e $8C = 17,60$ pg; **O.** Epífita com $2C = 4,46$ pg e $4C = 8,01$ pg; **P.** Esperança (PB) com $2C = 4,51$ pg, $4C = 9,11$ pg e $8C = 20,32$ pg; **Q.** Camocim de São Félix (PE) com $2C = 8,08$ pg e $4C = 14,84$ pg; **R.** Serra de Maranguape

(CE) com $2C = 8,44$ pg e $4C = 15,33$ pg. Setas indicam picos referentes a $2C$, $4C$, $8C$ e padrão, respectivamente. Os diferentes padrões foram diferenciados pelas cores dos histogramas: em preto, *Oxalis umbraticola* com $2C = 16,5$ pg DNA e em azul, *Tulbaghia simmleri* com $2C = 38,91$ pg DNA.

Tabela 2 Populações de *Epidendrum secundum* com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (**2n**), fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF), variação no tamanho cromossômico em micrômetros (**μm**), número de regiões heterocromáticas terminais (**CMA⁺/DAPI⁻**; **CMA⁻/DAPI⁺**; **CMA⁰/DAPI⁻**) e pericentroméricas (**CMA⁺/DAPI⁻**), e figura ilustrativa.

Coletor	Local de Coleta	2n	FC	NF	Tamanho cromossômico (μm)	Regiões heterocromáticas terminais			Pericentroméricas	Figura
						CMA ⁺ /DAPI ⁻	DAPI ⁺ /CMA ⁻	CMA ⁰ /DAPI ⁻		
JPC 114*	Morro do Chapéu, BA	50	27 MT + 13 SM + 10 AC	90	1,03 – 3,70	02	-	08	02	2 a-c
		56	27 MT + 07 SM + 22 AC	90	0,73 – 3,41	02	-	12	-	2 d-f
IBT 17660*	Atibaia, SP	56	34 MT + 04 SM + 18 AC	94	1,36 – 4,00	11	02	08	-	3 a-c
		56 + 1B	35 MT + 04 SM + 18 AC	96	1,36 – 4,00	11	02	08	-	3 d-f
IBT 17983*	Serra do Rio do Rastro, SC	56	34 MT + 04 SM + 18 AC	94	1,26 – 3,75	14	-	-	-	-
IBT 17841s*	Nova Friburgo, RJ	58	30 MT + 10 SM + 18 AC	98	1,27 – 7,10	02	-	10	01	4 a-c
LPF 12908*	Esperança, PB	68	30 MT + 06 SM + 32 AC	104	1,10 – 4,29	07	-	04	01	4 d-f
LPF 12088*	Camocim de São Félix, PE	84	-	-	-	06	-	-	-	5 a-c
EMA 757	Fagundes, PB	ca.90	34 MT + 14 SM + 42 AC	138	1,01 – 4,45	07	-	25		5 d-f

*populações que apresentam quantificação de DNA nuclear.

Quantificação do DNA nuclear

A citometria de fluxo indicou que houve variação no conteúdo de DNA entre as populações analisadas (Tabela 1), desde $2C = 3,70$ pg (Figura 1A) na população de Atibaia (São Paulo) até $2C = 8,44$ pg (Figura 1R) na população da Serra de Maranguape (Ceará). Contudo, apenas as populações de Camocim de São Félix (Pernambuco) com $2C = 8,08$ pg (Figura 1Q) e Serra de Maranguape com $2C = 8,44$ pg (Figura 1R) foram significativamente diferentes das demais (Tabela 1). Em 16 populações foram identificados indivíduos diploides, que apresentaram em média $2C = 4,08 (\pm 0,39)$ pg (Figura 1A-P), e em duas populações indivíduos tetraploides, com em média $2C = 8,24 (\pm 0,48)$ pg. O valor C monoploide (Cx) usando o fator de conversão 1g DNA = 978 Mpb é 1.995 Mpb para os indivíduos diploides, e 4.029 Mpb para os indivíduos tetraploides. Os tecidos foliares de *E. secundum* apresentaram um ciclo de endoreduplicação em 10 populações analisadas (Figura 1; Tabela 1). Em todos os espécimes analisados, esta endoreduplicação foi compatível, e cada pico subsequente apresentou o dobro da quantidade de DNA em relação ao valor 4C.

Análises cromossômicas

As análises mitóticas apresentaram diferentes contagens cromossômicas para as populações analisadas (Tabela 2), variando de $2n = 50$ (Figura 1a-c) até $2n = \text{ca.}90$ (Figura 5d-f) e cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. Contudo, mesmo após dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI, a morfologia em metáfase de alguns cromossomos menores foi bastante difícil de definir, por não apresentarem marcação clara da constrição centromérica. Os cromossomos variaram de 0,73 μm até 4,45 μm . Apenas na população de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, os citótipos apresentaram alguns cromossomos maiores em prometáfase, com até 7,10 μm (Figura 4c, setas brancas). Foram identificadas regiões cromossômicas terminais e pericentroméricas CMA⁺/DAPI⁻, algumas regiões terminais CMA⁻/DAPI⁺ (Figura 3c, insertos). As regiões pericentroméricas geralmente apresentaram-se CMA⁰/DAPI⁻.

Na população do Morro do Chapéu, Bahia (Figura 2a-f), foram identificados dois citótipos, ambos com número fundamental (NF) = 90 (Tabela 2). O primeiro citótipo apresentou $2n = 50$ (Figura 2a-c), com 27 metacêntricos, 13 submetacêntricos e 10 acrocêntricos (Tabela 2). Duas regiões proximais coraram mais fortemente com

CMA, enquanto duas regiões terminais, uma das quais distendida formando um satélite, apresentaram-se CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 2c, setas amarelas), enquanto regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻ foram identificadas em oito cromossomos (Figura 2c). O segundo citótipo apresentou $2n = 56$ (Figura 2d-f), com 27 metacêntricos, sete submetacêntricos e 22 acrocêntricos (Tabela 2). Foram visualizadas duas regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻, uma das quais distendida e formando um satélite (Figura 2f, setas amarelas), além de regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻ visualizadas em 12 cromossomos (Figura 2f).

Na população de Atibaia (São Paulo) também foram identificados dois indivíduos, o primeiro com $2n = 56$ (Figura 3a-c), e o segundo com $2n = 56 + 1B$, este, inteiramente CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 3d-f, inserto em f). O primeiro apresentou 34 metacêntricos, quatro submetacêntricos e 18 acrocêntricos, com NF = 94, enquanto o segundo diferiu por apresentar 35 metacêntricos e NF = 96 (Tabela 2). Foram observadas em ambos os cariotípos 11 regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 3c, setas amarelas), ocorrendo principalmente em cromossomos acrocêntricos, dois dos quais formando pequenos satélites distendidos. Além disso, foram visualizados dois blocos terminais CMA⁻/DAPI⁺ em um par de cromossomos metacêntricos, e oito regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻, mais facilmente visualizadas no primeiro cariotípico (Figura 3a-f).

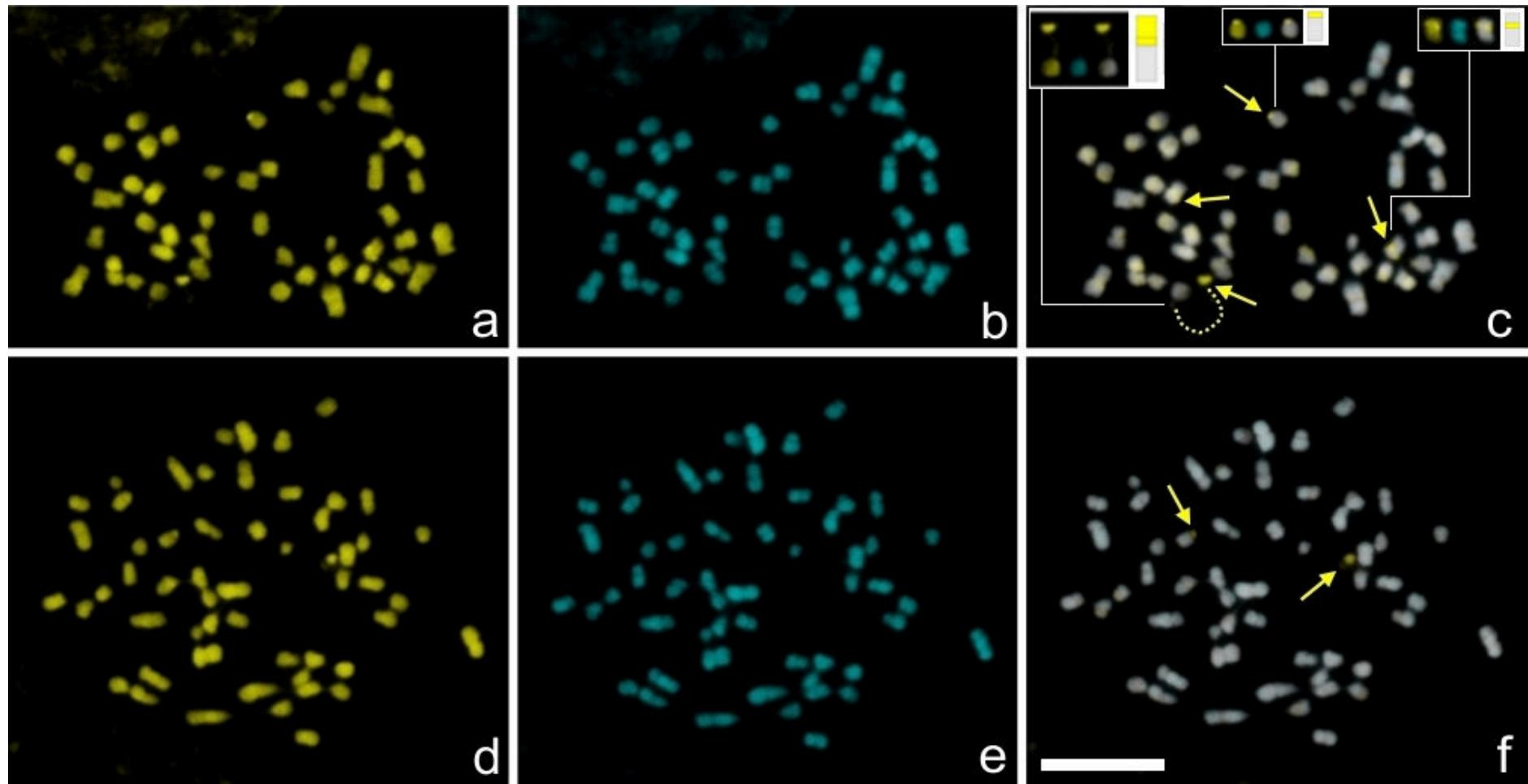


Figura 2 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população do Morro do Chapéu (BA) com $2n = 50$ (a-c) e $2n = 56$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e sobreposição das imagens (c, f). Setas amarelas indicam regiões $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$. Insertos em c indicam, da esquerda para a direita, regiões terminais distendidas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, regiões terminais simples $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ e regiões pericentroméricas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, respectivamente. A barra em f corresponde a $10\mu\text{m}$.

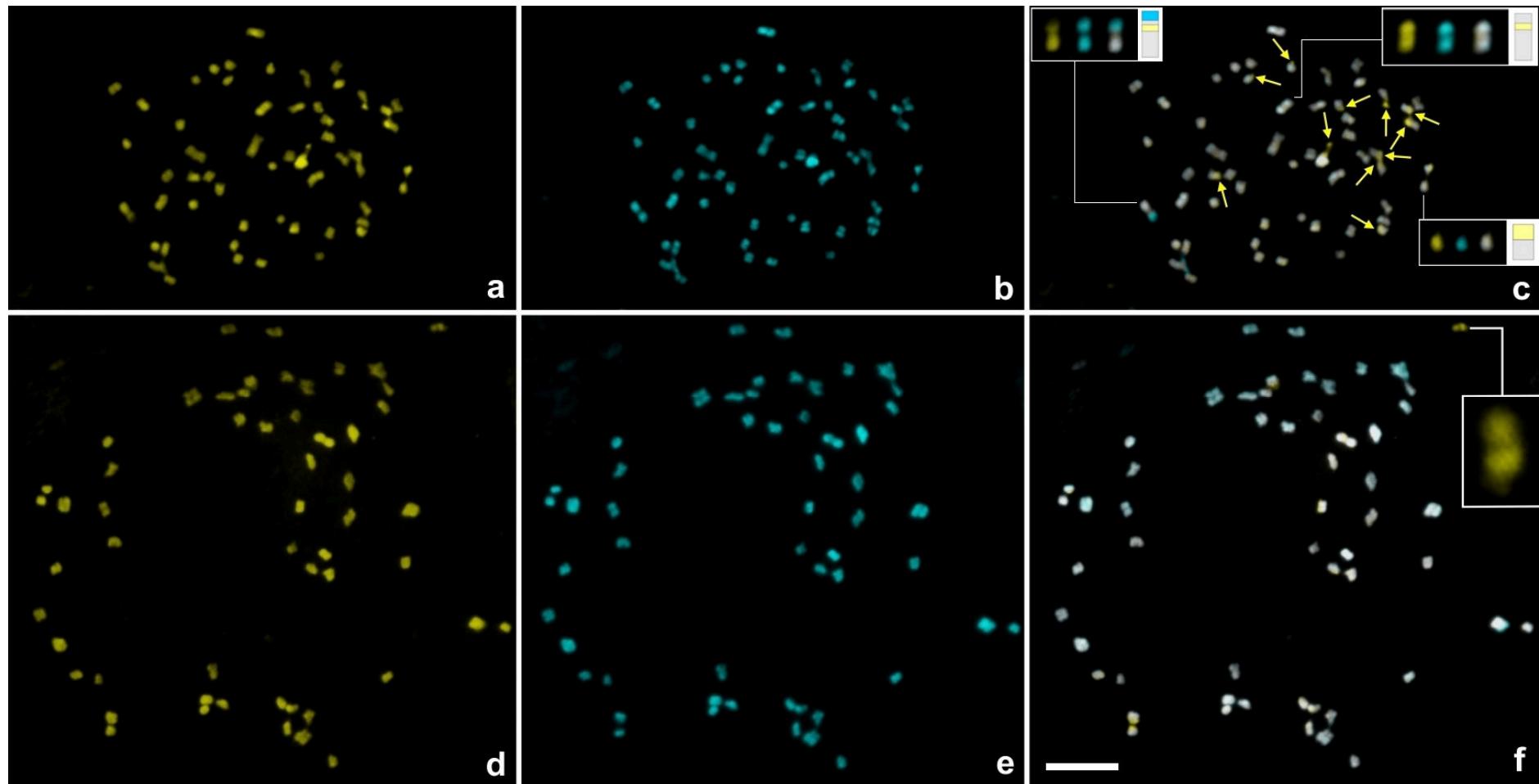


Figura 3 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população Atibaia (SP) com $2n = 56$ (a-c) e $2n = 56 + 1B$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e sobreposição das imagens (c, f). Setas amarelas indicam regiões $CMA^+/DAPI^-$. Insertos em c indicam: banda terminal $CMA^-/DAPI^+$ (canto superior esquerdo), região pericentromérica $CMA^0/DAPI^-$ (canto superior direito) e região terminal $CMA^0/DAPI^-$ em cromossomos acrocêntricos (canto inferior direito). Inserto em f destaca cromossomo B. A barra em f corresponde a $10\mu m$.

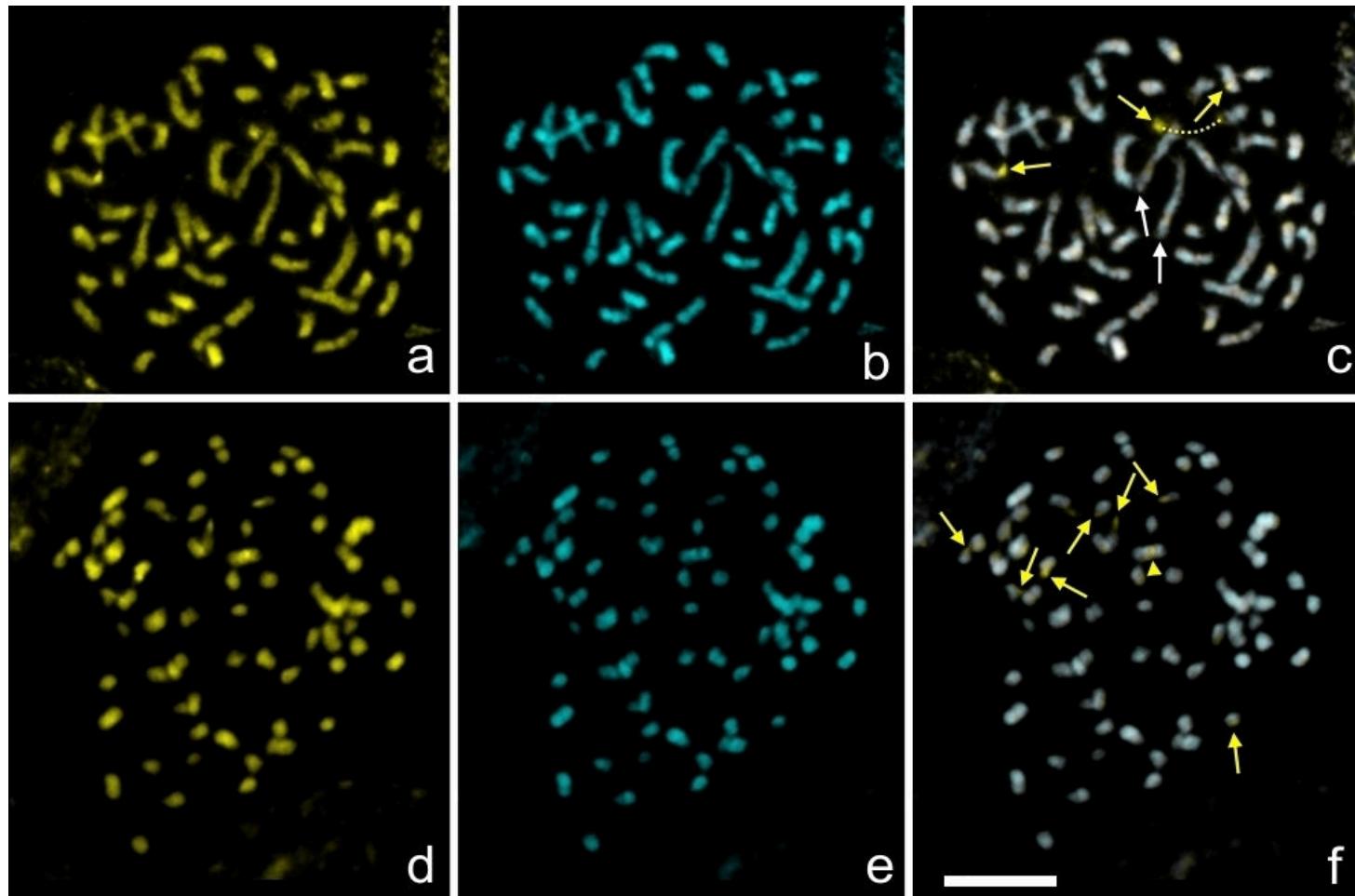


Figura 4 Células mitóticas de *E. secundum* em uma população Nova Friburgo (RJ) com $2n = 58$ (a-c) e Esperança (PB) com $2n = 68$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e sobreposição das imagens (c, f). Setas amarelas indicam regiões terminais CMA $^{+}$ /DAPI $^{-}$. Cabeça de seta em f indica banda pericentromérica CMA $^{+}$ /DAPI $^{-}$. Setas brancas indicam cromossomos maiores. A barra em f corresponde a $10\mu\text{m}$.

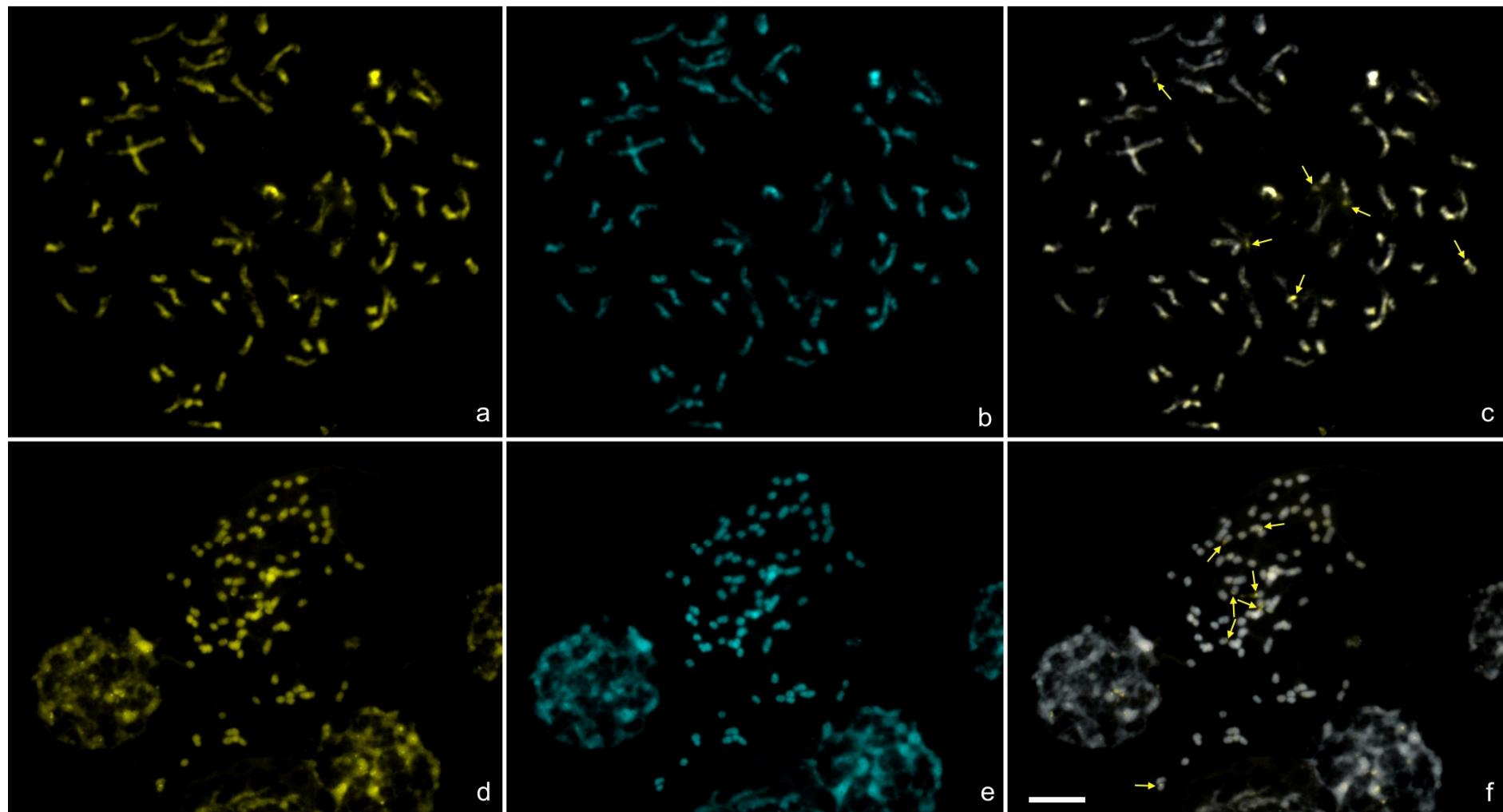


Figura 5 Células mitóticas de *E. secundum* na população de Camocim de São Félix (PE) com $2n = 84$ (a-c) e Fagundes (PB) com $2n = \text{ca.} 90$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e sobreposição das imagens (c, f). Setas amarelas indicam regiões $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^+$. A barra em f corresponde a $10\mu\text{m}$.

Outro citótipo com $2n = 56$ foi encontrado na Serra do Rio do Rastro (Santa Catarina), com cariótipo muito semelhante ao encontrado na população de Atibaia, porém não foram visualizados cromossomos B (Tabela 2).

Na população de Nova Friburgo (Rio de Janeiro) todos os indivíduos apresentaram $2n = 58$ (Figura 4a-c), com cariótipo formado por 30 cromossomos metacêntricos, 10 submetacêntricos e 18 acrocêntricos, e NF = 98 (Tabela 2), com dois cromossomos claramente maiores que os demais (Figura 4c, setas brancas). Os cariótipos apresentaram três regiões CMA⁺/DAPI⁻, sendo uma pericentromérica e duas terminais, uma das quais formando satélite com constrição bastante distendida (Figura 4c, setas amarelas), além de 10 regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻, que se estenderam dos terminais até a região pericentromérica.

Em Esperança (Paraíba), todos os indivíduos apresentaram cariótipo com $2n = 68$ (Figura 4d-f), com 30 metacêntricos, seis submetacêntricos e 32 acrocêntricos, e NF = 104 (Tabela 2). Regiões CMA⁺/DAPI⁻ foram visualizadas nos terminais de sete cromossomos acrocêntricos (Figura 4f, setas amarelas), e em uma região pericentromérica de um cromossomo submetacêntrico grande (Figura 4f, cabeça de seta amarela). Além disso, regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻ foram visualizadas em quatro cromossomos acrocêntricos (Figura 4f).

Um citótipo tetraploide foi encontrado na população de Camocim de São Félix, Pernambuco, com $2n = 84$ (Figura 5a-c). A análise cariológica destes indivíduos foi realizada em cariótipos em pró-metáfase, e por isso não foi possível estabelecer sua fórmula cariotípica. Regiões discretas, mais fortemente coradas com CMA foram visualizadas nos terminais de seis cromossomos. O outro citótipo tetraploide ocorreu na população de Fagundes, Paraíba, com $2n = \text{ca. } 90$ cromossomos (Figura 5d-f), com ocorrência de aproximadamente 34 metacêntricos, 14 submetacêntricos e 42 acrocêntricos, e NF = 138 (Tabela 2). Foram visualizadas sete regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻ em cromossomos acrocêntricos (Figura 5f, setas amarelas), uma das quais distendida, formando um satélite. Além disso, foram visualizadas pequenas regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻ em 25 cromossomos acrocêntricos (Figura 5f).

DISCUSSÃO

A primeira quantificação de conteúdo de DNA para o gênero *Epidendrum* foi realizada por Jones *et al.* (1998), que verificaram em *E. obliquum* (como *E. steinbachii*) o tamanho do genoma de $2C = 2.98 (\pm 0,11)$ pg DNA, sendo esta a única espécie do gênero que apresenta registro de quantificação do genoma em “Plant DNA C-values Database” (<http://data.kew.org/cvalues/>). O conteúdo de DNA nuclear em *E. secundum* determinada para 18 populações sul-americanas, revelaram que 16 delas correspondem à ocorrência de espécimes diploides ($2n = 50$ até $2n = 68$) e valores $2C$ DNA, desde $2C = 3,70$ a $4,08$ pg (Tabela 1, 2). Por outro lado, as duas outras populações com $2n = 84$ e 90 , correspondem a $2C = 8,08$ a $8,24$ pg DNA, respectivamente. A poliploidia é considerada como o principal mecanismo relacionado à evolução cromossômica em angiospermas (Stebbins, 1971; Leitch & Leitch, 2008; Parisod *et al.*, 2010; Hersch-Green, 2012; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2013), especialmente em Orchidaceae, atualmente considerada a família mais variável em termos de conteúdo de DNA, por apresentar valores de $1C = 0,33$ pg em *Trichocentrum maduroi* até $55,4$ pg em *Pogonia ophioglossoides*, o que corresponde a uma variação interespécifica de 168 vezes (Leitch *et al.*, 2009). Em *Epidendrum secundum*, a poliploidia parece ser um evento recorrente, ocorrendo independentemente em diferentes populações.

Apesar da ocorrência de números cromossômicos discrepantes em *E. secundum* com $2n = 50, 56, 58, 68$ na presente amostra (Tabela 2), as populações não apresentaram conteúdos de DNA com variações significativas pelo teste de Tukey. O tipo de variação numérica encontrada indica que a disploidia provavelmente seja o principal mecanismo envolvido na formação desses cariotipos. Além disso, a estabilidade na quantidade de DNA sugere a ocorrência de fissões/fusões cêntricas. Corrobora esta hipótese o fato de que alguns citótipos apresentaram o mesmo número fundamental, e o provável número básico $x = 20$ para o gênero como um todo e outras espécies do subgênero *Amphyglottium* (Felix & Guerra, 2010; Assis *et al.*, 2013). Esse mecanismo de variação numérica tem sido documentado em vários grupos de plantas (revisado por Jones, 1998), mas é especialmente frequente em plantas com cinetócoro difuso como na família Cyperaceae (ver, por exemplo, Escudero *et al.*, 2008). Em orquídeas a ocorrência de disploidia por fissão cêntrica tem sido observada em *Paphiopedilum*, que apresenta registros cromossômicos de $2n = 26$ até 52 , porém com a manutenção do $NF = 52$ (Cox *et al.*, 1997; Leitch *et al.*, 2009). Por outro lado, o

aumento não significativo no conteúdo de DNA que acompanha o aumento no número de cromossomos observado na presente amostra poderá ser decorrente da síntese de novas sequências de DNA telomérico, para a estabilização das regiões terminais nos cromossomos oriundos de fissão cêntrica (Putnam *et al.*, 2004; Leitch *et al.*, 2009). Outra evidência da ocorrência de fissão cêntrica surge a partir da dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI, que revelou a ocorrência de um maior número de bandas CMA⁰ ou CMA⁺ terminais nos citótipos com maior número de cromossomos acrocêntricos.

A segunda fonte de variação no conteúdo de DNA observada na presente amostragem pode estar relacionada à ocorrência de cromossomos Bs. Esses cromossomos supranumerários surgem em adição ao conjunto cromossômico padrão, denominados cromossomos A (Masonbrink *et al.*, 2013), sendo observados em diversos grupos vegetais (Muñoz-Pajares *et al.*, 2011; Klemme *et al.*, 2013), inclusive em Orchidaceae (Greilhuber & Ehrendorfer, 1975; Jones, 1995; Daviña *et al.*, 2009). Na população de Atibaia (São Paulo) verificou-se, em alguns citótipos, a ocorrência de $2n = 56$ e $2n = 57$, sendo este último devido à existência de um cromossomo corado apenas com CMA e completamente negativo para o DAPI. A análise em outras populações revelou a ocorrência de cromossomos supranumerários em *E. secundum*, e em outras espécies de *Epidendrum*, em número variável, e igualmente CMA⁺ (Assis, em preparação). Na presente análise, esse cromossomo supranumerário foi metacêntrico e formado inteiramente por heterocromatina rica em GC, sugerindo tratar-se de um isocromossomo. Esse tipo de cromossomo supranumerário é caracterizado por apresentar braços geneticamente idênticos, sendo um a imagem especular do outro (Jones & Houben, 2003).

Todos os espécimes analisados apresentaram ciclos de endoreduplicação completos correspondentes a valores 8C, exatamente o dobro do valor 4C observado em algumas populações. O mesmo fenômeno foi observado em *Vanilla planifolia* e híbridos, às vezes constituindo-se de uma endoreduplicação parcial e formação de até cinco picos diferentes (Lepers-Andrzejewski *et al.*, 2011). A endoreduplicação é essencialmente a replicação de um genoma sem a subsequente divisão celular, sendo tipicamente encontrada em células que finalizaram o processo de diferenciação em tecidos especializados (Masonbrink *et al.*, 2013). Alguns autores relacionam este fenômeno ao aumento da expressão de certos genes e ao controle do crescimento foliar em plantas (Larkins *et al.*, 2001; Bourdon *et al.*, 2011; Massonnet *et al.*, 2011), porém

muitas questões relacionadas a exata função da endoreduplicação no desenvolvimento vegetativo permanecem desconhecidas.

Em *Epidendrum*, principalmente nas espécies pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*, a formação de clones a partir das hastes florais é um fenômeno bastante comum, sugerindo que, eventualmente, clones autopoliploides e/ou alopóliploides poderiam ser originados a partir destes tecidos endoreduplicados. Este fenômeno tem sido observado em alguns grupos vegetais, como no híbrido diploide infértil *Primula floribunda* x *P. verticellata*, que originou um ramo tetraploide fértil, atualmente reconhecido como *Primula kewensis*, um dos primeiros allotetraploides descritos (Ramsey & Schemske, 1998). Além disso, orquídeas são plantas reconhecidas pela elevada capacidade de produzir sementes viáveis, mesmo em espécimes provenientes de parentais com diferentes números cromossômicos (Arditti, 1992), o que garantiria uma boa percentagem de reprodução sexuada para as populações de *Epidendrum* cujos parentais apresentam números cromossômicos discrepantes, como se verifica em *E. secundum*. Pinheiro *et al.* (2009) propuseram uma origem alopóliploide para *E. secundum*, com base em diversos estados de caráter. A variação no conteúdo de DNA e no número de cromossomos apresentada aqui podem ser o resultado de reorganizações intra e intergenômicas, incluindo a eliminação de sequências de DNA, a exemplo de sequências de DNA, e amplificação ou redução de elementos repetitivos, comuns ao processo de diploidização observado em outros grupos de plantas (Parisod *et al.*, 2012). A ocorrência de bandas DAPI⁺/CMA⁻ claramente visualizáveis nos citótipos encontrados apenas na população de Atibaia, bem como o conjunto variável das características citológicas observado, sugerem que diferentes populações estão evoluindo independentemente, provavelmente iniciando a formação de barreiras de isolamento reprodutivo em função do isolamento geográfico. Além disso, a suposta origem híbrida para *E. secundum* é compatível com a ocorrência ativa de processos de hibridação envolvendo esta e outras espécies do subgênero *Amphiglottium*, como entre *E. secundum* e *E. fulgens* (Pansarin & Amaral, 2008) e entre *E. secundum* x *E. flammeum*, *E. secundum* x *E. xanthinum* e *E. secundum* x *E. cinnabarinum* (Assis, em preparação).

Regiões heterocromáticas são difíceis de definir em *E. secundum*, mesmo após o ajuste de brilho, contraste e ampliação das imagens. No entanto, foi possível distinguir alguns padrões de organização da heterocromatina (sumarizados nas Figuras 2 e 3, insertos), com distintos padrões de distribuição da heterocromatina entre as diferentes

populações. Regiões terminais e proximais CMA⁺/DAPI⁻ ou CMA⁰/DAPI⁻ são bastante comuns entre as populações analisadas, estas últimas predominantemente encontradas em cromossomos acrocêntricos de todos os citótipos analisados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e bolsas de pesquisa e ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) pela concessão do fotomicroscópio de epifluorescência. Ao Prof. Dr. Marcelo Guerra pela disponibilidade do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arditti J. 1992.** Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons, New York. 641 p
- Assis FNM, Souza BCQ, Medeiros-Neto E, Pinheiro F, Silva AEB, Felix LP. 2013.** Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society.* **172:** 329-344
- Barros e Silva AE, Guerra M. 2010.** The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry.* **85:** 115-125.
- Bourdon M, Coriton O, Pirrello J, Cheniclet C, Brown SC, Poujol C, Chevalier C, Renaudin JP, Frangne N. 2011.** In planta quantification of endoreduplication using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *The Plant Journal.* **66:** 1089-1099
- Cabral JS, Félix LP, Guerra M. 2006.** Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology.* **29:** 659-664
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. 2000.** B-chromosome evolution. *Philosophical Translations of the Royal Society of London.* **355:** 163-178
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation.* Natural History Publications (Borneo), 69-89
- Cox AV, Pridgeon AM, Albert VA, Chase MW. 1997.** Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution.* **208:** 197-223

Daviña JR, Grabiele M, Cerutti JC, Hojsgaard DH, Almada RD, Insaurralde IS, Honfil AI. 2009. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*. **32**: 811-821

D'emerico S, Pignone D, Bartolo G, Pulvirenti S, Terrasi C, Stuto S, Scrugli A. 2005. Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **148**: 87-99

Dressler RL. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American Orchid Society Bulletin*. **58**: 796-800

Dunsterville GCK. 1979. Orchids of Venezuela - *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin*. **48**: 447-454

Escudero M, Valcárcel V, Vargas P, Luceño M. 2008. Evolution in *Carex* L. sect. *Spirostachyae* (Cyperaceae): A molecular and cytogenetic approach. *Organisms, Diversity & Evolution*. **7**: 271-291

Felix LP, Guerra M. 2010. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **163**: 234-278

Guerra M. 1986. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I. *Revista Brasileira de Genética*. **1**: 21-40

Greilhuber J, Ehrendorfer F. 1975. Chromosome numbers and evolution in *Ophrys* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **124**: 125-138

Hágsater E. 1984. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: Tan KW, ed. *Proceedings of the Eleventh World Orchid Conference*. 11st World Orchid Conference (Miami), 195-201

Hágsater E, Soto Arenas MA. 2005. *Epidendrum* L. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum*, vol 4. Oxford University Press (Oxford), 236-251

Hersch-Green EI. 2012. Polyploidy in indian paintbrush (*Castilleja*: Orobanchaceae) species shapes but does not prevent gene flow across species boundaries. *American Journal of Botany*. **99**: 1680-1690

Jersáková J, Trávníček T, Kubátová B, Krejcíková J, Urfus T, Liu ZJ, Lamb A, Ponert J, Schulte K, Curn V, Vrána J, Leitch IJ, Suda J. 2013. Genome size variation in Orchidaceae subfamily Apostasioideae: filling the phylogenetic gap. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **172**: 95-105

Jones K. 1998. Robertsonian fusion and centric fission on karyotype evolution of higher plants. *The Botanical Review*. **3**: 273-289

Jones RN. 1995. B chromosomes in plants. *New Phytologist*. **131**: 411-434

Jones RN, Rouben A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science*. **8**: 417-423

Jones WE, Kuehnle AR, Arumuganathan K. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*. **82**: 189-194

Kao YY, Chang SB, Lin TY, Hsieh CH, Chenk YH, Chenk WH, Chen CC. 2001. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* Orchids. *Annals of Botany*. **87**: 387-395

Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, Wicker T, Novák P, Houben A. 2013. High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *New Phytologist*. **199**: 550-558

Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y. 2001. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp Bot*. **52**: 183-192

Leitch AR, Leitch IJ. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*. **320**: 481-483

Leitch IJ, Kahandawala I, Suda J, Hanson L, Ingrouille MJ, Chase MW, Fay MF. 2009. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*. **104**: 469-481

Lepers-Andrzejewski S, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Wong M, Dron M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomy from a cytogenetic study of Tahitian *Vanilla* (*Vanilla × tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*. **98**: 986-997

Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*. **100**: 875-888

Masonbrink RE, Fu S, Han F, Birchler JA. 2013. Heritable loss of replication control of a minichromosome derived from the B chromosome of maize. *Genetics*. **193**: 77-84

Massonet C, Tisné S, Radziejwoski A, Vile D, Veylder LD, Dauzat M, Granier C. 2011. New insights into the control of endoreduplication: endoreduplication could be driven by organ growth in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*. **157**: 2044-2055

Moraes AP, Leitch IJ, Leitch AR. 2012. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **170**: 29-39

Muñoz-Pajares AJ, Martínez-Rodríguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM, Perfectti F. 2011. A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics*. **187**: 853-863

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. Orchidaceae Brasiliensis, Band 1. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. Orchidaceae Brasiliensis, Band 2. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow

Pansarin ER, Amaral MCE. 2007. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Pansarin ER, Amaral MCE. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010. Evolutionary consequences of autoploidy. *New Phytologist*. **186**: 5-17

Parisod C, Mhiri C, Lim KY, Clarkson JJ, Chase MW, Leitch AR, Grandbastien MA. 2012. Differential dynamics of transposable elements during long-term diploidization of *Nicotiana* Section *Repandae* (Solanaceae) allopolyploid genomes. *Public Library of Science One*. **7**: e50352

Pinheiro F, Barros F. 2005. Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo *Epidendrum secundum* e espécies afins (Orchidaceae) através de AFLP. Dissertation, Universidade de São Paulo.

Pinheiro F, Barros F. 2007a. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*. **25**: 129-136

Pinheiro F, Barros F. 2007b. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea*. **34**: 563-570

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*. **19**: 3981-3994

Pinheiro F, Cozzolino S, Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*. **67**: 2024-2039

Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLF, Salatino A, Barros F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **283**: 165-177

Putnam CD, Pennaneach V, Kolodner RD. 2004. Chromosome healing through terminal deletions generated by de novo telomere additions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**: 13262-13267

Ramsey J, Schemske DW. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **29**: 467-501

Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science*. **317**: 910-914

Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Ltd, London. 216p

Weiss-Schneeweiss H, Emadzade K, Jang TS, Schneeweiss GM.. 2013. Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenetics and Genome Research*. **140**: 137-150

Capítulo 2

Diversidade cariotípica em espécies e híbridos pertencentes ao gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) subgênero *Amphiglottium*, em inselberges do Nordeste e Sudeste do Brasil

Diversidade cariotípica em espécies e híbridos pertencentes ao gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) subgênero *Amphiglottium*, em inselbergues do Nordeste e Sudeste do Brasil

Felipe Nollet Medeiros de Assis, Enoque Medeiros Neto, Erton Mendonça de Almeida, Fábio Pinheiro, Luciana Ledra, Ana Emilia Barros e Silva e Leonardo P. Felix

RESUMO *Epidendrum* é provavelmente o maior gênero neotropical de orquídeas, com cerca de 1.500 espécies, sendo frequente a ocorrência de hibridação, o que adiciona novos desafios para a delimitação infragenérica do grupo. Indivíduos com morfologia floral intermediária entre *E. flammeum* x *E. secundum* encontrados no município de São João do Tigre (Paraíba), e entre *E. xanthinum* x *E. secundum* encontrados em Nova Friburgo (Rio de Janeiro) foram analisados através da morfometria floral, da técnica de coloração diferencial com os fluorocromos CMA e DAPI e pela quantificação do conteúdo de DNA nuclear. Os cariótipos de todas as espécies apresentaram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos, estes últimos com regiões terminais CMA⁺/DAPI⁺ ou CMA⁰/DAPI⁺. A quantificação do DNA revelou ciclos completos de endoreduplicação em todas as espécies. Na primeira zona de hibridação, *E. flammeum* apresentou $2n = 50$ e conteúdo de DNA $2C = 5,04$ pg DNA, *E. secundum* apresentou $2n = 62$ cromossomos e $2C = 4,82$ pg DNA. Indivíduos híbridos apresentaram $2n = 56$, com $2C = 4,63$ pg DNA. Na segunda zona de hibridação, *E. xanthinum* apresentou $2n = 28$ com $2C = 4,48$ pg DNA. Os espécimes de *E. secundum* nesta população apresentaram $2n = 56$ e $2C = 3,68$ pg DNA. O provável híbrido apresentou $2n = 42$ com $2C = 4,37$ pg DNA. O gênero apresenta altos níveis de compatibilidade reprodutiva, incluindo espécies com diferentes números cromossômicos ocorrentes em populações simpátricas, sugerindo que a hibridação e a introgessão são importantes para os estágios iniciais de especiação em *Epidendrum*. A partir destas novas combinações, a introgessão pode ser responsável pela origem de novas variantes genéticas nas populações parentais, possivelmente permitindo a dinâmica cromossômica observada em algumas espécies parentais, notavelmente em *E. secundum*.

Palavras-chave: Cromossomos B, Endoreduplicação, Heterocromatina, Morfometria, Tamanho do genoma.

Karyotypic diversity in species and hybrids of the genus *Epidendrum* L. (Orchidaceae) subgenus *Amphiglottium*, in Northeast and Southeast Brazil Inselbergs

ABSTRACT *Epidendrum* is probably the largest Neotropical orchid genera, with about 1,500 species, where the occurrence of hybridization is common and adds new challenges for infrageneric delimitation of this group. Individuals with intermediate floral morphology between *E. flammeeum* x *E. secundum* found in the municipality of São João do Tigre (Paraíba), and between *E. xanthinum* x *E. secundum* found in Nova Friburgo (Rio de Janeiro) were analyzed by floral morphometry, by differential staining technique with CMA and DAPI fluorochromes, and by the quantification of nuclear DNA content. The karyotypes of all species showed metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes, the former with CMA⁺/DAPI⁻ or CMA⁰/DAPI⁻ terminal regions. The DNA quantification revealed complete cycles of endoreduplication in all species. In the first hybridization zone, *E. flammeeum* presented $2n = 50$ and $2C = 5.04$ pg DNA content, *E. secundum* presented $2n = 62$ chromosomes and $2C = 4.82$ pg DNA. Hybrid individuals had $2n = 56$, with $2C = 4.63$ pg DNA. In the second hybridization zone, *E. xanthinum* presented $2n = 28$ with $2C = 4.48$ pg DNA. *E. secundum* specimens in this population had $2n = 56$ and $2C = 3.68$ pg DNA. The putative hybrids had $2n = 42$ with $2C = 4.37$ pg DNA. The genus has high levels of reproductive compatibility, including species with different chromosome numbers occurring in sympatric populations, suggesting that hybridization and introgression are important for the early stages of speciation in *Epidendrum*. From these new combinations, the introgression may be responsible for the origin of new genetic variants in the parental populations, possibly allowing the chromosome dynamic observed in some parental species, notably *E. secundum*.

Keywords: B chromosomes, Endoreduplication, Genome size, Heterochromatin, Morphometry.

INTRODUÇÃO

Inselberges são considerados remanescentes pré-cambrianos do processo de erosão em uma paisagem plana, e representam modelos únicos de ambientes que abrigam diferentes grupos de plantas, frequentemente isoladas de outras populações que ocorrem em ambientes mais estáveis (Porembski, 2002; Sarthou *et al.*, 2010). As oportunidades de colonização e adaptação a esses novos habitats é resultado de processos completamente estocásticos, tais como a deriva genética, efeito fundador, e pressão de seleção (Porembski & Barthlott, 2000; Parmentier *et al.*, 2005). Dessa forma, as populações que ocorrem em inselberges podem fornecer importantes informações relacionadas aos mecanismos microevolutivos envolvidos nos estágios iniciais de especiação. Diversos representantes do gênero *Epidendrum*, em especial os pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*, ocorrem nesse tipo de ambiente e suas populações conservam citótipos isolados geográfica e cromossomicamente de outras populações.

Epidendrum é provavelmente o maior gênero neotropical de orquídeas, com cerca de 1.500 espécies (Chase *et al.*, 2003; Pinheiro & Barros, 2007a), com apenas 2,8% das espécies estudadas, e esta caracterização é representada exclusivamente por contagens cromossômicas (Assis *et al.*, 2013). A análise da variação cromossônica numérica em alguns representantes do gênero demonstrou a ocorrência de diferentes números cromossômicos entre espécies estreitamente relacionadas e entre populações de uma mesma espécie. No subgênero *Amphiglottium*, seus representantes apresentam números cromossômicos que variam de $2n = 24$ em *E. fulgens* a $2n = 240$ em *E. cinnabarinum* (Guerra, 2000; Conceição *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2009; Felix & Guerra, 2010; Assis *et al.*, 2013). O alto grau de polimorfismos é especialmente elevado em alguns grupos sul-americanos, como por exemplo, *E. secundum*, que também apresenta elevada variação cromossônica numérica (Pinheiro *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2013), associada a uma extensa distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudeste dos Estados Unidos, até o norte da Argentina (Hágsater & Soto Arenas, 2005; Pinheiro & Barros, 2007b). Contudo, os mecanismos envolvidos na diversificação cariológica observada em *Epidendrum* ainda não estão completamente compreendidos, e pouco se sabe sobre os eventos microevolutivos iniciais que conduzem ao isolamento reprodutivo e, posteriormente, a especiação.

Eventos de hibridação em *Epidendrum* são comuns (Dunsterville, 1979; Hágsater, 1984; Dressler, 1989; Pansarin & Amaral, 2007; Pinheiro *et al.*, 2010, 2013) e

adicionam novos desafios para a delimitação das espécies deste grupo. Altos níveis de compatibilidade reprodutiva observados na subtribo Laeliinae, a qual pertence o gênero *Epidendrum* (Lenz & Wimber, 1959; Pansarin & Amaral, 2008; Pinheiro *et al.*, 2010, 2013), e a ausência de polinizadores específicos (van der Pijl & Dodson, 1966; Pansarin & Amaral, 2008) indicam que as barreiras de pré-polinização são fracas ou ausentes, tornando a hibridação em populações simpátricas um evento iminente em *Epidendrum*. De fato, alguns autores detectaram zonas de hibridação entre diferentes espécies do subgênero *Amphiglottium* em populações simpátricas, através da análise de microssatélites nucleares e plastidiais, em indivíduos com morfologia floral intermediária. A partir destas análises, a hipótese de fluxo gênico entre espécies com diferentes números cromossômicos foi confirmada, e essas diferenças não se constituem em uma barreira de isolamento reprodutivo pós-zigótica, indicando que a hibridação e a introgressão são importantes processos evolucionários envolvidos na diversificação cariológica de *Epidendrum* (Pinheiro *et al.*, 2009, 2010, 2013), principalmente nos estágios iniciais de especiação.

Registros de bandeamento com fluorocromos em espécies do gênero *Epidendrum* são escassos, e pouco se conhece a respeito dos padrões de distribuição da heterocromatina no gênero, dificultando o entendimento da elevada diversidade morfológica e cariológica observada em suas espécies, bem como dos fenômenos relacionados à evolução cariotípica do grupo, dentre muitos outros aspectos de suas relações filogenéticas (incluindo seu número básico primário) que permanecem obscurecidos. Técnicas de coloração diferencial com fluorocromos, combinadas com análises da variação da quantidade do DNA nuclear, possibilitam o estudo comparativo de genótipos filogeneticamente relacionados, dos níveis de ploidia observados entre diferentes citótipos, de cromossomos específicos ou fragmentos cromossômicos em híbridos naturais ou artificiais (Guerra, 2005; Almeida *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2007), principalmente em complexos taxonômicos que reúnem características relacionadas a hibridação, poliploidia e reprodução assexuada (Souza *et al.*, 2012). No presente trabalho, foram estudadas duas zonas de hibridação entre espécies pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*, tanto da região Nordeste quanto da Região Sudeste. Indivíduos com morfologia floral intermediária entre espécies simpátricas ocorrentes nos estados da Paraíba e Rio de Janeiro foram analisadas citologicamente, com o objetivo de confirmar a origem híbrida desses dois táxons, bem como identificar possíveis mecanismos relacionados à variabilidade cariotípica observada nessas

populações, através da técnica de coloração com os fluorocromos CMA e DAPI e pela quantificação do conteúdo de DNA nuclear. Além disso, para as amostras de São João do Tigre, foi realizada uma análise morfométrica a partir de flores coletadas do possível híbrido e seus possíveis parentais. Estas análises pretendem responder as seguintes perguntas: (1) As espécies com diferentes números cromossômicos, que ocorrem nas zonas de hibridação analisadas, também apresentam diferentes conteúdos de DNA? (2) Estas diferenças no número de cromossomos entre as espécies consideradas parentais correspondem exatamente a diferentes níveis de ploidia? (3) Quais as possíveis alterações cromossômicas relacionadas à variabilidade cromossômica numérica, observada entre os táxons ocorrentes em simpatria nas zonas de hibridação analisadas? (4) Quais os prováveis efeitos da hibridação no padrão de distribuição de heterocromatina entre os táxons envolvidos?

MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico

Foram analisadas três espécies do gênero *Epidendrum*: *E. flammeum*, *E. secundum* e *E. xanthinum*. Adicionalmente, foram analisados dois prováveis híbridos interespecíficos que ocorrem em simpatria com os possíveis parentais analisados no presente estudo: o primeiro entre *E. flammeum* x *E. secundum* encontrado no município de São João do Tigre, no estado da Paraíba, e o segundo entre *E. xanthinum* x *E. secundum* encontrado em Nova Friburgo, no estado do Rio de Janeiro. As espécies foram obtidas através de coletas no campo, ou cedidas gentilmente pelo Instituto de Botânica de São Paulo (IBT). Todos os espécimes foram mantidos em cultivo no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, Campus II. As exsicatas dos espécimes coletados foram depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

Análises morfométricas

Foram analisados 15 caracteres morfológicos florais contínuos (Tabela 1), com base em Pinheiro & Barros (2007a), com algumas modificações. Foram analisados seis

indivíduos de cada espécie, totalizando 18 espécimes por população. Todas as medidas foram dadas em milímetros e tomadas a partir do ponto de maior dimensão para cada caractere. Os dados foram analisados com o software STATISTICA® versão 10.0 StatSoft, Inc. (2013), e procedeu-se uma análise multivariada e de agrupamento, utilizando-se o método de agrupamento do vizinho mais próximo, para identificar a ocorrência de grupos morfologicamente bem definidos. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizada para sumarizar a variação entre as populações e identificar a natureza intermediária das características morfológicas florais dos híbridos entre *E. flammeum* x *E. secundum*. Na ACP, o número de eixos informativos foi determinado pelos autovalores. A análise morfométrica das características morfológicas florais no possível híbrido entre *E. xanthinum* x *E. secundum*, bem como de seus possíveis parentais, ocorrentes na população de Nova Friburgo, foi realizada por Pinheiro *et al.* (dados não publicados).

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, coletaram-se pontas de raízes jovens imediatamente submetidas à pré-tratamento com 8-HQ (8-hidroxiquinoleína) por 24 horas a 18°C, e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por 3 horas a temperatura ambiente e estocadas em freezer a -20°C. As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos e digeridas a 37°C por 30 minutos em solução contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma, Saint Louis, MO) (w/v). O meristema de cada raiz individual foi fragmentado sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45%, coberto com uma lamínula e esmagado, sendo a lamínula posteriormente removida após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente.

Coloração com Fluorocromos Cromomicina A₃ e 4', -6-diamidinino-2-fenilindol (CMA/DAPI)

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com CMA₃ (0.5 mg/ml) durante uma hora, lavadas em água destilada, secas ao ar, coradas com DAPI (1 µg/ml) por 30 minutos, lavadas novamente, posteriormente secas, e montadas em glicerol e

tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). As melhores metáfases foram capturadas com uma vídeo-câmera Cohu usando o software Leica QFISH®.

Quantificação do DNA nuclear

Para a quantificação do DNA, uma suspensão de núcleos oriunda de folhas jovens foi preparada como descrito por Loureiro *et al.* (2007) com 1.500 µL de tampão WPB (Woody Plant Buffer), 1g de tecido foliar da amostra e do padrão macerados juntos, cuja suspensão foi filtrada em uma malha de 30 µm e posteriormente corada com 25 µL de iodeto de propídeo. O tamanho do genoma foi estimado através de um citômetro de fluxo CyFlow® SL (Partec, Görlitz, Germany). O conteúdo de DNA final para cada acesso foi calculado com base em pelo menos três diferentes medições realizadas em três dias distintos para cada planta individualmente, com três repetições. Foram realizados testes preliminares para a escolha do controle interno, utilizando folhas jovens de *Oxalis ubraticola* com 2C = 16,5pg DNA (Scvortzoff, 2012) e *Tulbaghia smilerii* com 2C = 38,91pg DNA. Para o processamento dos dados utilizou-se o software FloMax®.

Análises e medidas cromossômicas

Para cada espécie, três metáfases com morfologia cromossômica clara foram medidas utilizando-se o software ImageTool® versão 3.0. A relação entre os braços cromossômicos (comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) foi utilizada para classificar os cromossomos como metacêntricos (1 – 1,4), submetacêntrico (1,5 – 2,9), ou acrocêntricos ($\geq 3,0$), de acordo com Guerra (1986). Cariogramas foram construídos com base nos padrões de distribuição das regiões heterocromáticas CMA⁺/DAPI[–], CMA[–]/DAPI⁺, CMA⁰/DAPI[–] em ordem decrescente de tamanho cromossômico.

RESULTADOS

Análises morfométricas

As análises morfométricas confirmaram a natureza intermediária das características morfológicas florais para os possíveis híbridos, em relação aos prováveis parentais, ocorrentes na população de São João do Tigre, Paraíba. A análise de agrupamento, com base na distância euclidiana, identificou a formação de três grupos morfologicamente distintos, posicionando o grupo de indivíduos híbridos como intermediário a *E. flammeum* e *E. secundum* (Figura 1). A ACP também apresentou a formação de três grupos morfologicamente descontínuos (Figura 2), correspondentes a três entidades taxonomicamente distintas, com uma maior variação em *E. flammeum* e *E. secundum*, e o possível híbrido formando um grupo morfologicamente homogêneo e intermediário entre os dois primeiros. A ACP indica que os caracteres morfológicos florais selecionados apresentaram-se fortemente correlacionados com os eixos 1 e 2 (Figura 2), e os principais caracteres que definiram estes eixos foram PT-W, PT-L, LL-W, DS-L, DS-W, LS-L, LL-L, LA-W e CO-L (Tabela 1). *Epidendrum flammeum* e *E. secundum* apresentaram a maior variação explicada pelos componentes principais, mais fortemente correlacionados com o fator 1, enquanto o possível híbrido apresentou-se mais correlacionado ao fator 2. A natureza intermediária das características morfológicas do possível híbrido entre *E. xanthinum* e *E. secundum* encontrados na população de Nova Friburgo (RJ) foi investigada por Pinheiro *et al.* (dados não publicados), e apresentou resultados similares aos do presente trabalho.

Análises cromossômicas

A Tabela 2 sumariza a lista das espécies analisadas, seus respectivos locais de coleta, números cromossômicos, fórmulas cariotípicas e quantidade de DNA nuclear, enquanto a Tabela 3 contém os dados relativos ao bandeamento CMA/DAPI. Os números cromossômicos variaram de $2n = 28$ em *E. xanthinum* até $2n = 62$ em *E. secundum* (São João do Tigre, Paraíba), enquanto o tamanho dos cromossomos variou desde 0,92 μm nos menores cromossomos de *E. secundum* da população de São João do Tigre, Paraíba, a 6,22 μm no maiores cromossomos de *E. secundum* de Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Os cariotípos de todas as espécies apresentaram-se ligeiramente bimodais, formados por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos, estes últimos com regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻ e CMA⁰/DAPI⁻. Em geral, as regiões pericentroméricas foram ligeiramente mais coradas com o CMA do que com o DAPI e foram consideradas CMA⁰/DAPI⁻. As Figuras 4 e 6 apresentam cariogramas para todas

as espécies analisadas, organizadas de acordo com os tipos de regiões heterocromáticas, em ordem decrescente de tamanho cromossômico.

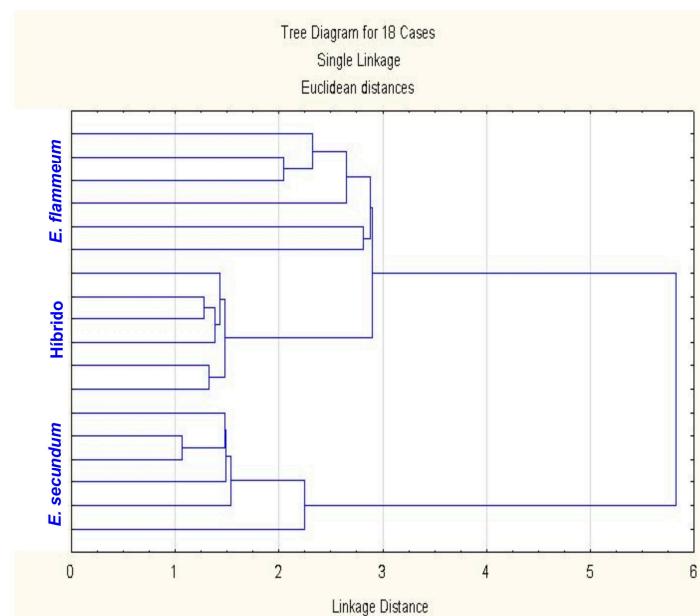


Figura 1 Dendrograma da matriz de distâncias, pelo método de agrupamento por ligação simples, referente à análise morfométrica em *E. flammeum*, *E. secundum* e o possível híbrido, ocorrentes em simpatia na população de São João do Tigre, Paraíba.

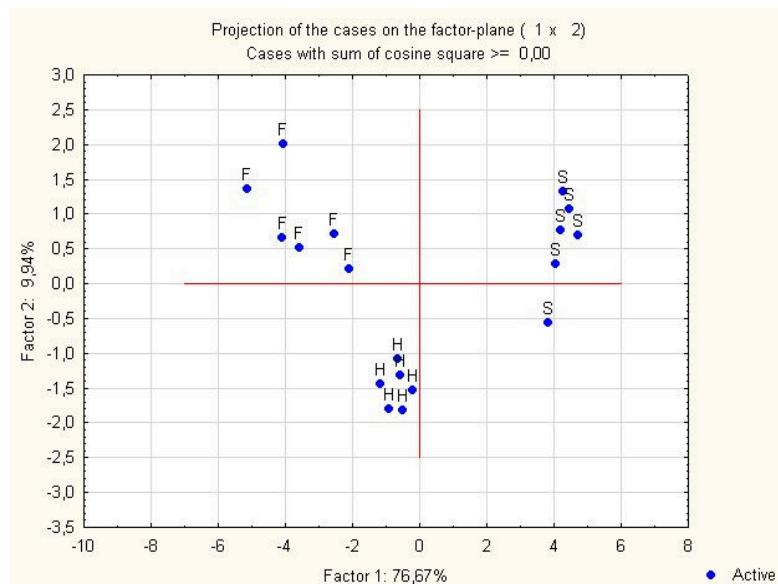


Figura 2 Análise de Componentes Principais em 18 espécimes, com base em 15 caracteres morfológicos florais contínuos (Tabela 1). Os espécimes foram encontrados em simpatia no município de São João do Tigre, Paraíba. S = *Epidendrum secundum*; F = *Epidendrum flammeum*; H = possível híbrido. Os componentes principais 1 e 2 explicam 76,67% e 9,94% da variação total, respectivamente.

Tabela 1 Variáveis utilizadas para as análises morfométricas.

Variáveis	Sigla
Comprimento do pedúnculo	P-L
Comprimento da sépala dorsal	DS-L
Largura da sépala dorsal	DS-W
Comprimento da sépala lateral	LS-L
Comprimento da sépala lateral	LS-W
Comprimento da pétala	PT-L
Largura da pétala	PT-W
Comprimento do labelo	LA-L
Largura do labelo	LA-W
Comprimento da coluna	CO-L
Comprimento do lóbulo lateral	LL-L
Largura do lóbulo lateral	LL-W
Comprimento do lóbulo central	CL-L
Largura do lóbulo central	CL-W
Comprimento do calo do labelo	CA-L
Largura do calo do labelo	CA-W

População de São João do Tigre

Na primeira zona de hibridação analisada no presente trabalho, localizada em São João do Tigre (Paraíba), foram analisados cinco espécimes de *E. flammeum* que apresentaram cariotipos com $2n = 50$ (Figura 3a-c), e ocorrência, em algumas células, de um pequeno cromossomo supranumerário inteiramente CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 3c, inserto; Figura 4A). O tamanho cromossômico variou de 1,76 μm a 4,75 μm (Tabela 2), com ligeira bimodalidade devido à presença de um par cromossômico maior que os demais (Figura 3c, setas brancas). Foram visualizadas 20 bandas terminais CMA⁻/DAPI⁺, ocupando todo ou parcialmente os braços curtos ou longos (Figura 3c; Figura 4A). Bandas puntiformes CMA⁺/DAPI⁻ foram visualizadas em sete cromossomos (Figura 3c, setas amarelas) nos terminais de seis acrocêntricos (Figura 4A), e uma banda CMA⁺/DAPI⁻ por todo o braço longo de um cromossomo metacêntrico (Figura 3c; Figura 4A), além de cromossomos inteiros ligeiramente mais corados com CMA do que com DAPI (Figura 3a-c; Figura 4).

Tabela 2 Espécies do gênero *Epidendrum* L. (subgênero *Amphiglottium*), com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide ($2n$), fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF), variação no tamanho cromossômico (μm), tamanho do genoma (pg).

Espécie	Coletor	Local de Coleta*	$2n$	FC	NF	Tamanho cromossômico (μm)		Tamanho do genoma (pg)		
						2C	4C	2C	4C	8C
<i>E. flammeum</i>	SN 93	São João do Tigre, PB	50+1B	31 MT + 02 SM + 17 AC 24 MT	83	1,76 – 4,75	5,04	9,90	20,41	
<i>E. secundum</i>	SN 167	São João do Tigre, PB	62 + 3B	20 MT + 06 SM + 32 AC	92	0,92 – 3,75	4,82	9,26	19,38	
<i>E. secundum</i> x <i>E. flammeum</i>	SN 92	São João do Tigre, PB	56	16 MT + 17 SM + 19 AC	93	1,51 – 6,15	4,63	8,61	18,26	
<i>E. xanthinum</i>	IBT 17671	Nova Friburgo, RJ	28	33 MT + 08 SM + 04 AC	52	2,36 – 6,02	4,48	9,10	-	
<i>E. secundum</i>	IBT 17840	Nova Friburgo, RJ	56	23 MT + 11 SM + 12 AC	100	1,38 – 6,22	3,68	7,61	15,68	
<i>E. secundum</i> x <i>E. xanthinum</i>	IBT 19L	Nova Friburgo, RJ	42	13 AC	71	1,56 – 6,02	4,37	8,70	-	

*Acrônimos para os estados brasileiros: PB = Paraíba; RJ = Rio de Janeiro.

Tabela 3 Espécies do gênero *Epidendrum* L. (subgênero *Amphiglottium*) com seus respectivos locais de coleta, número de bandas terminais heteocromáticas ($CMA^+/DAPI^-$; $CMA^-/DAPI^+$; $CMA^0/DAPI^-$), número de bandas intersticiais ($DAPI^+/CMA^-$) e números de bandas pericentroméricas ($CMA^+/DAPI^-$).

Espécie	Local de coleta	Bandas Terminais			Bandas Intersticiais $DAPI^+/CMA^-$	Bandas pericentroméricas $CMA^+/DAPI^-$
		$CMA^+/DAPI^-$	$CMA^-/DAPI^+$	$CMA^0/DAPI^-$		
<i>E. flammeum</i>	São João do Tigre, PB	07	20	06	-	-
<i>E. secundum</i>	São João do Tigre, PB	05	16	10	-	-
<i>E. secundum</i> x <i>E. flammeum</i>	São João do Tigre, PB	04	09	16	-	-
<i>E. xanthinum</i>	Nova Friburgo, RJ	02	04	05	01	02
<i>E. secundum</i>	Nova Friburgo, RJ	04	-	12	-	04
<i>E. secundum</i> x <i>E. xanthinum</i>	Nova Friburgo, RJ	03	02	12	-	01

*Acrônimos para os estados brasileiros: PB = Paraíba; RJ = Rio de Janeiro.

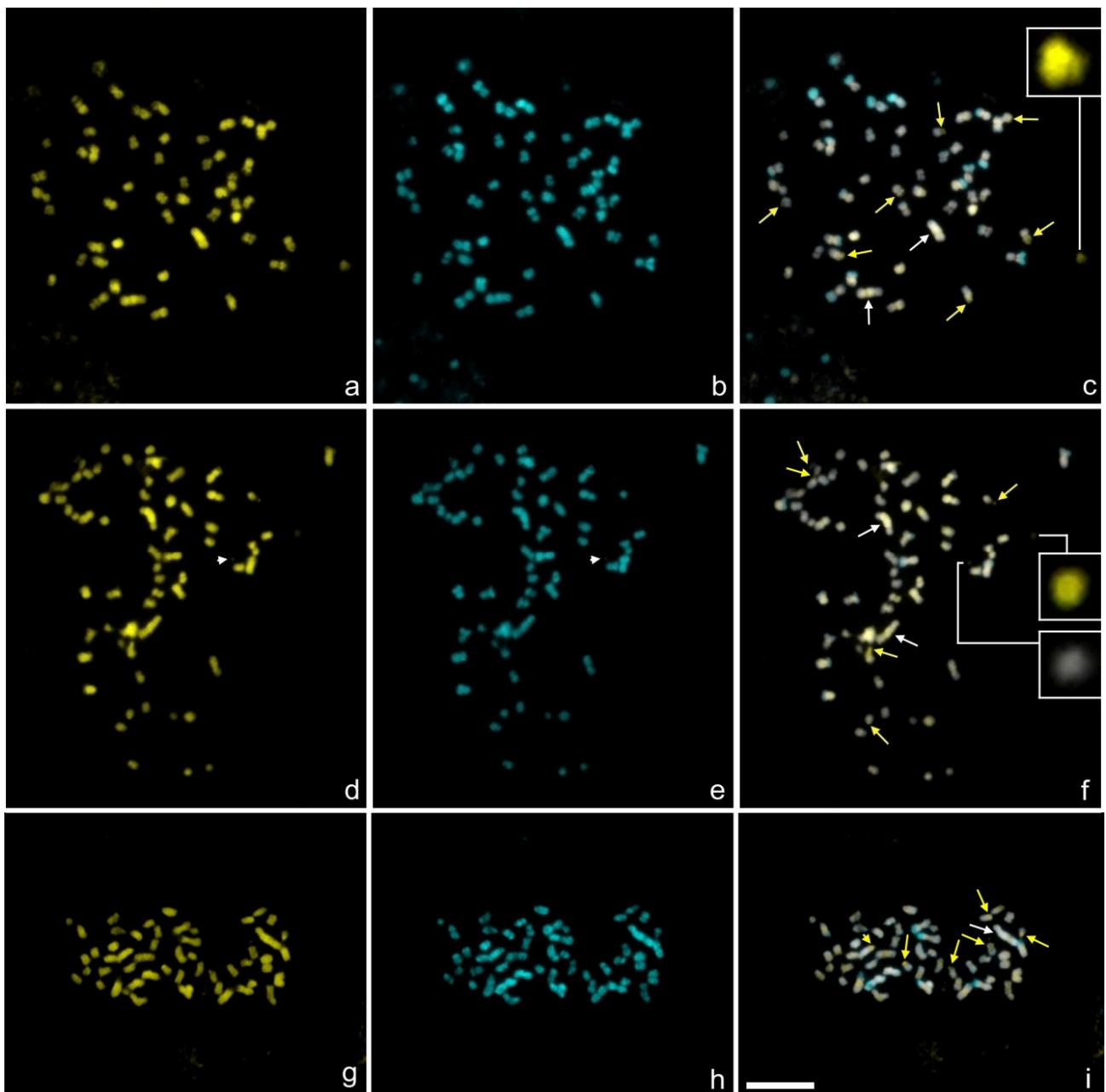
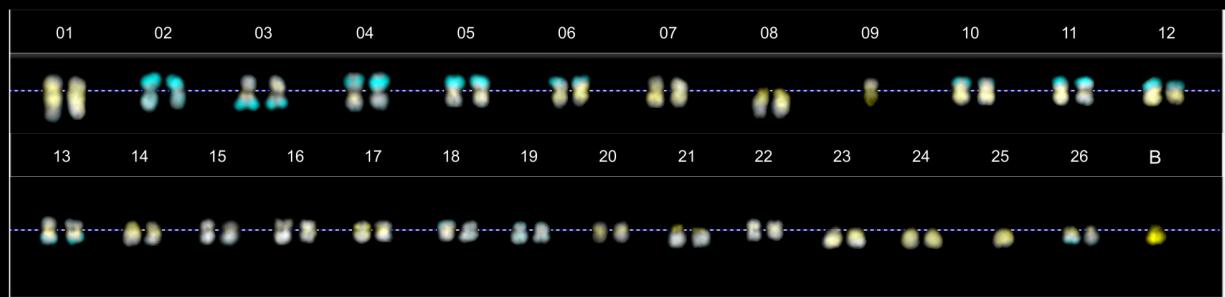
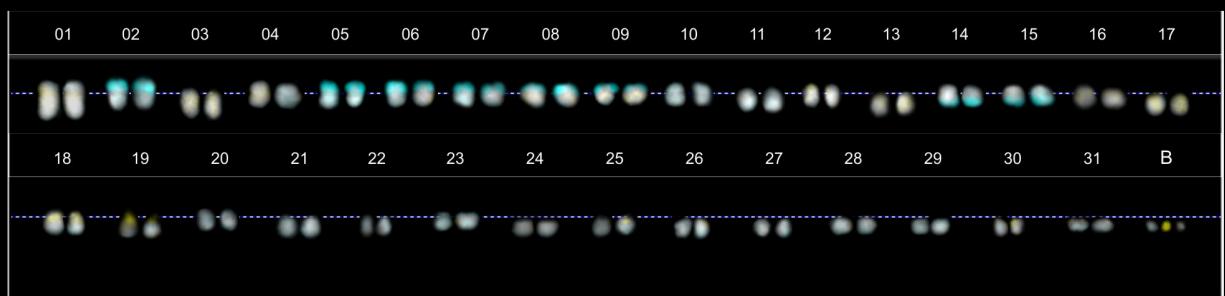


Figura 3 Células mitóticas de espécies simpátricas em uma população de São João do Tigre, PB: *Epidendrum flammeum* com $2n = 50 + 1B$ (a-c), *E. secundum* com $2n = 62 + 1B + 1$ microcromossomo (d-f), e possível híbrido com $2n = 56$ (g-i); coradas com CMA (a, d, g), DAPI (b, e, h) e imagens dos dois fluorocromos (c, f, i). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas terminais CMA⁺/DAPI⁺, e cabeças de setas indicam o microcromossomo corado com CMA (d) e com DAPI (e). Inserto em c destaca cromossomo B, em f destaca cromossomo B (completamente heterocromático) e microcromossomo (em cinza). A barra em i corresponde a 10µm.

A. *E. flammeum* $2n = 50 + 1B$



B. *E. secundum* $2n = 62 + 3B$



C. híbrido $2n = 56$

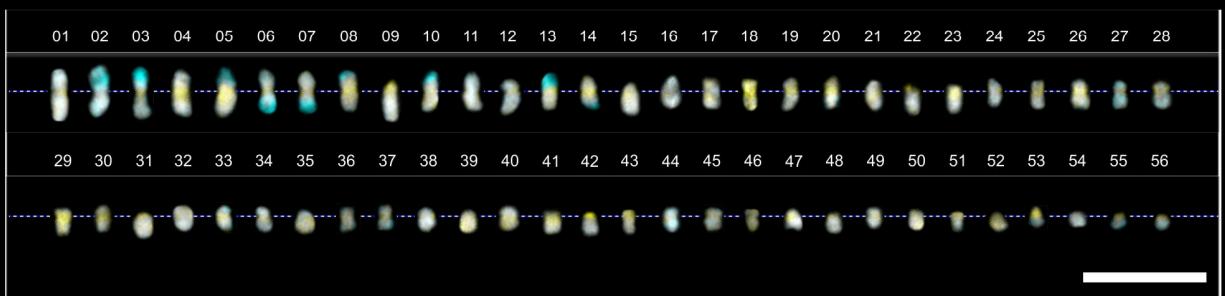


Figura 4 Cariogramas das espécies do gênero *Epidendrum* e do possível híbrido ocorrentes em simpatria no município de São João do Tigre, Paraíba. A. *Epidendrum flammeum*; B. *E. secundum*; C. possível híbrido. Todos os cariogramas foram organizados por ordem decrescente de tamanho. A barra em C corresponde a 10 µm. A linha pontilhada indica a posição do centrômero.

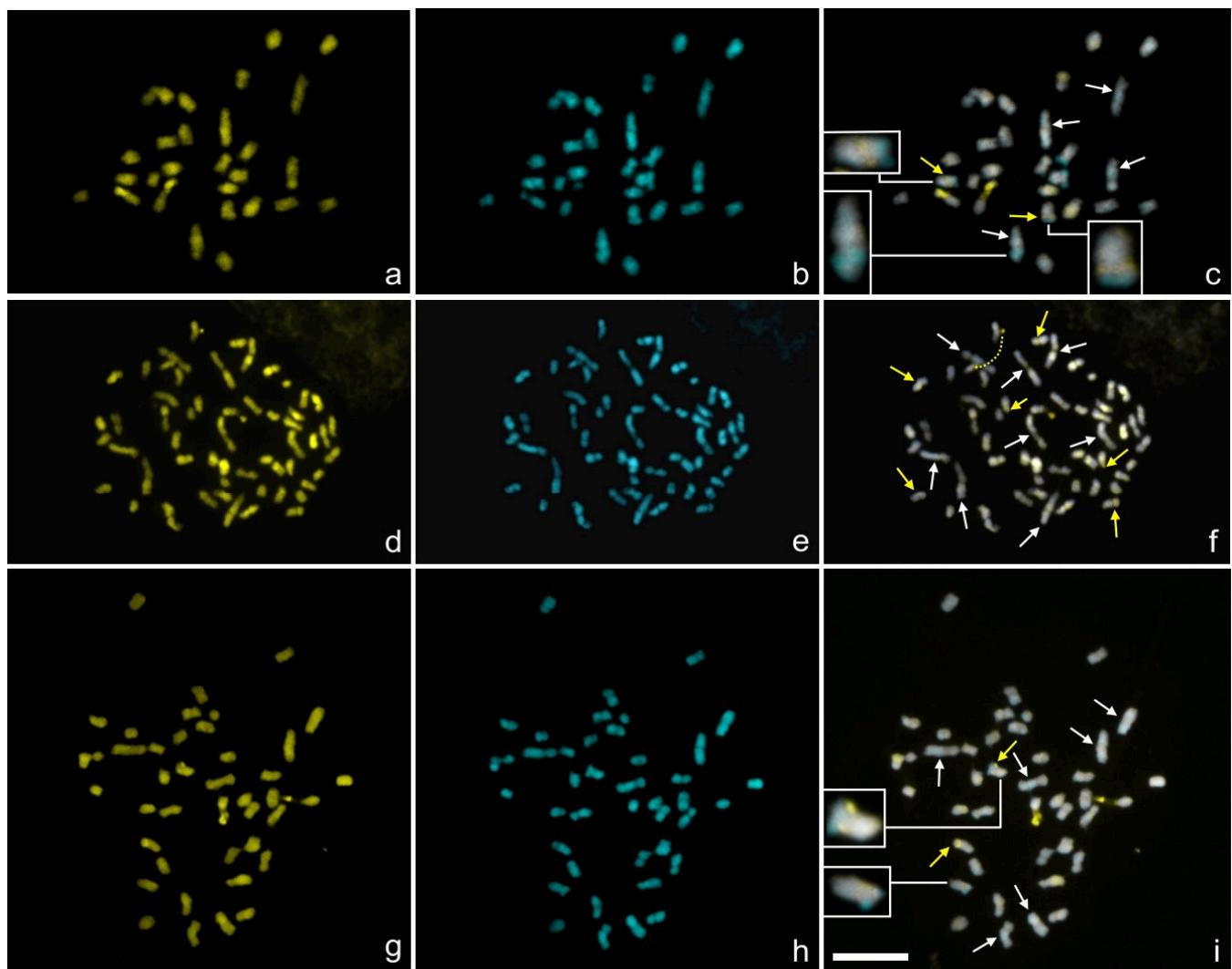
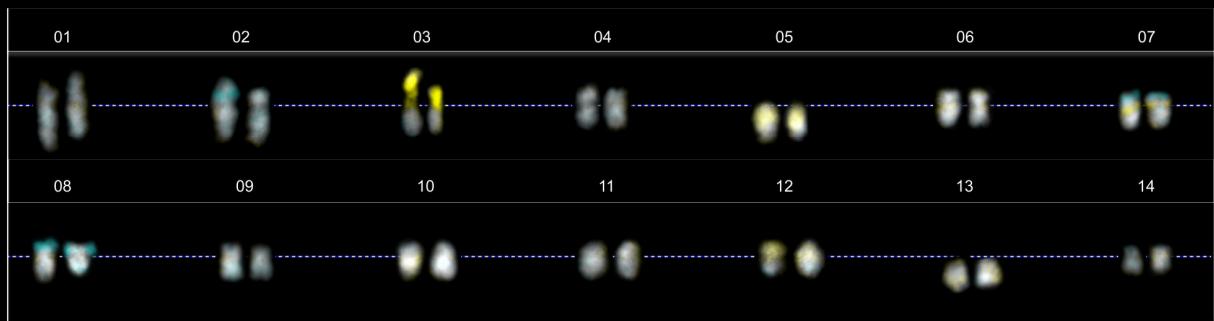
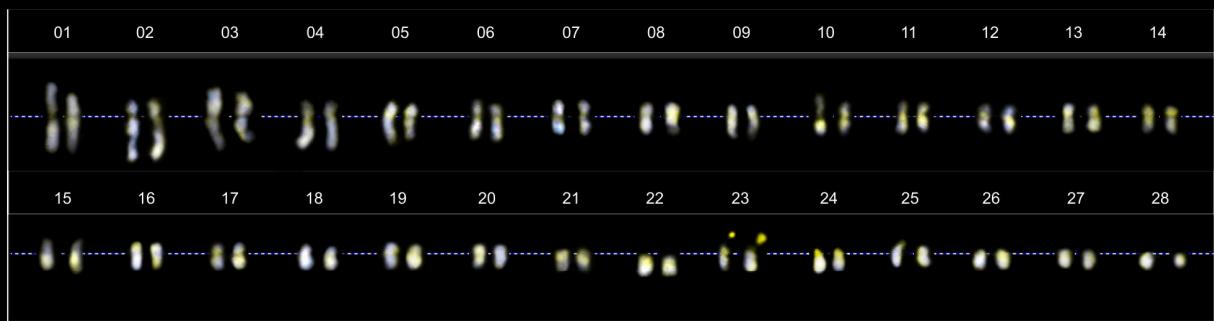


Figura 5 Células mitóticas de espécies simpátricas em uma população de Nova Friburgo, RJ: *Epidendrum xanthinum* com $2n = 28$ (a-c), *E. secundum* com $2n = 56$ (d-f), e possível híbrido com $2n = 42$ (g-i); coradas com CMA (a, d, g), DAPI (b, e, h) e imagens dos dois fluorocromos (c, f, i). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas CMA⁺/DAPI[−]. Insertos menores em c destacam cromossomos com bandas CMA⁺/DAPI[−] pericentroméricas adjacentes a bandas terminais CMA[−]/DAPI⁺, enquanto o inserto maior destaca banda DAPI⁺/CMA[−] intersticial. Inserto em i destaca cromossomos possivelmente herdados de *E. xanthinum*. A barra em i corresponde a 10µm.

A. *E. xanthinum* $2n = 28$



B. *E. secundum* $2n = 56$



C. Híbrido $2n = 42$

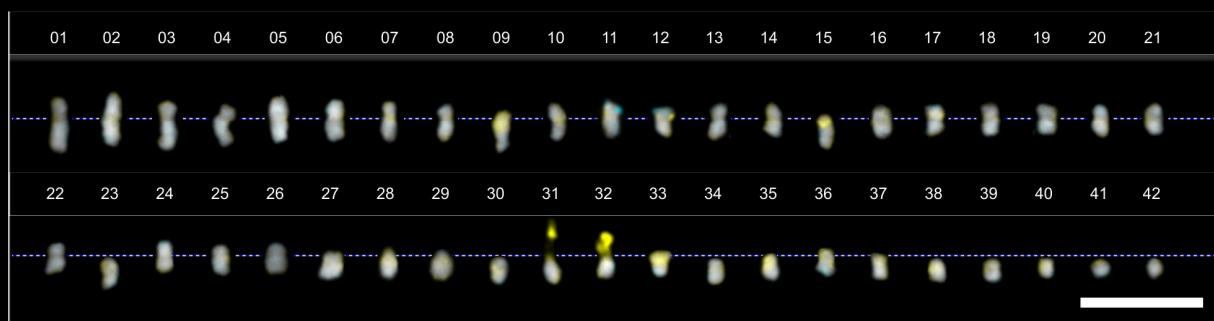


Figura 6 Cariogramas das espécies do gênero *Epidendrum* e do possível híbrido ocorrentes em simpatria em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. A. *E. xanthinum*; B. *E. secundum*; C. possível híbrido. Todos os cariogramas foram organizados por ordem decrescente de tamanho. A barra em C corresponde a 10 μ m. A linha pontilhada indica a posição do centrômero.

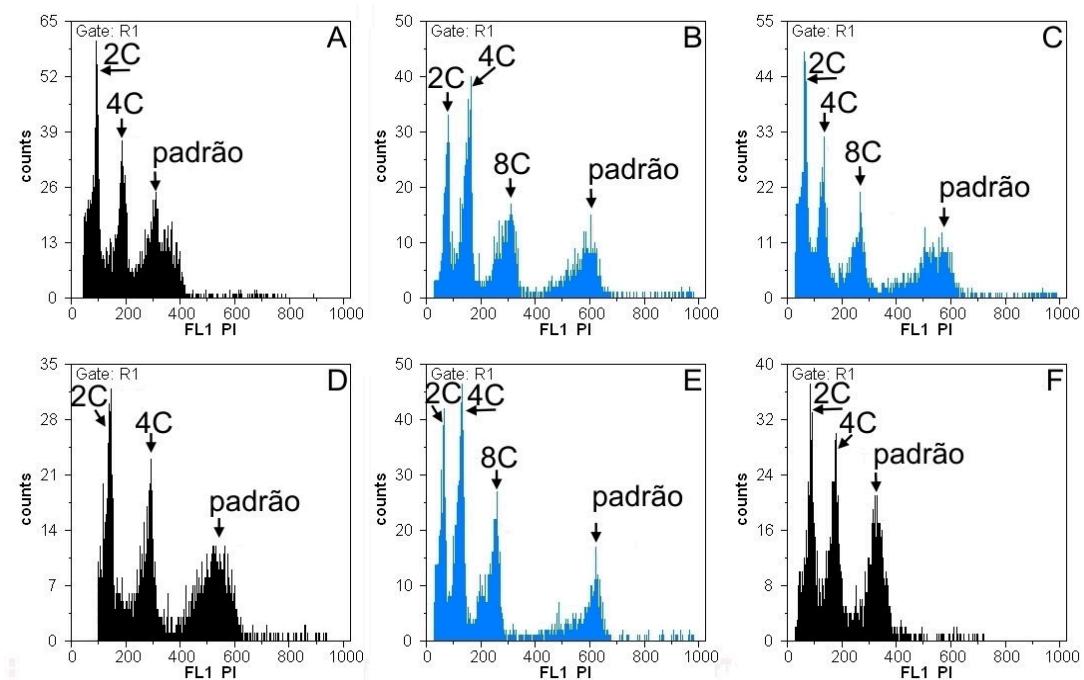


Figura 7 Histogramas citométricos de intensidade de fluorescência relativa, obtidos a partir de núcleos foliares corados com iodeto de propídio em representantes do gênero *Epidendrum*, oriundos de diferentes populações simpátricas: **A-C**: *E. flammeum*, *E. secundum* e possível híbrido, respectivamente (São João do Tigre, Paraíba); **D-F**: *E. xanthinum*, *E. secundum* e possível híbrido, respectivamente (Nova Friburgo, Rio de Janeiro). Foram utilizados como padrões internos espécimes de *Oxalis umbraticola* com $2C = 16,5$ pg (**A, D, F**) e *Tulbaghia simmleri* com $2C = 38,91$ pg (**B, C, E**): **A.** *E. flammeum* com $2C = 5,04$ pg, $4C = 9,90$ pg e $8C = 20,41$ pg; **B.** *E. secundum* com $2C = 4,82$ pg, $4C = 9,26$ pg e $8C = 19,38$ pg; **C.** possível híbrido entre *E. flammeum* x *E. secundum* com $2C = 4,63$ pg, $4C = 8,61$ pg e $8C = 18,26$ pg; **D.** *E. xanthinum* com $2C = 4,48$ pg e $4C = 9,10$ pg; **E.** *E. secundum* com $2C = 3,68$ pg, $4C = 7,61$ pg e $8C = 15,68$ pg; **F.** possível híbrido entre *E. xanthinum* x *E. secundum* com $2C = 4,37$ pg e $4C = 8,70$ pg.

A quantificação do DNA nuclear em *E. flammeum* revelou que esta espécie apresenta $2C = 5,04$ pg DNA, e dois ciclos de endoreduplicação completos referentes a $4C = 9,90$ pg DNA e $4C = 20,41$ pg DNA (Tabela 2; Figura 7A). Nessa mesma região foram analisados seis espécimes de *E. secundum* com $2n = 62$ (Figura 3d-f; Figura 4B). Alguns citótipos apresentaram dois cromossomos Bs, um deles $CMA^+/DAPI^-$ (Figura 3f, inserto superior) e o outro $CMA^0/DAPI^0$ (Figura 3d,e, cabeças de seta; f, inserto inferior). O tamanho cromossômico variou de $0,92$ μm a $3,75$ μm , com cariótipo ligeiramente bimodal, devido à presença de um par cromossômico maior (Figura 3f, setas brancas; Figura 4B). Foram visualizadas cinco bandas $CMA^+/DAPI^-$ terminais, quatro delas pequenas e uma banda heteromórfica maior (Figura 3f, setas amarelas; Tabela 3), além de 16 bandas terminais $CMA^-/DAPI^+$ (Figura 3f; Tabela 3; Figura 4B),

preferencialmente localizadas no braço curto de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A quantificação de DNA revelou três diferentes picos referentes à $2C = 4,82$ pg, $4C = 9,26$ pg e $8C = 19,38$ pg (Tabela 2; Figura 7B) relacionados à endoreduplicações. Indivíduos com morfologia floral intermediária da população de São do Tigre apresentaram $2n = 56$ (Figura 3g-i; Figura 4C), tamanho cromossômico variando de $1,51$ μm a $6,15$ μm (Tabela 2), cariótipo ligeiramente bimodal pela ocorrência de dois cromossomos maiores que os demais (Figura 3i, setas brancas; Figura 4C). Foram visualizadas nove bandas terminais $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ (Figura 3i; Tabela 3), quatro delas localizadas em cromossomos maiores e as demais em cromossomos medianos. Também foram visualizadas quatro pequenas bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ (Figura 3i, setas amarelas), duas delas formando pequenos satélites distendidos. A quantificação de DNA revelou a ocorrência de endoreduplicações somáticas, apresentando três picos com $2C = 4,63$ pg, $4C = 8,61$ pg e $8C = 18,26$ pg (Tabela 2; Figura 7C).

População de Nova Friburgo

A segunda zona de hibridação ocorre entre populações simpátricas de *E. xanthinum* e *E. secundum*, localizadas em Nova Friburgo (Rio de Janeiro). Foram analisados quatro espécimes de *Epidendrum xanthinum*, que apresentaram $2n = 28$ (Figura 5a-c; Figura 6A), cariótipo ligeiramente bimodal devido à presença de quatro cromossomos maiores (Figura 5c, setas brancas) e tamanho cromossômico variando de $2,36$ μm a $6,02$ μm (Tabela 2). Foram observadas duas grandes bandas terminais $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, duas outras proximais pequenas (Figura 5c, setas amarelas), além de algumas regiões $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^-$, e quatro bandas terminais $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ (Figura 5c; Tabela 3), duas das quais adjacentes a pequenas bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ (Figura 5c, insertos menores; Figura 6A) e uma região intersticial $\text{DAPI}^+/\text{CMA}^-$ no braço longo de um cromossomo grande (Figura 5c, inserto maior; Figura 6A). A quantificação de DNA revelou dois picos nos histogramas, referentes a $2C = 4,48$ pg e endoreduplicação com $4C = 9,10$ pg (Tabela 2; Figura 17D). Ainda nesta população foram analisados três espécimes de *E. secundum*, que apresentaram $2n = 56$ (Figura 5d-f; Figura 6B), com tamanho cromossômico variando de $1,38$ μm a $6,22$ μm (Tabela 2), oito bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, duas delas maiores correspondentes as RONs, formando satélites distendidos (Figura 5f, setas amarelas; Figura 6B). A quantificação de DNA revelou a ocorrência de três picos, referentes a $2C = 3,68$ pg, e endoreduplicações de $4C = 7,61$ pg

$e 8C = 15,68 \text{ pg}$ (Tabela 3; Figura 7E). Foram analisados quatro espécimes do provável híbrido proveniente da população de Nova Friburgo, que apresentaram $2n = 42$ (Figura 5g-i; Figura 6C), e tamanho cromossômico variando de $1,56 \mu\text{m}$ a $6,02 \mu\text{m}$ (Tabela 2) e cariótipo ligeiramente bimodal, devido à ocorrência de seis cromossomos maiores (Figura 5i, setas brancas; Figura 6C). Foram visualizadas quatro bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, duas das quais maiores e distendidas, além de uma região terminal menor $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, e uma pequena banda $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ proximal (Figura 5i, setas amarelas; Figura 6C). Foram visualizadas também duas bandas $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$, uma delas adjacente à pequena banda CMA^+ (Figura 5i, insertos; Figura 6C). Regiões mais coradas com CMA do que com DAPI foram visualizadas em 12 cromossomos, principalmente em acrocêntricos (Figura 5i; Figura 6C). A quantificação de DNA revelou a ocorrência de dois picos referentes a $2C = 4,37 \text{ pg}$ e endoreduplicação de $4C = 8,70 \text{ pg}$ (Tabela 2; Figura 7F).

DISCUSSÃO

Dados inéditos de coloração diferencial com fluorocromos base-específicos são apresentados no presente trabalho, incluindo contagem cromossômica inédita para *E. flammeum* com $2n = 50$, e uma nova contagem para *E. secundum* com $2n = 62$ (São João do Tigre, Paraíba). Além disso, dois híbridos foram cariologicamente analisados: O primeiro referente a uma zona de hibridação entre *E. flammeum* e *E. secundum* com $2n = 56$, e o segundo entre *E. xanthinum* e *E. secundum* com $2n = 42$. Foram confirmadas as contagens prévias de $2n = 56$ para *E. secundum* (Assis *et al.*, 2013) e $2n = 28$ para *E. xanthinum* (Blumenschein, 1960; Pinheiro *et al.*, 2009). Os seis táxons analisados referentes a duas zonas de hibridação apresentaram, além de diferentes números cromossômicos, diferentes conteúdos de DNA e distintos padrões de bandas CMA/DAPI.

A primeira zona de hibridação analisada ocorre em um inselbergue localizado no município de São João do Tigre (Paraíba), que apresenta altitude de 1.190 m, onde foram identificadas populações simpátricas de *E. flammeum* com $2n = 50$ ($2C = 5,04 \text{ pg}$) e *E. secundum* com $2n = 62$ ($2C = 4,82 \text{ pg}$), bem como indivíduos de morfologia floral intermediária entre ambas as espécies, com número cromossômico $2n = 56$ ($2C = 4,63 \text{ pg}$). Dados obtidos da análise morfométrica entre o suposto híbrido e seus possíveis parentais são compatíveis com a hipótese de sua possível origem híbrida. A

hibridação e introgressão em “complexos de espécies”, cujos caracteres morfológicos frequentemente se sobrepõem, obscurecem os limites morfológicos entre as espécies (Astholm & Nyman, 1994). A análise multivariada permite a identificação mais eficiente da natureza descontínua dos caracteres, proporcionando informações mais detalhadas da variação morfológica para o estabelecimento de decisões taxonômicas. Análises morfométricas realizadas em mais de 200 gêneros de plantas foram capazes de definir conjuntos discretos de indivíduos morfologicamente semelhantes em linhagens sexuais de plantas, apesar da ocorrência de hibridação e introgressão, corroborando a existência de “espécie” vegetal morfologicamente descontínua, anteriormente questionada por alguns botânicos (Rieseberg & Willis, 2007). A análise de componentes principais, bem como a orientação oposta dos agrupamentos formados (Figura 2), mostra claramente que *E. flammeum*, *E. secundum* e o possível híbrido apresentam caracteres descontínuos, confirmando se tratarem de entidades taxonômicas diferentes. Os mesmos critérios foram utilizados por outros autores, incluindo a comparação de sequências ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), através da análise de componentes principais, para verificar a descontinuidade entre as espécies, obtendo resultados semelhantes aos do presente trabalho, confirmando que *Scrophularia grayana* e *S. grayana* var. *grayanoides* são espécies distintas (Kamada *et al.*, 2007). O possível híbrido também apresentou definição clara da descontinuidade morfológica entre as espécies parentais, que apresentam orientação oposta em relação aos eixos do gráfico. Além disso, é possível verificar que o agrupamento dos indivíduos híbridos ocorre de forma intermediária, associado fortemente ao eixo y, próximo do ponto de origem do qual divergem as espécies parentais em relação ao eixo x, sem evidências de sobreposição entre as três entidades morfológicas, possivelmente por se tratarem de indivíduos híbridos da geração F1. Dados semelhantes foram obtidos por Pinheiro *et al.* (2007a) ao analisar a variabilidade morfológica em *E. secundum*. De fato, a ocorrência de uma morfologia intermediária constitui o exemplo clássico de hibridação interespecífica facilmente observável em híbridos da geração F1 (Mallet, 2007).

O padrão de distribuição de heterocromatina observada nos três táxons é bastante semelhante, e a única diferença apresentada refere-se ao número e tamanho das bandas heterocromáticas. Neste caso, apesar dos diferentes números cromossômicos observados entre os possíveis parentais, os valores de conteúdo de DNA, bem como o elevado número de cromossomos acrocêntricos observados em *E. secundum*, sugerem que as espécies parentais apresentam o mesmo nível de ploidia. Esta hipótese é

suportada tanto pela ocorrência de apenas dois cromossomos claramente maiores em ambas as espécies parentais, quanto pelo número fundamental observado em *E. flammeum* (NF = 83) e em *E. secundum* (NF = 92), muito próximos entre estas espécies, sugerindo que o elevado número cromossômico em *E. secundum* é consequência de disploidia do tipo fissão cêntrica, e não de um evento de poliploidia. Além disso, em *E. secundum*, verificou-se a ocorrência de cromossomos supranumerários em número variável, possivelmente oriundos de reorganizações intraespecíficas. Cromossomos Bs apresentam mecanismos de herança não-mendeliana e evolução distinta dos cromossomos A, e frequentemente são gerados a partir de mutações, elementos transponíveis ou outros reajustes que ocorrem no genoma A (Klemme *et al.*, 2013). O gênero *Epidendrum* apresenta altos níveis de compatibilidade reprodutiva, incluindo espécies com diferentes níveis de ploidia cromossômica ocorrentes em populações simpátricas, onde indivíduos de gerações F1 e F2 e fortes evidências de introgressão, confirmam o elevado potencial de fluxo gênico interespecífico do gênero (Pinheiro *et al.*, 2010, 2013).

No município de Nova Friburgo (Rio de Janeiro), é possível observar diversos indivíduos de *E. xanthinum*, *E. secundum* e os possíveis híbridos crescendo juntos, em um inselbergue denominado Macaé de Cima na Serra dos Órgãos, e algumas vezes nas encostas da serra, mas principalmente sobre rochas expostas, em locais mais iluminados, em uma altitude que varia de 800 m a 1200 m, provavelmente compartilhando os mesmos polinizadores, em virtude do grande número de plantas com morfologia intermediária que ocorrem nesta população (Pinheiro, comunicação pessoal). Esta zona de hibridação é particularmente intrigante por representar um caso extremo de diferenças cariológicas entre as espécies parentais que, em primeira instância, parecem apresentar níveis de ploidia diferentes. *E. xanthinum* com $2n = 28$ ($2C = 4,48$ pg) e *E. secundum* com $2n = 56$ ($2C = 3,68$ pg) apresentam conteúdos de DNA muito próximos. Os cromossomos de *E. xanthinum* apresentam-se maiores que os de *E. secundum* (com exceção de apenas oito cromossomos maiores), indicando fortemente que a disploidia exerce um importante papel na diversificação dos números cromossômicos em toda a linhagem que originou *E. secundum* (Assis *et al.*, em preparação). Além disso, análises filogenéticas baseadas na comparação de sequências plastidiais, revelaram que estas espécies, oriundas destas mesmas populações, são filogeneticamente muito próximas, indicando que *E. xanthinum* divergiu primeiro, posicionando-se como grupo irmão do clado que reúne todos os representantes de *E.*

secundum analisados nesta e em outras populações (Pinheiro *et al.*, 2009). Cariologicamente, os representantes analisados do possível híbrido apresentam diversos caracteres que corroboram sua origem híbrida a partir de *E. xanthinum* e *E. secundum*, inicialmente com número cromossômico $2n = 42$ e conteúdo de DNA intermediários entre os supostos parentais, além da presença de quatro bandas terminais CMA⁻/DAPI⁺ em homozigose no cariótipo de *E. xanthinum* e duas bandas terminais CMA⁻/DAPI⁺ no possível híbrido, uma vez que *E. secundum* nesta população não apresentou nenhuma banda DAPI⁺.

O gênero *Epidendrum*, especialmente os representantes que compõem o subgênero *Amphiglottium*, apresenta uma impressionante plasticidade fenotípica e genotípica, que favorece a ampla distribuição geográfica de suas espécies, bem como a ocorrência em diferentes biomas e diferentes altitudes, tornando o grupo um interessante modelo para estudos evolucionários (Pinheiro *et al.*, 2013). Além disso, a elevada compatibilidade reprodutiva permite o fluxo gênico interespecífico no gênero, sugerindo que a hibridação e a introgressão são importantes para os estágios iniciais de especiação, onde a composição genética dos híbridos é realçada por interações entre genes co-adaptados, oriundos das espécies parentais, que podem favorecer a adaptação dos híbridos através de algumas combinações gênicas (Rieseberg, 2001; Rieseberg & Willis, 2007).

O número cromossômico haploide ou diploide é algumas vezes indicado junto ao nível de ploidia, sendo útil quando se trata de espécies com diferentes números básicos, como por exemplo, na tribo Eupatorieae ($x_1 = 10$ e $x_2 = 25$), cujas espécies com o mesmo número diploide podem apresentar diferentes níveis de ploidia cromossômica, como $2n = 5x = 50$ em *Chromolaena laevigata* e $2n = 2x = 50$ em diversas espécies do gênero *Neomirandea* (revisado por Guerra, 2008). Contudo, com o advento das técnicas de quantificação de DNA nuclear, foram identificadas diversas contradições entre o número de cromossomos e o conteúdo de DNA em grupos de espécies filogeneticamente relacionadas, conduzindo a má interpretação dos níveis de ploidia de diversos táxons. Dessa forma, Suda *et al.* (2006) propuseram a distinção entre os termos “ploidia” em referência a números cromossômicos, e “ploidia de DNA” em referência ao conteúdo de DNA nuclear, para evitar inferências errôneas sobre a ploidia das espécies para as quais um dos dados (números cromossômicos ou conteúdo de DNA) não esteja disponível. As inferências apresentadas aqui se baseiam tanto na análise dos números cromossômicos, quanto do conteúdo de DNA nuclear. Todas as espécies

analisadas pertencem ao subgênero *Amphiglottium*. *E. xanthinum* e *E. secundum* pertencem a subseção *Tuberculata*, enquanto *E. flammeum* pertence ao clado Atlântico, ambos os clados são grupos irmãos (Pinheiro *et al.*, 2009). Estes dados corroboram que as diferenças nos números cromossômicos em *E. secundum* são principalmente originadas por fissões cêntricas, uma vez que todas as espécies apresentam o mesmo nível de ploidia de DNA, e portanto similaridade genética suficiente para possibilitar a hibridação interespecífica neste grupo. Barreiras incompletas de isolamento reprodutivo foram identificadas principalmente em espécies que divergiram recentemente ou que apresentam tempo mais longo de divergência, permitindo o fluxo gênico com outros grupos que são, por outro lado, espécies bem definidas (Rieseberg & Willis, 2007).

A partir do ponto de vista cariológico, foi possível observar diversas novas combinações cromossômicas nos indivíduos híbridos, especialmente relacionadas à distribuição e composição da heterocromatina constitutiva, e pela formação imediata de novos números cromossômicos. A partir destas novas combinações, a introgressão pode ser responsável pela origem de novas variantes genéticas nas populações parentais, possivelmente permitindo a dinâmica cromossômica observada em algumas espécies parentais, notavelmente em *E. secundum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) pelo suporte financeiro e bolsas de pesquisa. Ao Prof. Marcelo Guerra por disponibilizar o citômetro pertencente ao Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco para a quantificação do DNA nuclear.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M. 2007.** Karyotype differentiation among Spondias species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **155**: 541-547
- Assis FNM, Souza BCQ, Medeiros-Neto E, Pinheiro F, Silva AEB, Felix LP. 2013.** Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **172**: 329-344

Asthholm F, Yvonne N. 1994. Morphometric variation in the *Alonsoa meridionalis* complex (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **193**: 53-68

Blumenschein A. 1960. Números cromossômicos de algumas espécies de orquídeas. *Publicações científicas da Universidade de São Paulo*. **1**: 45-50

Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo), 69-89

Conceição LP, Oliveira ALPC, Barabosa LV. 2006. Characterization of the Species *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) occurring in Duanas do Abaeté – Salvador, Ba, Brasil. *Cytologia*. **71**: 125-129

Dressler RL. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American Orchid Society Bulletin*. **58**: 796-800

Dunsterville GCK. 1979. Orchids of Venezuela - *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin*. **48**: 447-454

Felix LP, Guerra M. 2010. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **163**: 234-278

Guerra M. 1986. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I. *Revista Brasileira de Genética*. **1**: 21-40

Guerra M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots II: Systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 127-136

Guerra M. 2005. What is new on plant cytogenetics? *Genetics and Molecular Biology*. **28**: 444-445

Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytobotany: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*. **120**: 339-350

Hágsater E. 1984. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: Tan KW, ed. *Proceedings of the Eleventh World Orchid Conference*. Miami, FL: 11th World Orchid Conference, 195-201

Hágsater E, Soto Arenas MA. 2005. *Epidendrum* L. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum*, Vol. 4. Oxford: Oxford University Press, 236-251

Kamada T, Yamashiro T, Maki M. 2007. Intraspecific morphological and genetic differentiation in *Scrophularia grayana* (Scrophulariaceae). *Journal of Plant Research*. **120**: 437-443

Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, Wicker T, Novák P, Houben A. 2013. High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *New Phytologist*. **199**: 550–558

Lenz LW, Wimber DE. 1959. Hybridization and inheritance in orchids. In: Withner CL, ed. *The orchids, a scientific survey*. Malabar: Krieger, 261-314

Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 Species. *Annals of Botany*. **100**: 875-888

Mallet J. 2007. Hybrid speciation. *Nature*. **446**: 279-283

Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research*. **15**: 115-121

Pansarin ER, Amaral MCE. 2007. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Pansarin ER, Amaral MCE. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Parmentier I, Stévert T, Hardy OJ. 2005. The inselberg flora of Atlantic Central Africa. I. Determinants of species assemblages. *Journal of Biogeography*. **32**: 685-696

Pinheiro F, Barros F. 2007a. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*. **25**: 129-136

Pinheiro F, Barros F. 2007b. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea*. **34**: 563-570

Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLF, Salatino A, Barros F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **283**: 165-177

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*. **19**: 3981-3994

Pinheiro F, Cozzolino S, Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*. **67**: 2024-2039

Porembski S, Barthlott W. 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology*. **151**: 19-28

Porembski S. 2002. Terrestrial habitat islands as model systems for biodiversity research. In: Araújo EL, Moura AN, Sampaio EVSB, Gestinari LMS, et al., eds. *Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Flora do Brasil*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 158-161

Rieseberg LH. 2001. Polyploid Evolution: Keeping the peace at genomic reunions. *Current Biology*. **11**: 925-928

Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science*. **317**: 910-914

Sarthou C, Larpinb D, Fontyc E, Pavoined S, Ponge JF. 2010. Stability of plant communities along a tropical inselberg ecotone in French Guiana (South America). *Flora*. **205**: 682-694

Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M. 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany*. **109**: 987-999

Suda J, Krahulcová A, Trávnícek P, Krahulec F. 2006. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*. **55**: 447-450

van der Pijl L, Dodson CH. 1966. Orchid flowers: their pollination and evolution. Fairchild Tropical Garden and the University of Miami Press, 214

Capítulo 3

Distribuição da Heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear em representantes do gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae: subgêneros *Amphiglottium* e *Epidendrum*)

Distribuição da Heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear em representantes do gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae: subgêneros *Amphiglottium* e *Epidendrum*)

Felipe Nollet Medeiros de Assis, Enoque Medeiros Neto, Luciana Ledra, Ana Emilia Barros e Silva e Leonardo Pessoa Felix

RESUMO *Epidendrum* é um dos maiores gêneros neotropicais de Orchidaceae, e apresenta aproximadamente 1.500 espécies. Apenas 2,8% de suas espécies foram estudadas citologicamente, apresentando números cromossômicos que variam de $n = 12$ em *E. fulgens* até $n = 120$ em *E. cinnabarinum*. A partir dos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva, bem como da variação no conteúdo de DNA nuclear em espécies pertencentes ao subgênero *Amphiglottium* e ao subgênero *Epidendrum*, objetivou-se inferir os níveis de ploidia e os possíveis mecanismos de evolução cariotípica que atuam na diversificação cariológica destes dois grupos. Foram identificadas em todas as espécies, regiões cromossômicas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ e $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^-$, e entre as bandas mais conspícuas, destacaram-se grandes blocos $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ ocupando os terminais dos braços longos de alguns cromossomos. O conteúdo de DNA variou de $2C = 3,23$ pg em *E. fulgens* até $2C = 20,21$ pg em *E. cinnabarinum*. Os tecidos foliares dos representantes analisados apresentaram um ciclo de endoreduplicação na maioria das espécies, e apenas *E. fulgens* apresentou dois ciclos de endoreduplicação. A diversificação cariológica em *Epidendrum* parece relacionada a eventos de disploidia e poliploidia. A alteração no número fundamental entre as espécies pode ser o resultado de reorganizações intra e intergenômicas complexas, incluindo translocações, eliminação de sequências de DNA e amplificação ou redução de elementos repetitivos, corroborada pela ocorrência de cromossomos Bs em alguns representantes. O gênero *Epidendrum* constitui-se em um interessante modelo para estudos de evolução cariotípica em Orchidaceae, cuja complexidade cariológica adiciona novos desafios para o entendimento de suas relações filogenéticas.

Palavras-chave: Cromossomos B, Disploidia, Endoreduplicação, Fissão cêntrica, Heterocromatina, Poliploidia, Tamanho do genoma.

Heterochromatin distribution and nuclear DNA content in the genus *Epidendrum* L. (Orchidaceae: subgenera *Amphiglottium* and *Epidendrum*)

ABSTRACT *Epidendrum* is one of the largest Neotropical genera of Orchidaceae and comprises approximately 1,500 species. Only 2.8% of these species have been studied cytologically, demonstrating chromosome numbers ranging from $n = 12$ in *E. fulgens* to $n = 120$ in *E. cinnabarinum*. From the analyses of the distribution pattern of constitutive heterochromatin, as well as the variation in nuclear DNA content in species of the subgenus *Amphiglottium* and the subgenus *Epidendrum*, we aimed to infer ploidy levels and the possible mechanisms of karyotype evolution involved in the karyotype diversification in these two groups. CMA⁺/DAPI[−] and CMA⁰/DAPI[−] chromosome regions were identified in all species, and among the most conspicuous bands stood out large CMA[−]/DAPI⁺ blocks on terminal regions of the long arms of some chromosomes. The DNA content ranged from 2C = 3.23 pg in *E. fulgens* to 2C = 20.21 pg in *E. cinnabarinum*. The leaf tissues of the analyzed representatives presented one endoreduplication cycle in most species, only *E. fulgens* presented two endoreduplication cycles. Karyological diversification in *Epidendrum* seems to be related to dispoloidy and polyploidy events. Changes in the fundamental number between species may be the result of complex rearrangements intra and intergenomic, including translocations, deletions of DNA sequences and amplification or reduction of repetitive elements, as confirmed by the occurrence of B chromosomes in some representatives. The genus *Epidendrum* is an interesting model for karyotype evolution studies in Orchidaceae, whose cytologic complexity adds new challenges to understanding their phylogenetic relationships.

Keywords: B chromosomes, Centric fission, Dispoloidy, Endoreduplication, Genome size, Heterochromatin, Polyploidy.

INTRODUÇÃO

Epidendrum L. é provavelmente o maior gênero neotropical de orquídeas, com cerca de 1.500 espécies (Chase *et al.*, 2003; Pinheiro & Barros, 2007). A classificação infragenérica do gênero baseia-se unicamente em caracteres morfológicos florais, e dessa forma, *Epidendrum* foi subdividido em quatro subgêneros: *Epidendrum*, *Spathium*, *Amphiglottium*, e *Strobilifera* (Lindley, 1852, 1859; Cogniaux, 1898, 1902; Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Dressler, 1984), dos quais apenas o subgênero *Amphiglottium* foi analisado a partir de uma abordagem filogenética (Pinheiro *et al.*, 2009). Para alguns subgêneros, até mesmo os limites interespecíficos são difíceis de determinar. O gênero apresenta ampla variabilidade morfológica inter e intraespecífica (Pabst & Dungs, 1975; Hágster, 1984; Pinheiro & Barros, 2005, 2007) e um grande número de características plesiomórficas em relação a outros gêneros da subfamília Epidendroideae, que dificultam o estabelecimento de uma delimitação infragenérica que reflita sua filogenia (Pinheiro *et al.*, 2009), bem como o estabelecimento seguro de seu número cromossômico básico e dos níveis de ploidia dos representantes atuais.

As técnicas de bandeamento cromossômico têm sido bastante utilizadas em análises citogenéticas e citotaxonômicas de eucariontes, incluindo as fanerógamas (D'emerico *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2007; Koehler *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2012). Dentre os corantes utilizados nas técnicas de bandeamento, os fluorocromos CMA (cromomicina A3) e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol.2HCl), são os mais amplamente empregados em citogenética de plantas. O princípio da técnica baseia-se na ligação diferencial dos fluorocromos ao DNA. O DAPI apresenta ligação preferencial a regiões ricas em AT, com pelo menos quatro pares de bases repetidas em tandem no sulco estreito do DNA, através da formação de pontes de hidrogênio e outras interações eletrostáticas, que especificamente aumenta a fluorescência do DAPI nestas condições (Manzini *et al.*, 1985). Por outro lado, o CMA apresenta um sítio específico de ligação a sequências de DNA ricas em GC nas regiões com quatro pares de bases, onde a ligação não intercalar ocorre também no sulco estreito (Baguley, 1982). A coloração simultânea com ambos os fluorocromos tem permitido caracterizar regiões heterocromáticas em plantas (Guerra, 1993; Guerra *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2007; Barros e Silva & Guerra, 2009; Feitosa *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2012), revelando um número variável de regiões cromossômicas mais brilhantes

ou positivas (+), ausentes ou negativas (−), ou neutras (0) (Schweizer, 1981). O bandeamento resultante fornece um conjunto de informações que permite uma caracterização mais eficiente do cariotípico quando comparada à coloração convencional com Giemsa, ou ao bandeamento C, este último geralmente utilizado para detectar regiões heterocromáticas, porém sem especificar sua composição (Guerra, 2000).

A quantificação do genoma nuclear apresenta aplicação em diversos campos de interesse, tais como para a biologia celular, ecologia, filogeografia e sistemática (Jones *et al.*, 1998; Suda *et al.*, 2006). Esses dados, quando associados às análises citogenéticas, fornecem informações mais consistentes sobre a variação cromossômica numérica, níveis de ploidia e mecanismos de evolução cariotípica que atuam em um determinado grupo vegetal (Suda *et al.*, 2006). A técnica consiste na homogeneização dos tecidos vegetais em um tampão, que facilita o isolamento de núcleos intactos, livres de aderência aos resíduos citoplasmáticos, mantendo a estabilidade nuclear em suspensões líquidas, prevenindo a sua agregação, bem como a degradação do DNA nuclear, propiciando um ambiente apropriado para a coloração específica e estequiométrica do DNA nuclear (Galbraith *et al.*, 1983; Loureiro *et al.*, 2007). A suspensão de núcleos é corada com um fluorocromo, geralmente o iodeto de propídeo, que se liga ao DNA sem preferência base-específica, possibilitando, a partir da fluorescência emitida, a quantificação do conteúdo de DNA.

Apenas 2,8% das espécies em *Epidendrum* foram estudadas citologicamente, e esta caracterização é representada exclusivamente por contagens cromossômicas (Assis *et al.*, 2013), que demonstraram a ocorrência de diferentes números cromossômicos entre espécies estreitamente relacionadas e entre populações de uma mesma espécie. A maior variação cromossômica numérica em *Epidendrum* foi observada entre os representantes do subgênero *Amphiglottium*, cujos números cromossômicos variam de $2n = 24$ em *E. fulgens* até $2n = 240$ em *E. cinnabarinum* (Guerra, 2000; Conceição *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2009; Felix & Guerra, 2010; Assis *et al.*, 2013). O alto grau de polimorfismos é especialmente elevado em alguns grupos sul-americanos pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*, como por exemplo, *Epidendrum secundum*, que também apresenta elevada variação cromossômica numérica (Pinheiro & Barros, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2013). Contudo, até o presente momento, apenas *E. obliquum Schltr.* (como *E. steinbachii*, $1C = 1.49$ pg DNA) apresenta registro de quantificação do genoma (Plant DNA C-values Database — <http://data.kew.org/cvalues/>) (Jones *et al.*, 1998), o que dificulta a compreensão de importantes aspectos da evolução cariológica

no gênero como um todo. Registros de bandeamento com fluorocromos em *Epidendrum* também são escassos, e pouco se conhece a respeito dos padrões de distribuição da heterocromatina no gênero, dentre muitos outros aspectos de suas relações filogenéticas que permanecem obscurecidos. Para o gênero *Epidendrum*, dados de quantificação do genoma e bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI possibilitaram identificar que a variação cromossômica numérica em diferentes populações de *E. secundum* está principalmente relacionada a eventos recorrentes de disploidia e poliploidia, bem como foram úteis na identificação de homologias entre os genomas de híbridos interespecíficos e seus respectivos parentais (Assis *et al.*, em preparação).

No presente trabalho foram estudadas citologicamente, através da técnica de coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, oito espécies pertencentes aos subgêneros *Amphiglottium* e *Epidendrum* (*sensu* Brieger, 1976, 1977). Além disso, foi estimado o conteúdo de DNA nuclear para sete espécies também pertencentes a estes dois subgêneros. A partir destes dados, bem como dos registros disponíveis na literatura, objetivou-se inferir os níveis de ploidia e os possíveis mecanismos de evolução cariotípica que atuam na diversificação cariológica destes dois grupos, a partir da análise filogenética proposta por Pinheiro *et al.* (2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico

Foram analisadas 11 espécies do gênero *Epidendrum*, pertencentes ao subgênero *Epidendrum* e ao subgênero *Amphiglottium*. As espécies foram obtidas através de coletas no campo e posteriormente mantidas em cultivo no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba – Campus II. As exsicatas foram depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, coletaram-se pontas de raízes jovens imediatamente submetidas à pré-tratamento com 8-HQ (8-hidroxiquinoleína) por 24 horas a 4°C, e

posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por 3 horas a temperatura ambiente e estocadas em freezer a -20°C . As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos e digeridas a 37°C por 30 minutos em solução contendo 2% de celulase (Onozuka) – e 20% de pectinase (Sigma, Saint Louis, MO) (w/v). O meristema de cada raiz individual foi fragmentado sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45%, coberto com uma lamínula e esmagado, sendo a lamínula posteriormente removida após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente.

Coloração com Fluorocromos Cromomicina A₃ e 4', -6-diamidinino-2-fenilindol (CMA/DAPI)

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com CMA₃ (0.5 mg/ml) durante uma hora, lavadas em água destilada, secas ao ar, coradas com DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 30 minutos, lavadas novamente, posteriormente secas, e montadas em glicerol e tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). As melhores metáfases foram capturadas com uma vídeo-câmera Cohu usando o software Leica QFISH®.

Quantificação do DNA nuclear

Para a quantificação do DNA, uma suspensão de núcleos oriunda de folhas jovens foi preparada como descrito por Loureiro *et al.* (2007) com 1.500 μL de tampão WPB (Woody Plant Buffer), 1g de tecido foliar da amostra e do padrão macerados juntos, cuja suspensão foi filtrada em uma malha de 30 μm e posteriormente corada com 25 μL de iodeto de propídeo. O tamanho do genoma foi estimado através de um citômetro de fluxo CyFlow® SL (Partec, Görlitz, Germany). O conteúdo de DNA final para cada acesso foi calculado com base em pelo menos três diferentes medições realizadas em três dias distintos para cada planta individualmente, com três repetições. Foram realizados testes preliminares para a escolha do controle interno, utilizando folhas jovens de *Oxalis ubraticola* com $2\text{C} = 16,5$ pg DNA e *Tulbaghia smilerii* com $2\text{C} = 38,91$ pg DNA. Para o processamento dos dados utilizou-se o software FloMax®.

Análises e medidas cromossômicas

Para cada espécie, três metáfases com morfologia cromossômica clara foram medidas utilizando-se o software ImageTool® versão 3.0. A relação entre os braços cromossômicos (comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) foi utilizada para classificar os cromossomos como metacêntricos (1 – 1,4), submetacêntrico (1,5 – 2,9), ou acrocêntricos ($\geq 3,0$), de acordo com Guerra (1986).

RESULTADOS

A lista das espécies analisadas, seus respectivos locais de coleta, números cromossômicos, fórmulas cariotípicas, números fundamentais e conteúdo de DNA nuclear encontram-se sumarizados na Tabela 1. Os números cromossômicos variaram de $2n = 24$ em *E. fulgens* e *E. radicans* até $2n = 224$ em *E. cinnabarinum*, enquanto o tamanho dos cromossomos variou desde 1,28 μm até 7,09 μm em *E. cinnabarinum*. Os cariotípos de todas as espécies apresentaram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. Foram identificadas em todas as espécies regiões cromossômicas CMA $^+$ /DAPI $^-$ e CMA 0 /DAPI $^-$, estas últimas sem formar bandas claramente visualizáveis. Entre as bandas mais conspícuas, destacaram-se grandes blocos CMA $^-$ /DAPI $^+$ ocupando os terminais dos braços longos de alguns cromossomos. A citometria de fluxo indicou que a primeira população de núcleos referente ao pico 1 (Figura 6) é representativa para o tamanho do genoma holoploide equivalente a 2C DNA. O conteúdo de DNA variou de 2C = 3,23 pg em *E. fulgens* até 2C = 20,21 pg em *E. cinnabarinum*. Os tecidos foliares dos representantes analisados apresentaram um ciclo de endoreduplicação na maioria das espécies, e apenas *E. fulgens* apresentou dois ciclos de endoreduplicação (Figura 6; Tabela 1). Em todos os espécimes analisados, esta endoreduplicação foi compatível, e cada pico subsequente apresentou o dobro da quantidade de DNA em relação ao valor 2C.

Análises cromossômicas e conteúdo de DNA nuclear

O primeiro grupo analisado no presente trabalho consta de quatro espécies pertences ao subgênero *Amphiglottium*. *Epidendrum cinnabarinum* apresentou cariótipos com $2n = 224$ cromossomos (Figura 1a-c), e ocorrência de 19 cromossomos maiores que os demais (Figura 1c, setas brancas). O tamanho dos cromossomos variou de 1,28 μm até 7,09 μm (Tabela 1). A dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelou a ocorrência de bandas heterocromáticas terminais CMA $^-$ /DAPI $^+$ em 14 cromossomos, algumas delas localizadas nos cromossomos maiores. Bandas CMA $^+$ /DAPI $^-$ foram visualizadas nas regiões terminais de quatro cromossomos (Figura 1c), das quais duas são bastante conspícuas e heteromórficas, e se estendem até a região proximal, enquanto as outras duas são menores e restritas apenas as regiões terminais (Figura 1c, setas amarelas). Além disso, verificou-se um cromossomo B de condensação tardia inteiramente CMA $^+$ /DAPI $^-$ próximo a um cromossomo metacêntrico (Figura 1c, cabeça de seta amarela). Regiões terminais de alguns cromossomos, bem como as regiões pericentroméricas apresentaram-se CMA 0 /DAPI $^-$. A quantificação do DNA nuclear para *E. cinnabarinum* revelou que esta espécie apresenta $2C = 20,21$ pg DNA, e um ciclo de endoreduplicação somática referente a $4C = 49,70$ pg DNA (Tabela 1; Figura 6A).

Epidendrum denticulatum apresentou cariótipos com $2n = 38$ cromossomos (Figura 2a-c), com cariótipo ligeiramente bimodal em virtude da ocorrência de dois cromossomos maiores que os demais (Figura 2c, setas brancas). Os cromossomos variaram de 1,30 μm até 4,08 μm (Tabela 1). Foram visualizadas duas bandas terminais CMA $^+$ /DAPI $^-$ (Figura 2c, setas amarelas) provavelmente correspondentes as RONs. Bandas terminais CMA $^-$ /DAPI $^+$ foram observadas em oito cromossomos (Figura 2c). Regiões pericentroméricas apresentaram-se predominantemente CMA 0 /DAPI $^-$, e apenas um cromossomo submetacêntrico apresentou o braço curto inteiramente CMA 0 (Figura 2c). A quantificação do DNA nuclear para *E. denticulatum* apresentou valores de $2C = 4,06$ pg DNA, além de um ciclo de endoreduplicação completa referente a $4C = 8,10$ pg DNA (Tabela 1; Figura 6B).

Epidendrum fulgens apresentou $2n = 24$ cromossomos (Figura 2d-f), com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos que variaram de 1,54 μm até 4,92 μm (Tabela 1). Os cariótipos apresentaram-se ligeiramente bimodais devido à presença de um par cromossômico maior (Figura 2f, setas brancas). Foram visualizadas duas bandas CMA $^+$ /DAPI $^-$ terminais distendidas (Figura 2f, setas amarelas), provavelmente correspondentes as RONs, além de cinco bandas terminais

CMA⁻/DAPI⁺ em cromossomos metacêntricos, sendo três maiores, e duas menores (Figura 2f, insertos). As regiões terminais dos quatro cromossomos acrocêntricos, bem como as regiões pericentroméricas dos demais cromossomos apresentaram-se CMA⁰/DAPI⁻ (Figura 2f). Esta espécie apresentou $2C = 3,23$ pg DNA, bem como dois ciclos de endoreduplicação somática referentes a $4C = 6,59$ pg DNA e $8C = 12,47$ pg DNA (Tabela 1; Figura 6C).

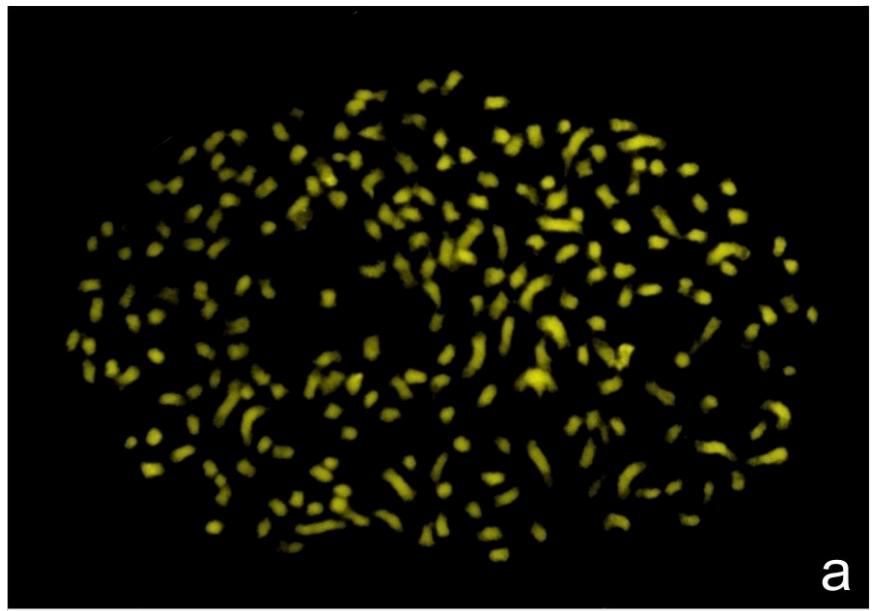
Epidendrum radicans apresentou $2n = 24$ cromossomos (Figura 2g-i), com cariótipo bimodal em virtude da ocorrência de um par cromossômico maior (Figura 2i, setas brancas). O tamanho dos cromossomos variou de $2,45$ μm até $6,96$ μm (Tabela 1). Este citótipo também apresentou duas bandas pequenas CMA⁺/DAPI⁻ nos terminais de dois cromossomos acrocêntricos (Figura 2i, setas amarelas), provavelmente correspondentes as RONs. Pequenas bandas terminais CMA⁻/DAPI⁺ inconsíprias foram visualizadas em quatro cromossomos metacêntricos (Figura 2i, insertos), enquanto as regiões pericentroméricas foram CMA⁰/DAPI⁻.

O segundo grupo analisado é composto por quatro espécies pertencentes ao subgênero *Epidendrum*. *E. ciliare* apresentou $2n = 40$ cromossomos (Figura 3a-c), que variaram de $1,46$ μm até $2,44$ μm (Tabela 1). Este citótipo apresentou oito bandas CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 3c, setas amarelas), quatro destas em regiões pericentroméricas de cromossomos metacêntricos, enquanto as outras quatro ocorrem em regiões terminais de cromossomos acrocêntricos. Regiões terminais e pericentroméricas CMA⁰/DAPI⁻ foram observadas em diversos cromossomos, uma das quais se estende por todo o braço longo de um cromossomo submetacêntrico (Figura 3c). Não foram visualizadas bandas DAPI⁺ em nenhum citótipo desta espécie. Foram analisadas duas populações de *Epidendrum nocturnum* (Figura 4). Os representantes ocorrentes na primeira população apresentaram cariótipos com $2n = 40$ cromossomos (Figura 4a-c), que variaram de $1,64$ μm até $4,36$ μm (Tabela 1). Este citótipo apresentou um padrão de bandas CMA/DAPI com três regiões pericentroméricas CMA⁻/DAPI⁺ (Figura 4c, setas azuis), regiões terminais CMA⁻/DAPI⁺ em sete cromossomos acrocêntricos (Figura 4c, cabeças de setas azuis), além de regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 4c, cabeças de setas amarelas), uma das quais maior que as demais (Figura 4c, seta amarela). Discretas regiões terminais e pericentroméricas CMA⁰/DAPI⁻ foram observadas em alguns cromossomos. A quantificação de DNA nuclear para estes espécimes apresentou valores referentes a $2C = 3,37$ pg, bem como um ciclo de endoreduplicação completo equivalente a $4C = 6,80$ pg (Tabela 1; Figura 6E).

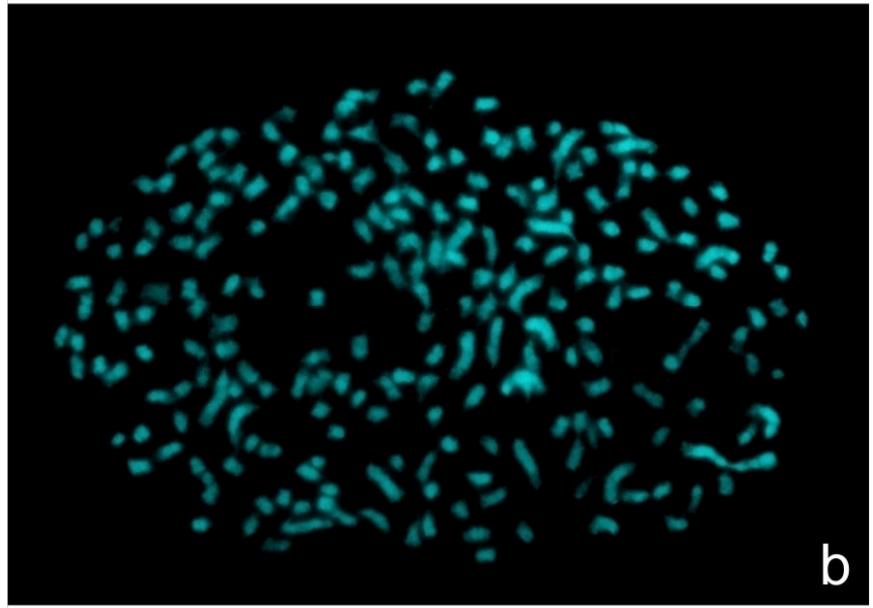
Tabela 1 Dados citogenéticos e de conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Epidendrum*, com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (**2n**), fórmula cariotípica (**FC**), número fundamental (**NF**), variação no tamanho cromossômico, tamanho do genoma em picogramas, contagens prévias. Os dados destacados em negrito referem-se ao presente trabalho (**PT**), enquanto os demais se referem aos dados disponíveis na literatura.

Subgênero/Espécie	Coletor	Local de Coleta*	2n	FC	NF	Tamanho cromossômico (μm)	Tamanho do genoma (pg) e desvio padrão			Referências**						
							2C	4C	8C							
Subgênero																
<i>Amphiglottium</i>																
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm.	E.M.Almeida, 758	Fagundes, PB	224	126 MT + 96 SM + 02 AC	446	1,28 – 7,09	20,21 (±0,15)	49,70 (±2,10)	-	PT						
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	Não documentado	Cultivado	38	28 MT + 06 SM + 04 AC	72	1,30 – 4,08	4,06 (±0,12)	8,10 (±1,33)	-	Assis <i>et al.</i> , (2013); PT						
<i>E. flammeum</i>	S.Nascimento, 93	São João do Tigre, PB	50	36 MT + 09 SM + 05 AC	95	1,76 – 4,75	5,04	9,90	20,41	Assis, em preparação						
<i>E. fulgens</i> Brongn.	L.P.Felix, 12515	Panelas, PE	24	16 MT + 04 SM + 04 AC	44	1,54 – 4,92	3,23 (±0,78)	6,59 (±1,25)	12,47 (±0,28)	PT						
<i>E. radicans</i> Pav. ex Lindl.	Não documentado	Cultivado	24	14 MT + 06 SM + 04 AC	44	2,45 – 6,96	-	-	-	PT						
<i>E. secundum</i> Jacq.	Diversos	Diversos	28, 50, 56, 58, 62, 68		-	0,73 – 7,10	4,08 (±0,39)	8,19 (±0,48)	16,76 (±1,95)	Assis, em preparação						
<i>E. secundum</i>	L.P.Felix, 12088	Camocim de São Félix, PE	84	Variável	-	1,01 – 4,45	8,24 (±0,48)	15,08 (±0,22)	-	Assis, em preparação						
	E.M.Almeida, 757	Fagundes, PB	90													
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	IBT 17671	Nova Friburgo, RJ	28	16 MT + 08 SM + 04 AC	52	2,36 – 6,02	4,48 (±0,08)	9,10 (±0,32)	-	Assis, em preparação						
Subgênero																
<i>Epidendrum</i>																
<i>E. ciliare</i> L.	Não documentado	Maranguape, CE	40	22 MT + 14 SM + 04 AC	76	1,46 – 2,44	-	-	-	PT						
<i>E. latilabre</i> Lindl.	L.P.Felix, 12095	Taquaritinga do Norte, PE	40	24 MT + 10 SM + 06 AC	74	1,53 – 2,57	4,33 (±0,05)	8,76 (±0,03)	-	Assis <i>et al.</i> , (2013); PT						
<i>E. nocturnum</i> Jacq.	L.P.Felix,	Belém do	40	19 MT + 19 SM +	78	1,64 – 4,36	3,37	6,80	-	PT						

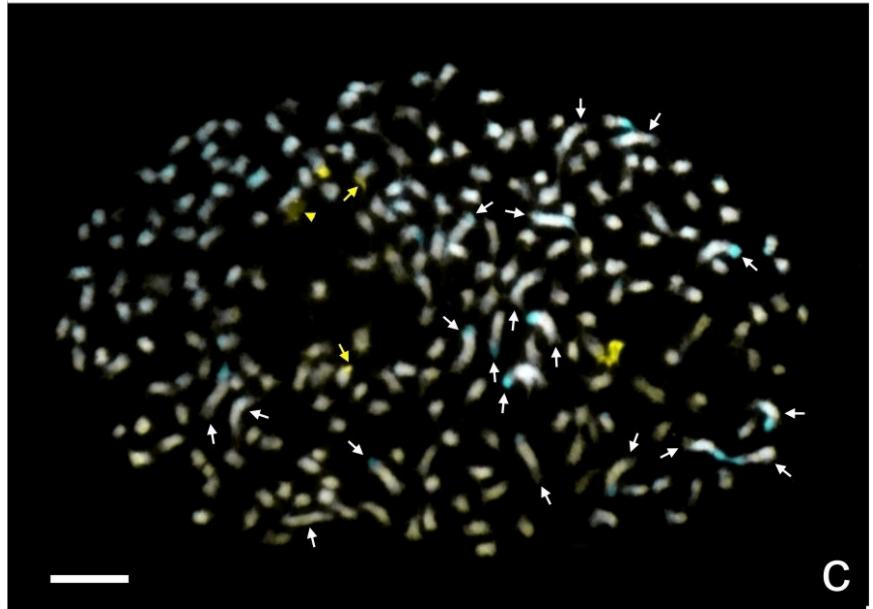
	9177	Pará, PA		02 AC			(±0,04)	(±0,09)	
			60	34 MT + 08 SM + 18 AC	102	1,53 – 3,69	-	-	PT
<i>E. paniculatum</i> Ruiz & Pav.	L.P.Felix, 12096	Alto Paraíso, GO	40	28 MT + 06 SM + 06 AC	74	1,43 – 2,45	3,41 (±0,07)	6,93 (±0,12)	-
<i>E. pseudodiforme</i> Jacq.	L.P.Felix, 12094	Areia, PB	40	32 MT + 02 SM + 06 AC	74	1,58 – 2,90	3,94 (±0,39)	8,26 (±0,64)	PT
<i>E. obliquum</i> Schltr. (como <i>E. steinbachii</i>)						2,98 (±0,11)			Jones <i>et al.</i> , 1998
<i>E. viviparum</i> Lindl.	Não documentado	Cultivado	40	28 MT + 08 SM + 04 AC	76	2,16 – 4,00	-	-	PT



a



b



c

Figura 1 Célula mitótica de *Epidendrum cinnabarinum* com $2n = 224$ (a-c). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas terminais CMA⁺/DAPI, e cabeça de seta indica cromossomo B de condensação tardia. A barra em c corresponde a 10μm.

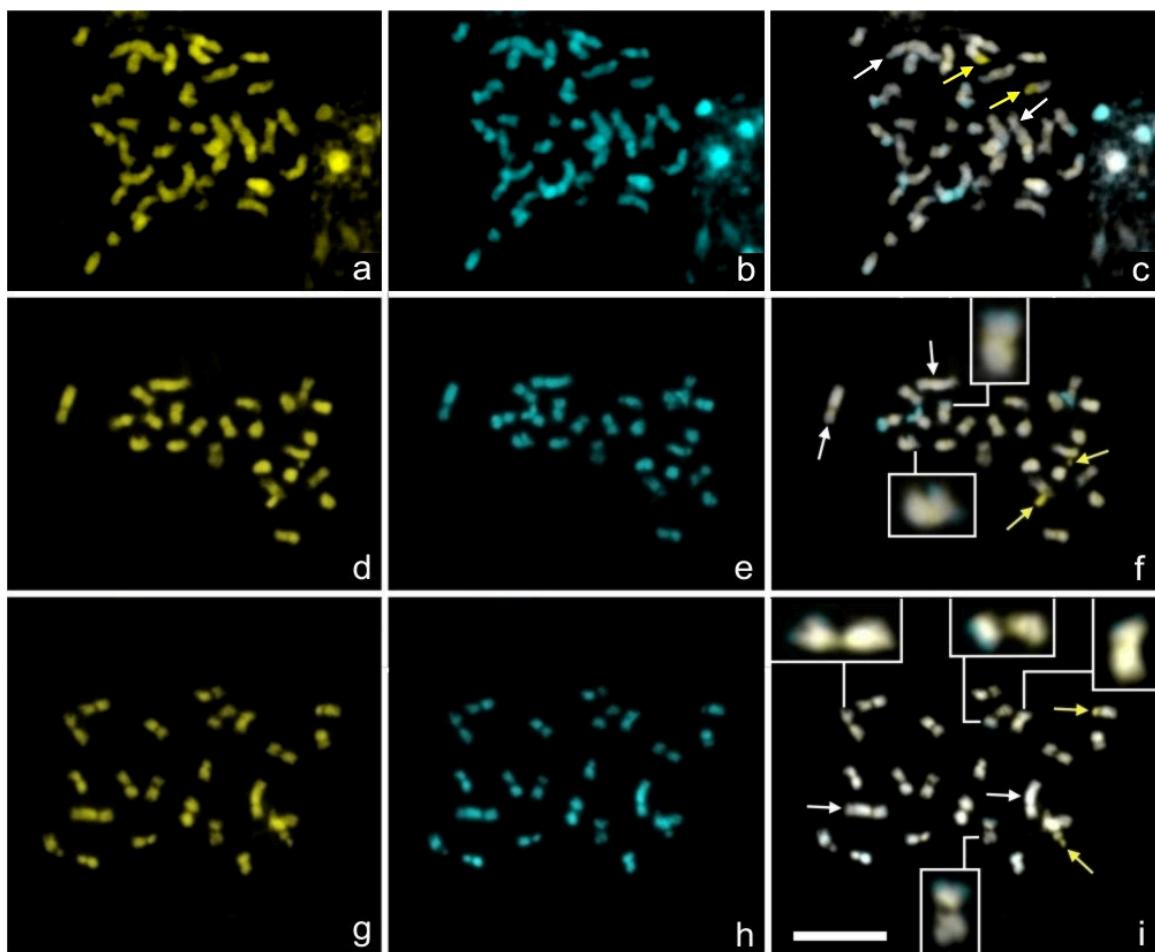


Figura 2 Células mitóticas de *E. denticulatum* com $2n = 38$ (a-c), *Epidendrum fulgens* com $2n = 24$ (d-f) e *E. radicans* com $2n = 24$ (g-i), coradas com CMA (a, d, g), DAPI (b, e, h) e imagens dos dois fluorocromos (c, f, i). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas indicam bandas terminais $CMA^+/DAPI^-$. Insertos destacam cromossomos com bandas terminais $DAPI^+/CMA^-$ discretas. A barra em i corresponde a $10\mu m$.

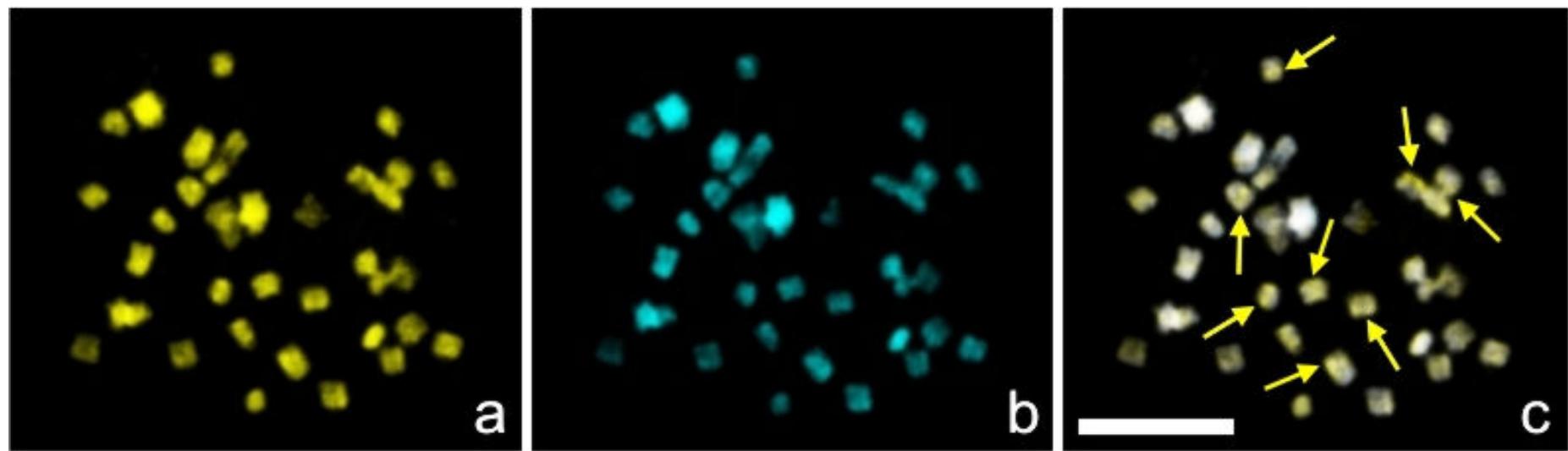


Figura 3 Célula mitótica de *E. ciliare* com $2n = 40$ (a-c), coradas com CMA (a), DAPI (b) e imagens dos dois fluorocromos (c). Setas amarelas indicam bandas CMA⁺/DAPI⁻. A barra em c corresponde a 10 μm .

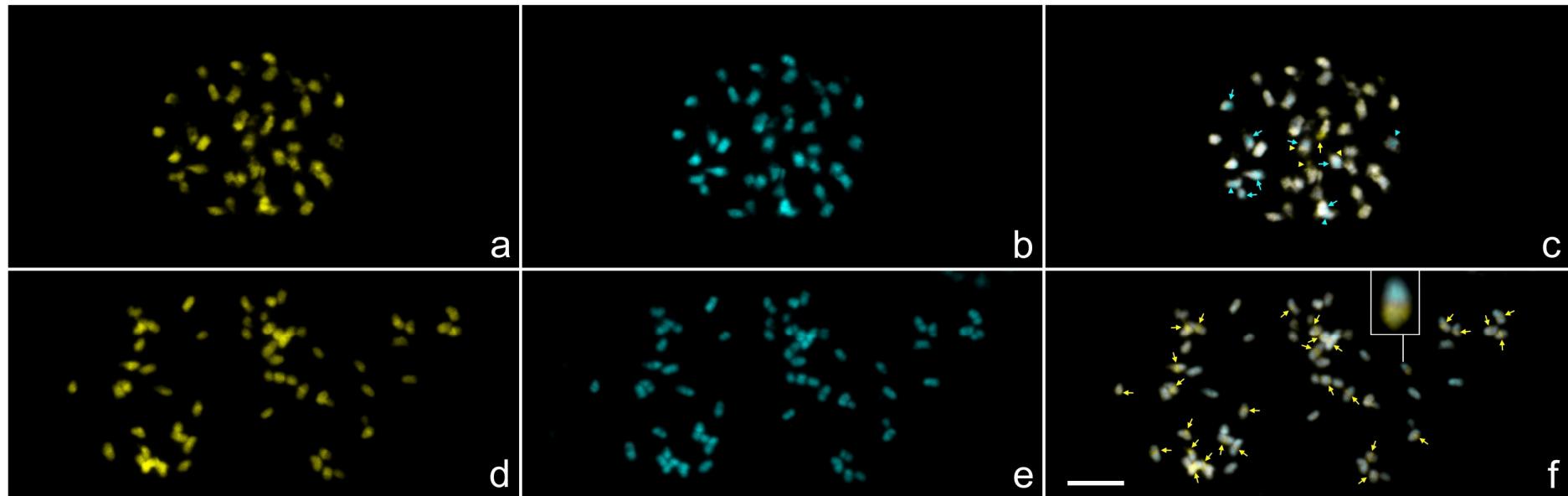


Figura 4 Células mitóticas de *Epidendrum nocturnum* com $2n = 40$ (a-c) e $2n = 60$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e imagens dos dois fluorocromos (c, f). Setas amarelas indicam regiões pericentroméricas CMA $^+$ /DAPI $^-$. Cabeças de setas amarelas indicam regiões terminais CMA $^+$ /DAPI $^-$. Setas azuis em c indicam regiões pericentroméricas CMA $^-$ /DAPI $^+$, enquanto cabeças de setas azuis indicam regiões terminais CMA $^-$ /DAPI $^+$. Inserço em f destaca cromossomo com braço curto completamente DAPI $^+$ /CMA $^-$ e braço longo CMA 0 /DAPI $^-$. A barra em f corresponde a 10 μ m.

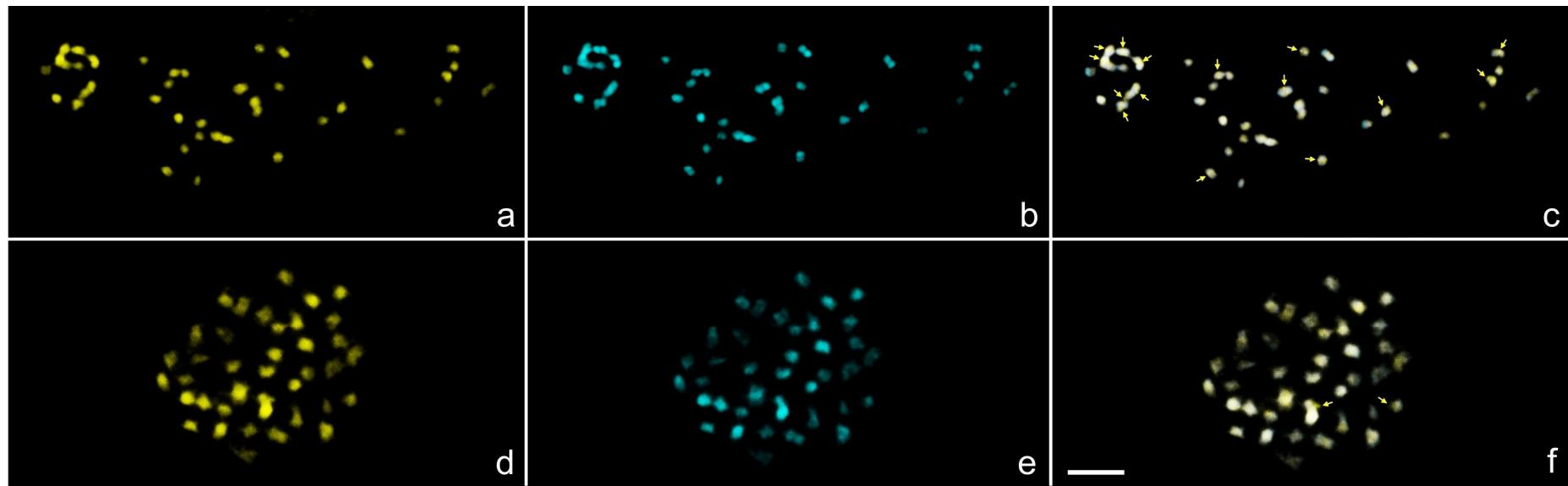


Figura 5 Células mitóticas de *Epidendrum pseudodifforme* com $2n = 40$ (a-c) e *E. viviparum* com $2n = 40$ (d-f), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e imagens dos dois fluorocromos (c, f). Setas amarelas indicam regiões pericentroméricas CMA $^{+}$ /DAPI $^{-}$. Cabeças de setas amarelas indicam regiões terminais CMA $^{+}$ /DAPI $^{-}$. A barra em f corresponde a 10 μ m.

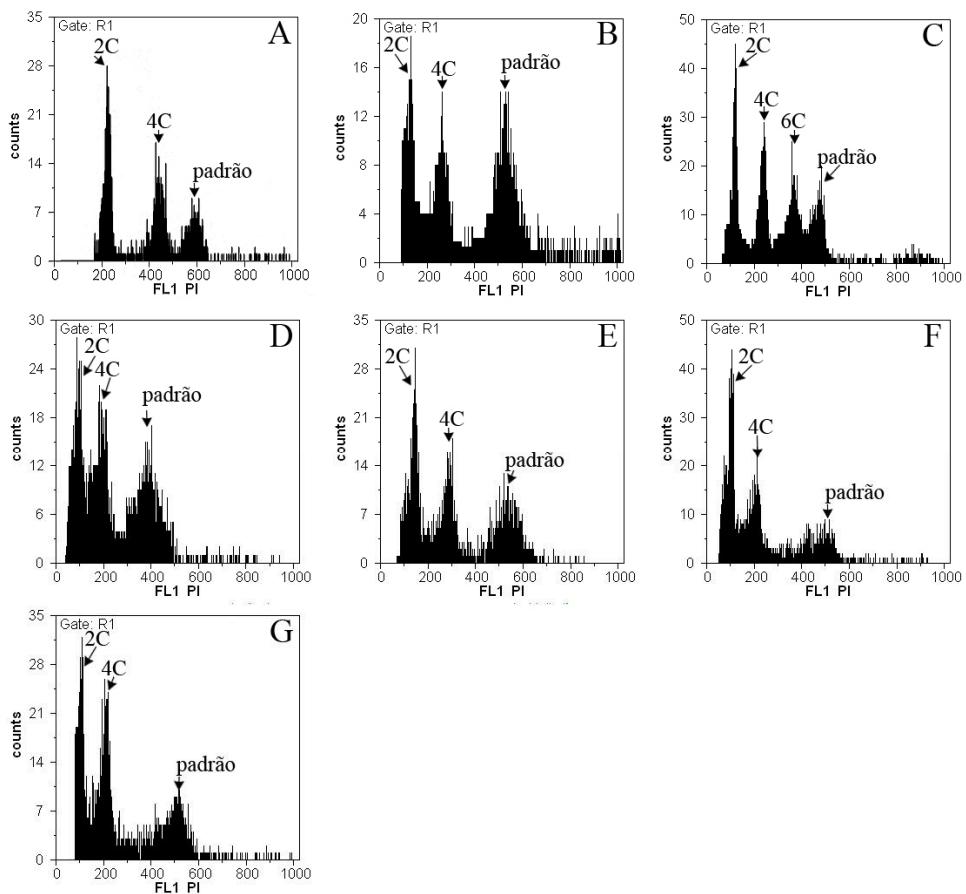


Figura 6 Histogramas citométricos de intensidade de fluorescência relativa, obtidos a partir de núcleos foliares corados com iodeto de propídio, em representantes do gênero *Epidendrum* oriundos de diferentes populações. **A-C:** subgênero *Amphiglottium*. **D-G:** subgênero (Eu-) *Epidendrum*. **A.** *E. cinnabarinum* com $2C = 20,21$ pg e $4C = 49,70$ pg; **B.** *E. denticulatum* com $2C = 4,06$ pg e $4C = 8,10$ pg; **C.** *E. fulgens* com $2C = 3,23$ pg, $4C = 6,59$ pg e $8C = 12,47$ pg; **D.** *E. latilabre* com $2C = 4,33$ pg e $4C = 8,76$ pg; **E.** *E. nocturnum* com $2C = 3,37$ pg e $4C = 6,80$ pg; **F.** *E. paniculatum* com $2C = 3,41$ pg e $4C = 6,93$ pg; **G.** *E. pseudodifforme* com $2C = 3,94$ pg e $4C = 8,26$ pg. Foi utilizado como padrão interno espécimes de *Oxalis umbraticola* com $2C = 16,5$ pg, com exceção da quantificação para *E. cinnabarinum*, onde foi utilizado como padrão interno espécimes de *Tulbaghia simmleri* com $2C = 38,91$ pg.

A segunda população de *E. nocturnum* analisada aqui apresentou citótipos com $2n = 60$ cromossomos (Figura 4d-f), que variaram de $1,53$ μm até $3,69$ μm (Tabela 1). Este citótipo apresentou padrão de bandas CMA/DAPI bastante distinto do anterior, por apresentar 21 bandas pericentroméricas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ bastante conspícuas (Figura 4f, setas amarelas), enquanto as demais regiões pericentroméricas apresentaram-se $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^-$. Regiões terminais $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ foram observadas em sete cromossomos acrocêntricos (Figura 4f, cabeças de setas amarelas). Apenas um

cromossomo metacêntrico apresentou o braço curto inteiramente DAPI⁺/CMA⁰ e o braço longo CMA⁰/DAPI⁻ (Figura 4f, inserto).

A quantificação do DNA nuclear para *E. paniculatum* apresentou valores referentes a $2C = 3,41$ pg DNA, bem como um ciclo de endoreduplicação completa referente a $4C = 6,93$ pg DNA (Tabela 1; Figura 6F).

Epidendrum pseudodiforme apresentou $2n = 40$ cromossomos (Figura 5a-c), que variaram de $1,58 \mu\text{m}$ até $2,90 \mu\text{m}$ (Tabela 1). Foram observadas regiões pericentroméricas CMA⁺/DAPI⁻ em 10 cromossomos metacêntricos (Figura 5c, setas amarelas). Além disso, foram observadas regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻ em quatro cromossomos acrocêntricos (Figura 5c, cabeças de setas amarelas). Bandas DAPI⁺/CMA⁻ foram observadas nos terminais de três cromossomos (Figura 5c). A quantificação de DNA nuclear apresentou valores referentes a $2C = 3,94$ pg, além de um ciclo de endoreduplicação completo equivalente a $4C = 8,26$ pg DNA (Tabela 1; Figura 6G). Outras 10 regiões terminais CMA⁰/DAPI⁻ menores e menos conspícuas foram visualizadas.

Epidendrum viviparum apresentou cariotipo com $2n = 40$ cromossomos (Figura 5d-f), que variaram de $2,16 \mu\text{m}$ até $4,00 \mu\text{m}$ (Tabela 1). Foram visualizadas duas pequenas regiões terminais CMA⁺/DAPI⁻ em cromossomos acrocêntricos, possivelmente correspondentes as RONs (Figura 5f, cabeças de setas amarelas).

DISCUSSÃO

Novas contagens cromossômicas são apresentadas no presente trabalho para *Epidendrum cinnabarinum* ($2n = 224$), *E. radicans* ($2n = 24$) e *E. nocturnum* ($2n = 60$). Além disso, dados inéditos de quantificação do genoma para as espécies *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* (pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*), *E. latilabre*, *E. nocturnum* e *E. pseudodiforme* (pertencentes ao subgênero *Epidendrum*) são apresentados aqui. Os números cromossômicos reportados para *E. ciliare* com $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Goldblatt, 1985), *E. denticulatum* com $2n = 38$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Pinheiro *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2013) *E. fulgens* com $2n = 24$ (Tanaka & Kamemoto, 1984), *E. nocturnum* com $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010), *E. pseudodiforme* com $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Assis *et al.*, 2013) e *E. viviparum* com $2n = 40$ (Assis *et al.*, 2013) confirmam as contagens prévias. A morfologia cromossômica observada nos

representantes analisados é bastante variável, e em todas as espécies ocorrem cromossomos metacênicos, submetacênicos e acrocênicos, em consonância com os registros disponíveis na literatura (Assis *et al.*, 2013).

Dados inéditos de coloração diferencial com fluorocromos CMA/DAPI também são apresentados no presente trabalho, revelando os padrões de distribuição de bandas heterocromáticas em *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens*, *E. radicans*, *E. ciliare*, *E. nocturnum*, *E. pseudodifforme* e *E. viviparum*. Pelo menos três tipos principais de heterocromatina foram observadas nos representantes do subgênero *Amphiglottium* analisadas no presente trabalho, bem como em outros representantes analisados por Assis *et al.* (em preparação), que corroboram o tratamento filogenético proposto por Pinheiro *et al.* (2009). O tipo principal, formado por regiões CMA⁰/DAPI[−], ocorre em todas as espécies, em número e tamanho variável, sendo possivelmente o componente heterocromático das regiões pericentroméricas na maioria dos cromossomos, observado em todas as espécies do subgênero *Amphiglottium* analisadas. Geralmente, o mesmo padrão ocorre em cromossomos acrocênicos, em todas as espécies, formando bandas inconsíprias que coram negativamente (ou mais fracamente) com DAPI, mas que coram de forma neutra com CMA, nas regiões onde ocorrem os centrômeros. Em alguns cromossomos meta ou submetacênicos, estas bandas se estendem das regiões pericentroméricas, corando totalmente o braço curto. Regiões heterocromáticas que se estendem do centrômero por todo o braço curto foram identificadas em outros gêneros em Orchidaceae, como em *Serapias* L. e *Phalaenopsis* Blume (D'emerico *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2001).

O segundo tipo de heterocromatina forma blocos terminais CMA[−]/DAPI⁺, que foram observados nos braços cromossômicos curtos ou longos, ocorrendo em todas as espécies do subgênero *Amphiglottium*, mas não foram visualizadas em alguns representantes do subgênero *Epidendrum*. O maior número de bandas CMA[−]/DAPI⁺ foi encontrado em *E. cinnabarinum*, possivelmente em decorrência do seu nível de ploidia mais elevado. Nas espécies pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*, este tipo de heterocromatina parece estar relacionado à evolução das regiões subteloméricas. Em *Tetrahymena*, durante a cicatrização cromossômica programada, a telomerase adiciona repites teloméricos a partir de sequências não teloméricas, formando *de novo* telômeros ricos em AT (Wang & Blackburn, 1997). Em *E. nocturnum*, no citótipo com $2n = 40$ (Figura 4c), foi observado um conjunto de três cromossomos com regiões pericentroméricas CMA[−]/DAPI⁺. Este padrão difere do observado em todas as espécies

de *Epidendrum* analisadas até o presente momento, e pode ser resultante de alterações na composição da heterocromatina em uma linhagem distivamente relacionada ao subgênero *Amphiglottium* (Pansarin & Amaral, 2007; Pinheiro *et al.*, 2010, 2013; Assis, em preparação).

O terceiro padrão de bandas heterocromáticas com blocos CMA⁺/DAPI⁻ terminais ou pericentroméricos, geralmente estão associados aos pares de RONs distendidas. Algumas vezes estas regiões são menos conspícuas, e formam pequenas bandas discretas em diversas espécies de *Epidendrum* (Assis, em preparação). Estes padrões também foram encontrados em outros gêneros na família Orchidaceae, como no gênero *Vanilla* Plum. ex Mill. (Lepers-Andrzejewski *et al.*, 2011) e no gênero *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Cabral *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2012), e possivelmente é o padrão heterocromático associado as RONs em Orchidaceae e na maioria dos organismos. Em *Epidendrum secundum*, bandas CMA⁺/DAPI⁻ foram observadas nas regiões pericentroméricas de cromossomos metacêntricos (Assis, em preparação), o que se constitui em uma evidência da ocorrência de fissão cêntrica como importante fator evolutivo para a diversificação cariotípica nesta espécie.

A família Orchidaceae apresenta uma variação de 168 vezes em termos de conteúdo de DNA, com valores bastante discrepantes, desde 1C = 0,33 pg até 55,4 pg. Especialmente, a subfamília Epidendroideae apresenta valores de conteúdo de DNA que variam de 0,3 pg até 19,8 pg, com uma média de 1C = 3,6 pg DNA para a maioria das espécies (Leitch *et al.*, 2009). Para as espécies do gênero *Epidendrum* analisadas até o presente momento, os valores variam de 1C = 1,49 pg em *E. obliquum* (Jones *et al.*, 1998) até 1C = 10,1 pg em *E. cinnabarinum*. Contudo, a maior parte desta variação se observa entre os representantes do subgênero *Amphiglottium*, onde pelo menos três diferentes níveis de ploidia de DNA foram identificados. A maioria das espécies analisadas apresenta valores de conteúdo de DNA muito próximos, geralmente entre 1C = 1,6 pg até 1C = 2,2 pg. Desta forma, para o subgênero *Amphiglottium*, destacam-se algumas populações de *E. secundum* (2n = 84, 90) que apresentam um ciclo evidente de poliploidia, com 2C = 4x = 8,24 pg, e notavelmente *E. cinnabarinum* (2n = 224, 240) que apresenta um conteúdo de DNA equivalente a 2C = 10x = 20,21. Por outro lado, a pequena variação observada no conteúdo de DNA entre a maioria dos representantes analisados, pode estar relacionada a alterações disploidies, possivelmente relacionadas à variação cromossômica numérica neste grupo.

Em *Epidendrum*, observa-se claramente uma alteração no número fundamental entre as espécies, principalmente nos representantes do subgênero *Amphiglottium*. Alterações cromossômicas numéricas relacionadas à disploidias, neste caso, podem ser obscurecidas em virtude de mudanças estruturais subsequentes a fusões e/ou fissões cêntricas, que costumam alterar a posição relativa dos centrômeros (Guerra, 2008). A diversificação cariológica em *Epidendrum*, principalmente para os representantes dos subgêneros *Amphiglottium* e *Epidendrum*, parece relacionada, em primeira instância, a eventos de disploidia, assim como se observa em *Paphiopedilum*, que apresenta registros cromossômicos de $2n = 26$ até 52, porém com a manutenção do NF = 52 (Cox *et al.*, 1997; Leitch *et al.*, 2009). A alteração no número fundamental em *Epidendrum* pode ser o resultado de reorganizações intra e intergenômicas complexas, incluindo translocações, eliminação de sequências de DNA e amplificação ou redução de elementos repetitivos (Parisod *et al.*, 2012), e a ocorrência de cromossomos Bs em alguns representantes de *Epidendrum* corrobora esta hipótese (Assis, em preparação). A segunda fonte de variação está claramente relacionada a poliploidia, como se observa em outros representantes da subfamília Epidendroideae (Leitch *et al.*, 2009), não obstante a ocorrência de hibridação inter e intraespecífica, bem como *de novo* disploidia, que tendem a obscurecer o número monoploide de um grupo filogeneticamente relacionado (Guerra, 2008). A complexidade cariológica de *Epidendrum*, aliada a escassez de dados citogenéticos e moleculares, adicionam novos desafios para o estabelecimento de um número básico mais parcimonioso para o gênero, que se constitui em um interessante modelo para estudos de evolução cariotípica em Orchidaceae.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) pelo suporte financeiro e bolsas de pesquisa. Ao Prof. Marcelo Guerra por disponibilizar o citômetro pertencente ao Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco para a quantificação do DNA nuclear.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M. 2007.** Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **155**: 541-547
- Assis FNM, Souza BCQ, Medeiros-Neto E, Pinheiro F, Silva AEB, Felix LP. 2013.** Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **172**: 329-344
- Baguley BC. 1982.** Nonintercalative DNA-binding antitumor compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **43**: 167-181
- Barros e Silva AE, Guerra M. 2010.** The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry*. **85**: 115-125.
- Brieger FG. 1976-1977.** Gattungsreihe *Epidendra*. In: Brieger FG, Maatsch R, Senghas K, eds. *Schlechter Die Orchideen*. Paul Parey (Berlin), 509-549
- Cabral JS, Félix LP, Guerra M. 2006.** Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*. **29**: 659-664
- Conceição LP, Oliveira ALPC, Barabosa LV. 2006.** Characterization of the Species *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) occurring in Duanas do Abaaeté – Salvador, Ba, Brasil. *Cytologia*. **71**: 125-129
- Cogniaux A. 1898-1902.** *Epidendrum*. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I, Eds. *Flora Brasiliensis*. Oldenbourg (Munich) 30-186
- Cox AV, Pridgeon AM, Albert VA, Chase MW. 1997.** Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution*. **208**: 197-223
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo), 69-89
- D'emerico S, Pignone D, Bartolo G, Pulvirenti S, Terrasi C, Stuto S, Scrugli A. 2005.** Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **148**: 87-99
- Dressler RL. 1984.** La delimitacion de generos en el complejo *Epidendrum*. *Orquidea*. **9**: 191-409

Feitoza LL, Martins MIG, Castro AAJF, Felix LP, Carvalho R. 2010. Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. *Plant Systematics and Evolution*. **286**: 199-208

Felix LP, Guerra M. 2010. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **163**: 234-278

Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*. **220**: 1049-1051

Goldblatt P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982–1983. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 13

Guerra M. 1986. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I. *Revista Brasileira de Genética*. **1**: 21-40

Guerra M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in Citrus species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*. **71**: 234-241

Guerra M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots II: Systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 127-136

Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytobotany: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*. **120**: 339-350

Guerra M, Santos KGB, Barros e Silva AE, Ehrendorfer F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - a case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany*. **87**: 735-747

Hágsater E. 1984. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: Tan KW, ed. *Proceedings of the Eleventh World Orchid Conference*. 11st World Orchid Conference (Miami), 195-201

Jones K. 1998. Robertsonian fusion and centric fission on karyotype evolution of higher plants. *The Botanical Review*. **3**: 273-289

Kao YY, Chang SB, Lin TY, Hsieh CH, Chenk YH, Chenk WH, Chen CC. 2001. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* Orchids. *Annals of Botany*. **87**: 387-395

Koehler S, Cabral JS, Whitten WM, Williams NH, Singer RB, Neubig KM, Guerra M, Souza AP, Amaral MCE. 2008. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. *Annals of Botany*. **102**: 491-507

Leitch IJ, Kahandawala I, Suda J, Hanson L, Ingrouille MJ, Chase MW, Fay MF. 2009. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*. **104**: 469-481

Lepers-Andrzejewski S, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Wong M, Dron M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomaty from a cytogenetic study of Tahitian *Vanilla* (*Vanilla × tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*. **98**: 986-997

Lindley J. 1852-1859. *Epidendrum*. In: Lindley J, ed. *Folia Orchidacea*. J Matthews (London), 1-97

Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*. **100**: 875-888

Manzini G, Xodo L, Barcellona ML, Quadrifoglio F. 1985. Interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole.2HCl with synthetic and natural deoxy- and ribonucleic acids. *Proceedings of the International Symposium on Biomolecular Structure and Interactions, Supplement to the Journal of Bioscience*. **8**: 699-711

Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research*. **15**: 115-121

Moraes AP, Leitch IJ, Leitch AR. 2012. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **170**: 29-39

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. Orchidaceae Brasiliensis, Band 1. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. Orchidaceae Brasiliensis, Band 2. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow

Pansarin ER, Amaral MCE. 2007. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*. **10**: 211-219

Parisod C, Mhiri C, Lim KY, Clarkson JJ, Chase MW, Leitch AR, Grandbastien MA. 2012. Differential dynamics of transposable elements during long-term diploidization of *Nicotiana* Section *Repandae* (Solanaceae) allopolyploid genomes. *Public Library of Science One*. **7**: e50352

Pinheiro F, Barros F. 2005. Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo *Epidendrum secundum* e espécies afins (Orchidaceae) através de AFLP. Dissertation, Universidade de São Paulo.

Pinheiro F, Barros F. 2007a. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*. **25**: 129-136

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*. **19**: 3981-3994

Pinheiro F, Cozzolino S, Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*. **67**: 2024-2039

Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLF, Salatino A, Barros F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **283**: 165-177

Schweizer D. 1981. Counterstain-enhanced chromosome banding. *The American Journal of Human Genetics*. **57**: 1-4

Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M. 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany*. **109**: 987-999

Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Krahulec F. 2006. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*. **55**: 447-450

Tanaka R, Kamemoto H. 1984. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: Arditti J, ed. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press (Ithaca) 234-283

Wang H, Blackburn EH. 1997. *De novo* telomere addition by *Tetrahymena* telomerase *in vitro*. *The EMBO Journal*. **16**: 866-879