

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA DE SOUZA SANTOS

Número cromossômico e padrões de heterocromatina de duas espécies do gênero
Ornithocephalus Hook. (Orchidaceae) do Nordeste do Brasil

AREIA

2017

AMANDA DE SOUZA SANTOS

Número cromossômico e padrões de heterocromatina de duas espécies do gênero *Ornithocephalus* Hook. (Orchidaceae) do Nordeste do Brasil

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadores: Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix
Prof. Dr. Felipe Nollet Medeiros de Assis

AREIA

2017

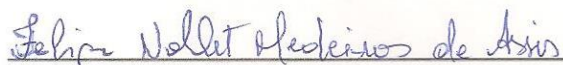
AMANDA DE SOUZA SANTOS

Número cromossômico e padrões de heterocromatina de duas espécies do gênero *Ornithocephalus* Hook. (Orchidaceae) do Nordeste do Brasil

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 08 de Fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA



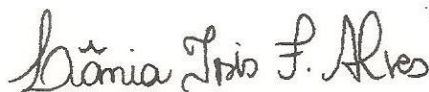
Prof. Dr. Felipe Nollat Medeiros de Assis

Orientador – CCA/UFPB



Prof. Dr^a. Ana Emília Barros e Silva

Examinador – DCB/CCA/UFPB



Dr^a. Lania Isis Ferreira Alves

Examinador – INSA

Aos meus pais: Maria da Penha de Souza Santos e Benedito Gomes dos Santos,
e meus irmãos: Armando de Souza Santos e Adriana de Souza Santos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e perseverança de encarar mais um trabalho de conclusão de curso, apesar de todos os imprevistos e cansaço.

Agradeço mais uma vez à meu orientador, professor Leonardo Pessoa Felix, por ter aceitado me orientar de novo. Agradeço imensamente à Felipe Nollet por ter aceitado me ajudar com as correções do trabalho e posteriormente se tornar orientador do trabalho. Aos dois, muito obrigada pela paciência e dedicação.

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Citogenética Vegetal, por estarem sempre por perto, dispostos a ajudar e acolher-me quando necessário. Agradeço especialmente a Sarah e Enoque por sempre me disponibilizar um tempinho para me ajudar e tirar dúvidas de última hora. E a Rodrigo Cirino por compartilhar comigo dúvidas e arquivos enquanto estamos os dois passando pelo mesmo momento.

Agradeço infinitamente à meus pais Benedito e Maria da Penha, sem o apoio, paciência e amor de vocês desde o início de minha vida, jamais teria chegado tão longe, e jamais conseguiria continuar meu caminho. Aos meus irmãos Armando e Adriana, pelas ideias, apoio, e suporte que foram imprescindíveis.

Nossas vidas começam a terminar no dia em que permanecemos em silêncio
sobre as coisas que importam.

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	12
a) Coleta e documentação botânica	12
b) Preparação cromossômica	12
c) Coloração com os Fluorocromos CMA (cromomicina A ₃) e DAPI (4'-6, diamidino-2-fenil indol)	13
d) Análise dos dados	14
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS	19
LEGENDAS DE FIGURAS	24
FIGURAS	25

Número cromossômico e padrões de heterocromatina de duas espécies do gênero *Ornithocephalus* Hook. (Orchidaceae) do Nordeste do Brasil

Amanda de Souza Santos, Felipe Nollet Medeiros de Assis, Leonardo Pessoa Felix

Resumo O gênero *Ornithocephalus* pertence à família Orchidaceae e está restrito à América, podendo ser encontrado desde o México até o sul do Brasil. É um gênero ainda pouco estudado cariologicamente. Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o cariótipo de duas espécies do gênero *Ornithocephalus* encontradas no Nordeste brasileiro, utilizando técnicas de bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI, visando identificar o número cromossômico desses representantes do gênero e seus padrões de bandas heterocromáticas. Ambas espécies analisadas apresentaram $2n = 56$ cromossomos com núcleos interfásicos do tipo cromocentro complexo. Apresentaram também o mesmo padrão de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ pericentroméricas, porém diferiram nos tamanhos médios de seus cromossomos e nos padrões de bandas CMA⁻/DAPI⁺ encontradas nos terminais cromossômicos. Os números cromossômicos e os tipos de núcleos interfásicos observados nas espécies do gênero *Ornithocephalus* corroboram a inserção do gênero na subtribo Oncidiinae. A variação na composição da heterocromatina das espécies do gênero encontradas no nordeste brasileiro nos permite considerá-la um marcador citotaxonômico para essas espécies, porém é uma análise que precisa ser melhor investigada, o que possibilitará uma melhor compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação das espécies de *Ornithocephalus*.

Palavras-chave: Citogenética, fluorocromos, marcador citotaxonômico, Oncidiinae.

Chromosome numbers and heterochromatin patterns of two species of the genus *Ornithocephalus* Hook. (Orchidaceae) from Northeast Brazil

Amanda de Souza Santos, Felipe Nollet Medeiros de Assis, Leonardo Pessoa Felix

Abstract The *Ornithocephalus* genus belongs to the Orchidaceae family, and is restrict to America, being able to be found since Mexico to the south of Brazil. It still is a genre little studied karyologically. Considering it, the aim of this work was characterize the karyotype of two *Ornithocephalus* species found in Brazilian Northeast, by using banding techniques with the CMA and DAPI fluorochromes, in order to identify the chromosome number of these representatives of the genus, and their patters of heterochromatic bands. Both species analyzed presented $2n=56$ chromosomes with complex chromocenter type interphase nuclei. They also presented the same patterns of CMA⁺/DAPI⁻ pericentrometric heterochromatic bands, but they differ in the average sizes of their chromosomes, and the CMA⁺/DAPI⁻ bands patterns found in the chromosomal terminals. The chromosome numbers and the types of interphase nuclei observed in the species of the *Ornithocephalus* genus corroborate the insertion of the genus in the subtribe *Oncidiinae*. The variation in heterochromatin composition of the species of the genus found in the Brazilian northeast allows us to consider it as a cytotaxonomic marker for these species, but it is an analysis that needs to be better investigated, which will allow a better understanding of the evolutionary mechanisms involved in species diversification of *Ornithocephalus*.

Key words: Cytogenetics, fluorochromes, cytotaxonomic marker, *Oncidiinae*.

INTRODUÇÃO

Orchidaceae Juss., é a segunda maior família dentre as plantas com flores, com cerca de 736 gêneros (Chase et al. 2015; The Plant List, 2016) e 27.800 espécies, distribuídas por todo o mundo (Stevens, 2016). No Brasil são encontrados cerca de 221 gêneros e 2.498 espécies de orquídeas distribuídas por todos os domínios fitogeográficos do país (Flora do Brasil, 2016). Sua maior diversidade, incluindo as espécies epífitas, encontra-se nos trópicos, principalmente em regiões montanhosas (Dressler, 1993). Apesar da distribuição cosmopolita, os representantes da família que ocorrem em diferentes continentes não são os mesmos, e alguns gêneros estão limitados a continentes específicos (Dressler, 1981). Essa ampla distribuição das orquídeas se deve principalmente à dispersão de longa distância, fazendo delas uma família ampla cuja biogeografia pode ter sido fortemente afetada pela tectônica de placas (Chase et al. 2003). Há relativamente poucos registros referentes a contagens cromossômicas para a família Orchidaceae, com apenas cerca de 8% de suas espécies citologicamente conhecidas (Rice et al. 2015). Em se tratando de espécies brasileiras, apenas 3% têm número cromossômico conhecido, sendo essas espécies economicamente importantes (Forni-Martins et al. 2013).

O gênero *Ornithocephalus* Hook., compreende cerca de 55 espécies (Stevens, 2016), amplamente distribuídas pela América tropical, desde o México até o sul do Brasil. São pequenas epífitas monopodiais sem pseudobulbos, cuja disposição das folhas apresenta-se em forma de leque (Toscano de Brito, 2001). No Brasil há registros de ocorrência de sete espécies do gênero em todas as cinco regiões, distribuídas pela Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Barros et al. 2015). Dentre as espécie encontradas no Brasil duas são endêmicas: *O. bicornis* Lindl., (encontrada nos estados do Amazonas,

Pará e Rondônia, na Amazônia), *O. brachystachyus* Schltr., (encontrada no estado do Rio Grande do Sul, em Mata Atlântica), (Barros et al. 2015).

Taxonomicamente, o gênero pertence a subtribo Oncidiinae (subfamília Epidendroideae), considerada uma das mais diversas subtribos de Orchidaceae (Pridgeon et al. 2009; Neubig et al. 2012). Estudos filogenéticos moleculares posicionam o gênero em um clado que também inclui os gêneros *Fernandezia* e *Telipogon*, fortemente suportado em 100% de jackknife (Sandoval-Zapotitla et al. 2010). O monofiletismo deste clado também é fortemente suportado pela ausência de estégmatos nos feixes vasculares e crescimento monopodial, ambos considerados sinapomórficos (Sandoval-Zapotitla et al. 2010). Apesar do forte suporte para o posicionamento do gênero *Ornithocephalus* em Oncidiinae, as relações infragenéricas permanecem obscurecidas e pouco estudadas sob uma perspectiva filogenética. Além disso, o gênero é pouco estudado cariologicamente (Rice et al. 2015), e não foi encontrado nenhum registro de número cromossômico para suas espécies.

O número cromossômico é a característica cariotípica mais comumente utilizada em análises citotaxonômicas (Guerra, 1989; 2008). O uso isolado dos números cromossômicos tem pouco significado filogenético e sistemático (Bedini et al. 2012), mas juntamente com outras abordagens, é uma das características citológicas mais informativas sobre os mecanismos envolvidos na evolução de um dado grupo de plantas. A análise da variação cromossômica numérica em um contexto filogenético é extremamente útil para a análise dos níveis de afinidade entre espécies (Auler et al. 2006), relações de parentesco, isolamento reprodutivo e fertilidade reduzida de híbridos (Olkosi, 2010), delimitação taxonômica em nível de espécie (Pedroza et al. 1999), entre outros.

A dupla coloração com os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6, diamidino-2-fenil indol (DAPI) é a técnica mais utilizada para diferenciar bandas

heterocromáticas em cromossomos de plantas (Guerra, 2000; El-Twab et al. 2011). O princípio da técnica se baseia na coloração diferencial dos fluorocromos, uma vez que as regiões heterocromáticas ricas em GC são mais fortemente coradas com CMA, e as regiões ricas em AT mais fortemente coradas com DAPI (Barros e Silva & Guerra, 2009). O uso da técnica possibilita distinguir a heterocromatina da eucromatina, bem como diferenciar as porções da heterocromatina com base na constituição molecular, permitindo uma análise mais detalhada do cariótipo, principalmente em grupos de plantas que não apresentam variação no número e na morfologia cromossômica (Barros e Silva & Guerra, 2009; Oliveira et al. 2015). A identificação de polimorfismos e variantes quanto aos padrões de bandas heterocromáticas, em linhagens vegetais cromossomicamente estáveis, é fundamental para a identificação de variações cromossômicas estruturais envolvidas na diversificação das espécies, bem como de marcadores citotaxonômicos confiáveis em grupos taxonomicamente complexos (Vosa, 1985; Guerra, 1993). Além disso, estes dados podem ser utilizados na avaliação das relações genéticas entre as espécies e/ou populações, fornecendo um suporte adicional para hipóteses filogenéticas, bem como contribuir para o entendimento das direções de mudanças cariotípicas discretas durante a cladogênese (Guerra, 1989; 2008).

A primeira expressão fenotípica de um genótipo são os cromossomos metafásicos que, diferente de outros caracteres, independem da expressão gênica, condições ambientais, idade ou estágio de desenvolvimento (Guerra, 2012). A descrição da variação fenotípica é, em qualquer nível, imprescindível para a interpretação dos mecanismos genéticos subjacentes a origem da diversidade e, de uma forma geral, sempre apresenta implicações importantes para a ciência (Darwin, 1859; Mendel, 1865). Tendo em vista o exposto aqui, e a separação geográfica entre as espécies de *Ornithocephalus* que ocorrem no nordeste brasileiro surgiu o seguinte questionamento, é possível distinguir as

diferentes espécies de *Ornithocephalus* do nordeste brasileiro por meio do padrão de heterocromatina? Com base em nosso questionamento o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o cariótipo de duas espécies do gênero *Ornithocephalus* encontradas no Nordeste do Brasil, utilizando técnicas de bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI, visando identificar o número cromossômico desses representantes do gênero e seus padrões de bandas heterocromáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Coleta e documentação botânica

Foram analisadas cariologicamente duas espécies: *Ornithocephalus gladiatus* Hook., (Figura 1) coletado no município de Pacoti (CE), depositado em herbário com número de coleta LPFelix 15129; e *Ornithocephalus myrticola* Lindl., (Figura 2) coletado no município de Santa Teresina (BA), depositado em herbário com número de coleta EMA 1042. As identificações foram realizadas de acordo com a classificação proposta por Toscano de Brito (2001). Todo o material analisado foi cultivado na coleção do orquidário da Universidade Federal da Paraíba. Exsiccatas de todo o material estudado foram depositadas no herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (EAN) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

b) Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, pontas de raízes e botões florais foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 20-24 h a 10°C, fixadas em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por 2-24 h à temperatura ambiente e, em seguida, estocadas em *freezer* a -20°C para posterior análise, de acordo com a metodologia de Guerra e Souza (2002).

Para a preparação das lâminas, os materiais obtidos como descrito acima foram lavadas em água destilada e digeridas com uma solução enzimática contendo 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v) por 20 min a 37°C. Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em uma gota de ácido acético 60%, e as lamínulas retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para permitir a seleção das melhores preparações. Subsequentemente, elas foram descoradas em etanol: ácido acético (3:1) por 30 min à temperatura ambiente e mantidas em etanol absoluto a 10°C até o dia seguinte. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

c) Coloração com os Fluorocromos CMA (cromomicina A₃) e DAPI (4',6-diamidino-2-fenil indol)

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com CMA e DAPI de acordo com Barros e Silva & Guerra (2009), com pequenas modificações. As lâminas foram coradas com 10µL de CMA (0,1 mg/ml) por uma hora, sendo o excesso de fluorocromo retirado com um jato de água destilada, e secas com uma bomba de ar. Em seguida, as lâminas foram coradas com 10 µL de DAPI (1 µg/ml) por meia hora. O excesso de DAPI foi retirado com um jato de água destilada e as lâminas foram secas, montadas com meio contendo glicerol: tampão McIlvaine pH 7,0 (1:1) e envelhecidas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5, usando o *software* Axiovision 4.8.

d) Análise dos dados

As melhores metáfases fotografadas foram tratadas com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6, para melhor visualização dos padrões de distribuição de heterocromatina. Foram elaborados ideogramas com os padrões de bandas CMA/DAPI com o Adobe Photoshop CS6. As medições cromossômicas foram realizadas utilizando o programa Image Tool. Os padrões heterocromáticos das diferentes espécies foram comparados entre si, e comparados com os padrões relatados na literatura para gêneros próximos.

A pesquisa de contagens cromossômicas prévias foi realizada a partir da base de dados do “The Chromosome Counts Database – CCDB” (Rice et al. 2015) e “Index to plant chromosome numbers – IPCN” (Goldblatt e Johnshon, 1979-). Os nomes científicos confirmados de acordo com o The Plant List.

RESULTADOS

Ambas espécies analisadas apresentaram núcleos interfásicos do tipo cromocentro complexo (Figura 3G-H), baseado na classificação de Tanaka (1971), os quais apresentam grandes agregados de cromômeros, formando grandes blocos heteropicnóticos que se apresentaram mais fortemente corados com DAPI. As duas espécies apresentaram $2n = 56$ cromossomos, ambas com bandas heterocromáticas $CMA^+/DAPI^-$ pericentroméricas em um par cromossômico, provavelmente correspondentes a RONS.

Em *Ornithocephalus myrticola* quanto aos núcleos interfásicos foi possível observar vários cromômeros de diferentes tamanhos (Figura 3H). A espécie possui cromossomos pequenos com tamanhos variando de 1,12 à 1,83 μ m. Quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina apresenta também, um par de bandas $CMA^-/DAPI^+$ proximais, bandas $CMA^-/DAPI^+$ em um dos terminais em 10 cromossomos, bandas $CMA^-/DAPI^+$ em ambos os terminais em pelo menos 10 cromossomos (Figuras 3C e 4), embora a espécie apresente as regiões distais de todos os braços cromossômicos mais fortemente corados com DAPI do que com CMA.

Em *Ornithocephalus gladius* quanto aos núcleos interfásicos foram observados menos cromômeros em comparação à *O. myrticola*, porém sendo maiores e mais homogêneos (Figura 3G). Foram observados cromossomos com tamanhos variando entre 1,89 e 4,14 μ m em prometáfase tardia. Quanto aos padrões de bandas heterocromáticas, as bandas $CMA^+/DAPI^-$ pericentroméricas aqui formaram satélites (Figura 3F), a espécie apresenta também bandas $DAPI^+$ em todos os terminais cromossômicos (Figuras 3F e 4).

DISCUSSÃO

Núcleos interfásicos do tipo cromocentro complexo são apontados como frequentes para gêneros como *Cymbidium*, *Stanhopea*, *Eulophia*, *Zygopatallum*, *Maxillaria*, *Oncidium* e gêneros relacionados (Tanaka, 1971). O mesmo tipo de núcleo interfásico foi observado em *Ornithocephalus*, sendo um caractere citológico que também corrobora seu posicionamento filogenético próximo ao gênero *Oncidium* conforme sugerido por Chase et al. (2003). Por outro lado, núcleos interfásicos do tipo cromocentro simples foram observados para algumas espécies do gênero *Oncidium* (Felix e Guerra, 2000). Segundo Tanaka (1971), gêneros que possuem grande variedade morfológica e rápida especiação tendem a apresentar núcleos dos tipos cromocentro simples e complexos. É possível que a ocorrência de núcleos interfásicos do tipo cromocentro simples seja uma apormorfia de alguma linhagem do gênero *Oncidium*, hipótese que ainda não pode ser confirmada em virtude do pequeno número de registros citológicos para a subtribo Oncidiinae.

As espécies *Ornithocephalus myrticola* e *O. gladius* estão inseridas na secção *Ornithocephalus*, pertencente a subtribo Oncidiinae. Nenhuma das duas espécies analisadas possuem registros prévios de contagens cromossômicas ou bandeamento com fluorocromos, sendo os dados cariológicos apresentados aqui os primeiros registros citológicos para o gênero *Ornithocephalus*.

Anteriormente o gênero apresentava-se taxonomicamente delimitado em uma subtribo própria, *Ornithocephalinae*, juntamente com outros gêneros (Dressler, 1993). Recentemente, estudos filogenéticos com base em dados moleculares (Chase et al. 2003) suportaram a inserção de *Ornithocephalus* na subtribo Oncidiinae. Em trabalhos de contagem cromossômica para espécies da subtribo Oncidiinae, (Felix e Guerra, 2000; Penha et al. 2011), foram levantados registros de $2n = 56$ para 112 espécies da subtribo,

correspondente a 43,57% das espécies da subtribo estudadas, o que sugere que esse seja o número diploide mais comum para Oncidiinae, apesar da grande variação numérica encontrada para a subtribo (Neubig et al. 2012). Os números cromossômicos observados no presente trabalho para as espécies do gênero *Ornithocephalus* corroboram a inserção do gênero na subtribo Oncidiinae.

Ambas espécies de *Ornithocephalus* apresentam bandas CMA⁺ proximais provavelmente correspondentes a RONS, porém dois padrões distintos de bandas heterocromáticas DAPI⁺. O padrão de heterocromatina DAPI⁺ nos terminais cromossômicos observado em *O. gladius* tem sido encontrado em outros grupos próximos de Oncidiinae, como na subtribo Laeliinae (Assis, 2013) e outros grupos da subfamília Epidendroideae. O segundo padrão de bandas DAPI foi observado em *O. myrticola*, com bandas DAPI⁺ em alguns terminais cromossômicos, como também bandas DAPI⁺ intersticiais. Padrões variáveis na distribuição e composição da heterocromatina também são encontrados em outros gêneros da subfamília Epidendroideae como *Christensonella* Szlach., Mytnik, Górniak & Smiszek (Koehler et al. 2008), *Epidendrum* L. (Assis, 2013), *Phalaenopsis* Blume. (Kao et al. 2001), *Acianthera* Scheidw. (Oliveira et al. 2015), *Cephalanthera* Rich. (Moscone et al. 2007), *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Cabral et al. 2006), *Cattleya* Lindl. (Souza, 2011) e gêneros não relacionados como *Cypripedium* L. (Kondo et al. 1994), sugerindo que a heterocromatina na família Orchidaceae tem evoluído de forma independente.

A variação nos padrões de distribuição e composição da heterocromática observada nas espécies do gênero *Ornithocephalus* ocorrentes do nordeste brasileiro sugerem que a heterocromatina pode ser usada como um marcador citotaxonômico eficiente para diferenciá-las na ausência de flores. Porém faz-se necessário uma maior investigação em uma amostragem mais representativa do gênero, afim de elucidar quais

os possíveis eventos responsáveis pela variação encontrada nas bandas DAPI das duas espécies, bem como possibilitar a identificação de marcadores citotaxonômicos úteis para o gênero, já que é prematura afirmar que a heterocromatina serviria como marcador para todas as espécies do gênero.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AULER NMF. BATTISTIN A. REIS MS. 2006. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 8: 55-63.
- BARROS E SILVA AE. GUERRA M. 2009. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH produces. *Biotechnic & Histochemistry*. 99999:1.
- BARROS F DE. VINHOS F. RODRIGUES VT. BARBERENA FFVA. FRAGA CN. PESSOA EM. FORSTER W. MENINI NETO L. FURTADO SG. NARDY C. AZEVEDO CO. GUIMARÃES LRS. 2015. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11948>>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66: 1085-1113. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411).
- BEDINI G. GARBARI F. PERUZZI L. 2012. Does chromosome number count? Mapping karyological knowledge on Italian flora in a phylogenetic framework. *Plant Systematics and Evolution – Springer*. DOI 10.1007/s00606-011-0585-1.
- CABRAL JS. FELIX 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.
- CHASE MW. CAMERON KM. BARRETT RL. FREUDENSTEIN JV. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: KW Dixon, SP Kell, RL Barrett & PJ Cribb (eds). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Sabah, pp. 69-89.

CHASE MW. CAMERON KM. FREUDENSTEIN JV. PRIDGEON AM. SALAZAR G. VAN DEN BERG C. SHUITEMAN A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177: 151-174.

DARWIN C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. - pp. i-x [= 1-10], 1-502, 1-32. London. (J. Murray). 1859.

DRESSLER RL. 1981. The orchids: natural history and classification. Massachusetts: Harvard University Press, 333p.

DRESSLER RL. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge: Cambridge University Press.

EL-TWAB MHA. MOTOHASHI T. FUJISE A. TATARENKO E. KONDO K. KHOLBOEVA AS. GOMBOCYRENOVICH D. 2011. Characterization of chromosome complements in *Filifolium sibilicum* (L.) Kitamura by aceto-orcein, CMA, DAPI and FISH 5S and 45S rDNA. *Chromosome Botany* 6: 75-80.

FELIX LP. GUERRA M. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 957-978.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. 2016. Orchidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 04 Ago. 2016.

FORNI-MARTINS ER. MORAES AP. COSTA JY. MAEKAWA VO. 2013. Evolução Cariotípica em Orchidaceae. *In: Encontro sobre Temas de Genética e Melhoramento* (30: 2013: Piracicaba, SP) “Evolução, sistemática e biologia de populações de orquídeas”; anais ... / edição de Giancarlo C. X. Oliveira... [et al.]. - Piracicaba: ESALQ/LGN.

GOLDBLATT P. JOHNSON D. 1979-. Index to plant chromosome numbers. St Louis, MO, USA: Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Project/IPCN>> Acesso em: 21 de Set de 2016.

GUERRA M. 1989. Introdução à Citogenética Geral. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*.

- GUERRA M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMADAPI staining. *Heredity* 71: 234-241.
- GUERRA M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 1029-1041.
- GUERRA M. SOUZA MJ. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC-Editora.
- GUERRA M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Research*. 120: 339-350.
- GUERRA M. 2012. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems*. 146: 703-710.
- 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 MC. 2008. Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): Species Delimitation and Insights into Chromosome Evolution. *Annals of Botany* 102: 491-507.
- KONDO K. HOSHI Y. TANAKA R. 1994. Somatic Chromosome Differentiation in *Cypripedium segawai* Masamune and *C. japonicum* Thunberg. *Cytologia* 59: 115-120.
- MENDEL G. 1866. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr 1865, *Abhandlungen*, 3-47.
- 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.
- NEUBIG KM. WHITTEN WM. WILLIAMS NH. BLANCO MA. ENDARA L. BURLEIGH JG. SILVEIRA K. CUSHMAN JC. CHASE MW. 2012. Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum

likelihood analysis of combined DNA datasets. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 168: 117-146.

OLIVEIRA IG. MORAES AP. ALMEIDA EM. ASSIS FNM. CABRAL JS. BARROS F. FELIX LP. 2015. Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. *Botanical Journal of the Linnean Society* 178: 102-120.

OLKOSKI D. 2010. Número cromossômico e comportamento meiótico de populações de *Mimosa bimucronata* (DC) O. Kuntze no Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação: Porto Alegre.

PEDROZA A. GITAÍ J. SILVA AEB. FELIX LP. GUERRA M. 1999. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. *Acta Botanica. Brasilica*. 13: 49-60.

PENHA TLL. CORRÊA AM. CATHARINO ELM. 2011. Números cromossômicos em *Kleberella* V.P. Castro & Cath. (Orchidaceae, Oncidiinae) e gêneros afins. *Acta Botanica Brasilica* 25: 466-475.

PRIDGEON AM. CHASE MW. CRIBB PJ. RASMUSSEN FN. eds. 2009. Genera Orchidacearum, Epidendroideae (Part two). Oxford: Oxford University Press, 5: 211-394.

RICE A. GLICK L. ABADI S. EINHORN M. KOPELMAN NM. SALMAN-MINKOV A. MAYZEL J. CHAY O. MAYROSE I. 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist* 206: 19-26. Disponível em: <<http://ccdb.tau.ac.il/>> Acesso em: 21 de Set de 2016.

SANDOVAL-ZAPOTITLA E. GARCÍA-CRUZ J. TERRAZAS T. VILLASEÑOR JL. 2010. Phylogenetic relationships of the subtribe Oncidiinae (Orchidaceae) inferred from structural and DNA sequences (matK, ITS): a combined approach. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 263- 279.

SOUZA BCQ. 2011. Citogenética da Subtribo Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroideae): Regiões heterocromáticas e localização do DNA Ribossomal / Bruno César Querino de Souza – Areia- PB: UFPB/CCA.

STEVENS PF. 2016. Angiosperm Phylogeny Website, version 12, July 2012. [and more or less continuously updated since]. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>> Acesso em: 03 Ago 2016.

TANAKA R. 1971. Types of resting nuclei in Orchidaceae. *The Botanical Magazine Tokyo* 84: 118-122. (March 25, 1971).

THE PLANT LIST. 2016. Disponível em: <www.theplantlist.org>. Acesso em: 03 Ago 2016.

TOSCANO DE BRITO ALV. 2001. Systematic review of the Ornithocephalus Group (Oncidiinae; Orchidaceae) with comments on Hofmeisterella. *Lindleyana* 16: 157-217.

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

LEGENDAS DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração morfológica de *Ornithocephalus gladius*. A-B: vegetal com flores; C-E: inflorescência; F-I: detalhe da flor. Fontes das fotos: <<http://www.orhidei.org/forum/17-6657-1>> <<https://hiveminer.com/Tags/gladius,ornithocephalus/Interesting>>

Figura 2. Ilustração morfológica de *Ornithocephalus myrticola*. A-B: vegetal com flores; C-D: inflorescência; E-H: detalhe da flor. Fonte das fotos: <http://www.orquideasgauchas.net/P_desc_especie.php?cod_especie=306>

Figura 3. Metáfases mitóticas e núcleos interfásicos de espécies pertencentes ao gênero *Ornithocephalus* ($2n = 56$), corados com os fluorocromos CMA (B, E) e DAPI (A, D), e sobreposição das imagens de ambos os fluorocromos (C, F, G, H). *Ornithocephalus myrticola*: metáfases (A-C), núcleo interfásico (H) e *Ornithocephalus gladius* metáfases (D-F), núcleo interfásico (G). Setas em C destacam cromossomos com bandas pericentroméricas DAPI⁺. Barra em H = 10 μ m.

Figura 4. Representação esquemática dos padrões de distribuição de bandas heterocromáticas nos cromossomos metafásicos das espécies de *Ornithocephalus*. A classificação e o tamanho dos cromossomos não são indicados. O número abaixo de cada cromossomo indica a quantidade de cada tipo cromossômico no cariótipo da espécie. Bandas CMA (amarelo), bandas DAPI (azul), regiões neutras (cinza).

FIGURAS

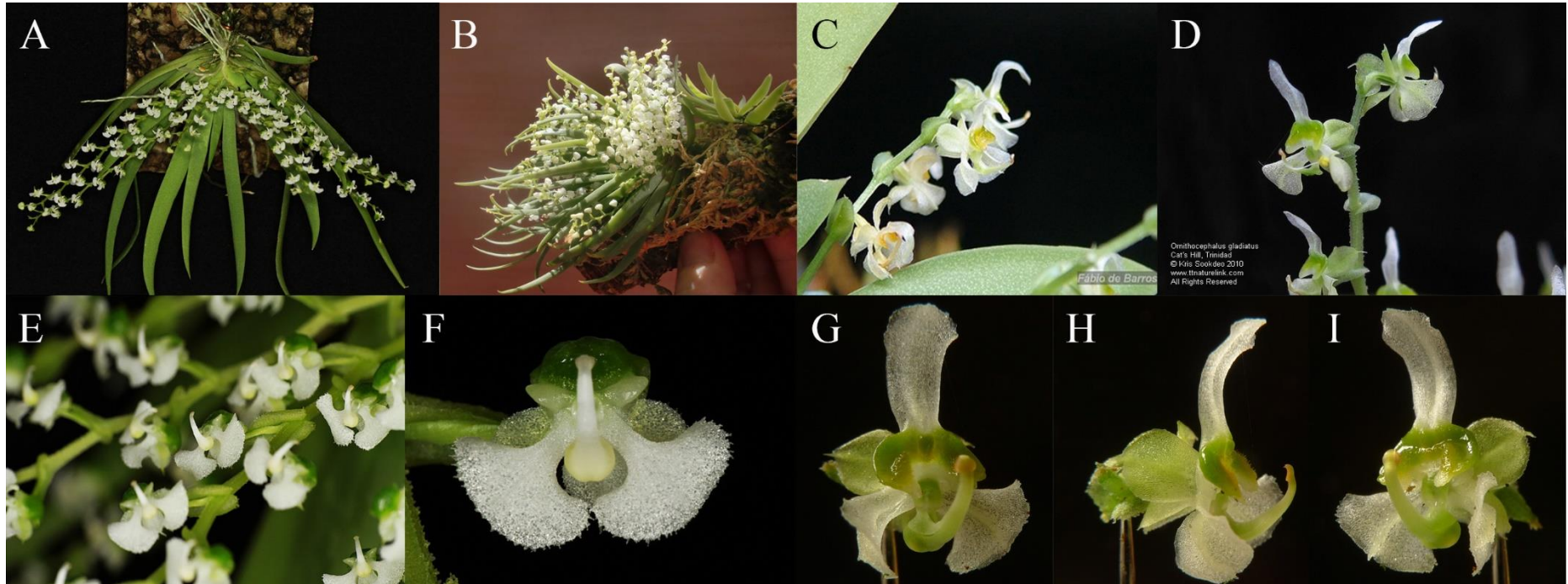


Figura 1. Ilustração morfológica de *Ornithocephalus gladiatus*. A-B: vegetal com flores; C-E: inflorescência; F-I: detalhe da flor. Fontes das fotos:

<<http://www.orhidei.org/forum/17-6657-1>> <<https://hiveminer.com/Tags/gladiatus.ornithocephalus/Interesting>>



Figura 2. Ilustração morfológica de *Ornithocephalus myrticola*. A-B: vegetal com flores; C-D: inflorescência; E-H: detalhe da flor. Fonte das fotos: http://www.orquideasgauchas.net/P_desc_especie.php?cod_especie=306

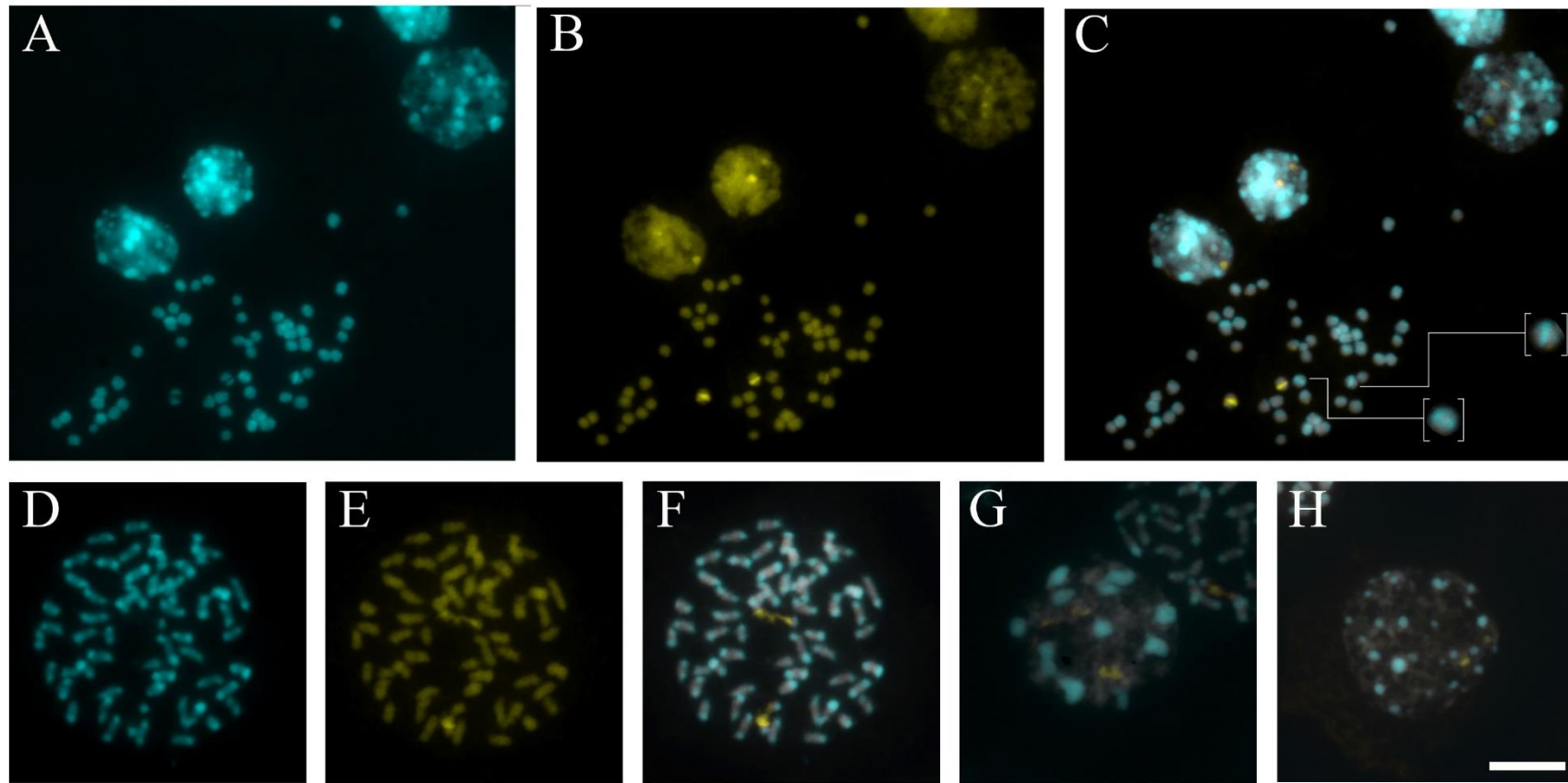


Figura 3. Metáfases mitóticas e núcleos interfásicos de espécies pertencentes ao gênero *Ornithocephalus* ($2n = 56$), corados com os fluorocromos CMA (B, E) e DAPI (A, D), e sobreposição das imagens de ambos os fluorocromos (C, F, G, H). *Ornithocephalus myrticola*: metáfases (A-C), núcleo interfásico (H) e *Ornithocephalus gladius* metáfases (D-F), núcleo interfásico (G). Setas em C destacam cromossomos com bandas pericentroméricas DAPI⁺. Barra em H = 10 μ m.

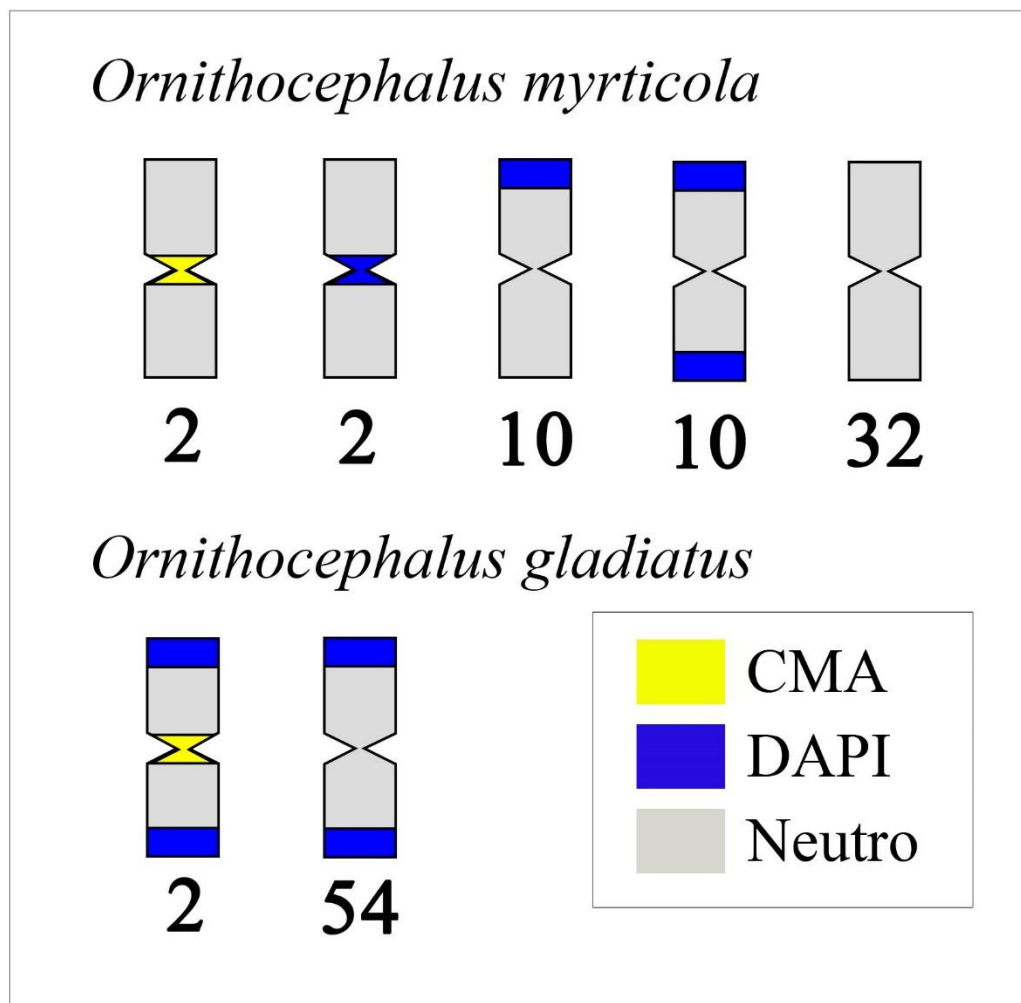


Figura 4. Representação esquemática dos padrões de distribuição de bandas heterocromáticas nos cromossomos metafásicos das espécies de *Ornithocephalus*. A classificação e o tamanho dos cromossomos não são indicados. O número abaixo de cada cromossomo indica a quantidade de cada tipo cromossômico no cariótipo da espécie. Bandas CMA (amarelo), bandas DAPI (azul), regiões neutras (cinza).