



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JOSÉ LOURIVALDO DA SILVA

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA E COMPOSIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM
ESPÉCIES DA SUBTRIBO Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae A.Juss.)**

AREIA
2023

JOSÉ LOURIVALDO DA SILVA

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA E COMPOSIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM
ESPÉCIES DA SUBTRIBO Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae A.Juss.)**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix

AREIA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, José Lourivaldo da.

Evolução cariotípica e composição da heterocromatina
em espécies da subtribo Pleurothallidinae Lindl.

(Orchidaceae A.Juss.) / José Lourivaldo da Silva. -
Areia:UFPB/CCA, 2023.

51 f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Acianthera. 3. Número cromossômico.
4. Pleurothallis. 5. Stelis. I. Felix, Leonardo Pessoa.
II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.3)

JOSÉ LOURIVALDO DA SILVA

**Evolução cariotípica e composição da heterocromatina em
espécies da subtribo Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae A.Juss.)**

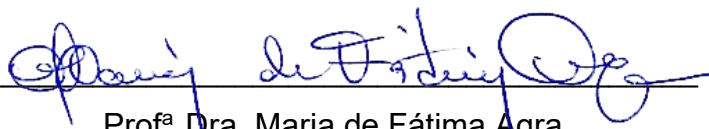
Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Aprovado em: 15 de março de 2021.

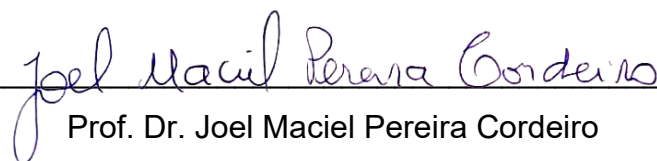
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof.ª Dra. Maria de Fátima Agra
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Joel Maciel Pereira Cordeiro
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A minha mãe, Cícera Maria da Silva, que sempre acreditou em mim e me incentivou a lutar pelos meus sonhos e objetivos, assim como todos os esforços e seu amor desde o início de minha vida. A minha esposa Angeline Maria da Silva Santos, que desde o início de nossa união sempre acreditou em mim e no meu potencial, e me incentivou a ser uma pessoa melhor.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e meu bom Senhor Jesus Cristo, Eles que nunca me abandonaram e sempre estiveram presente em todos os momentos de minha vida e sem eles essa conquista jamais seria possível.

Agradeço ao professor Leonardo Felix, que além de tê-lo como orientador posso dizer que o tenho como um grande amigo. Além da oportunidade de poder trabalhar ao seu lado no melhor laboratório do CCA-UFPB, o Laboratório de Citogenética Vegetal. Além disso, é um exemplo de pessoa e profissional que tenho para minha vida, contribui fortemente para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço Angeline Maria da Silva Santos, que é um exemplo de mulher sonhadora, batalhadora, determinada, humilde, simples e que nunca baixa a cabeça mediante as dificuldades. A qual tenho a honra de poder fazer parte de sua vida e chamar de minha esposa. Sou imensamente grato por todo o amor, carinho, companheirismo, amizade, lealdade, paciência e, por muitas vezes, nossa singularidade. Pelas inúmeras noites de sono mal dormidas, no qual ela estava a me ajudar com os estudos. Por todo o apoio, incentivo e puxões de orelha quando preciso, que não foram poucas vezes. A ela minha eterna gratidão!

Agradeço a minha família que sempre acreditou em mim e no meu potencial. Minha Mãe, a pessoa mais importante de minha vida, Cícera Maria da Silva, que sempre fez de tudo e mais um pouco para me ver chegando até onde estou. A ela, minha eterna gratidão! As minhas tias, Hozana, Rosenice, Roseane e meu Tio José, por sempre terem acreditado e me incentivado ao longo de minha jornada. Aos meus avós José Viturino e Maria das Dores (*In memoriam*). Aos meus irmãos, Edvaldo, Kelvis Rafael, Erivoneide e Jennyffer que diretamente e indiretamente contribuíram para esta conquista. Aos meus primos Vinícius, Lourhan, Luan, Katia, Rosa (que tenho como uma tia) que sempre acreditaram em meu sucesso ao longo desta jornada.

A família que Deus me deu: Minha sogra dona Geovania, que tenho como uma mãe, pois me acolheu em sua casa e vida, me tratando como um filho. A ela meu total respeito, carinho e admiração! Aos cunhados Risomar Nascimento e Aline Santos, exemplos de pessoas a se seguir, e que tenho a honra de poder dizer que faço parte desta família.

A professora Márcia Miranda, exemplo de profissional e pessoa que quero seguir que contribuiu com minha formação profissional e pessoal, desde o início de minha jornada acadêmica me acolheu não só como um orientando, mas sim como um filho. A ela, meu total respeito e carinho.

A todos os professores que contribuíram decisivamente para minha formação acadêmica, profissional, pessoal e por todos os ensinamentos valiosos. Agradeço aos meus amigos professores que me ensinaram com prazer e dedicação ao decorrer destes cinco anos.

A Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e ao Prof. Dr. Joel Maciel Pereira Cordeiro, por terem aceitado fazer parte da banca avaliadora deste trabalho e por todas as contribuições e sugestões dadas.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Taxonomia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFPB: Seu Saulo, William Alves, Cláudio, Achilles, Joel, Charlys, Rodrigo, Harrison, Erton, Amanda, Jade, Robson, Gabriela, Ingrid, Rosemere, Luciana, Cattleya, Prof. Leonardo Felix e Profa. Ana Emília por terem contribuído diretamente ou indiretamente em minha formação.

Aos amigos que a vida me deu: Eliete Nahana, William Alves, Elton Douglas, Eduardo Felipe, Davy Bérnago por terem se tornado mais que amigos, irmãos, que sempre me incentivaram e me apoiaram ao longo desta jornada.

A todos os colegas de turma que sempre estiveram ao meu lado, por toda ajuda mútua que sempre teve ao longo desta jornada acadêmica e que de certa forma contribuíram para minha formação. A todos vocês, meu muito obrigado!

Aos amigos que a cidade de Areia me deu, como Dona Normanda, Dona Elci, Carolina, Annie, Dona Liana, Alícia.

A aquelas pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a concretização deste sonho e para a construção de quem sou hoje.

Obrigado!

“A natureza não faz nada em vão.”

Aristóteles

RESUMO

A subtribo Pleurothallidinae é um grupo monofilético pertencente à família Orchidaceae e agrupa 5.114 espécies e 44 gêneros, sendo amplamente distribuídas principalmente pelas regiões neotropicais. Neste trabalho buscamos estudar a evolução cariotípica, quantidade e distribuição das bandas heterocromáticas das espécies da subtribo Pleurothallidinae. Portanto, foram analisadas por meio da técnica de coloração CMA/DAPI, nove gêneros e 26 representantes da subtribo Pleurothallidinae, com o intuito de ampliar a quantidade de gêneros e espécies da subtribo analisadas com essa técnica. Desta forma, buscamos responder as seguintes perguntas: 1) A variação de números cromossômicos e padrões de banda CMA/DAPI em Pleurothallidinae suporta a segregação de gêneros recentemente propostos com base em filogenia molecular? 2) A quantidade e distribuição de bandas CMA/DAPI é uniforme nesses gêneros? 3) *Stelis* e gêneros relacionados podem realmente ser caracterizados pela ausência ou quantidades muito pequenas de heterocromatina? Portanto, esperamos contribuir para o melhor entendimento da filogenia de Pleurothallidinae e identificar os mecanismos envolvidos na evolução cariotípica da subtribo. A subtribo Pleurothallidinae possui uma grande diversidade de números cromossômicos e de padrões de bandas CMA/DAPI, portanto, potencialmente utilizáveis na delimitação de táxons, em nível de espécie e gênero. Os números cromossômicos das espécies da subtribo Pleurothallidinae variaram de $2n = 18$, em uma espécie de *Pleurothallis*, a $2n = 44$ em *Acianthera*. Além disso, gêneros como *Acianthera* e *Specklinia*, caracterizaram-se por apresentar números básicos primários $x = 20$ e $x = 10$, respectivamente, enquanto que *Stelis*, o número básico $x = 16$ é o seu mais provável número básico primário. A quantidade e distribuição de bandas CMA/DAPI foi claramente variável dentro da subtribo Pleurothallidinae e em alguns casos dentro dos gêneros, como em *Acianthera* e *Stelis*. O gênero *Stelis* inicialmente parecia ser caracterizado por apresentar pouca ou nenhuma heterocromatina detectável pela técnica de bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI. Todavia, *Stelis* mostrou-se mais variável em termos de quantidade, composição e número de bandas heterocromáticas utilizáveis na delimitação taxonômica de espécies relacionadas. Com isso, esperamos contribuir para o melhor entendimento da filogenia de Pleurothallidinae.

Palavras-chave: *Acianthera*; citotaxonomia; número cromossômico; *Pleurothallis*; *Stelis*.

ABSTRACT

The subtribe Pleurothallidinae is a monophyletic group belonging to the Orchidaceae family, comprising 5,114 species and 44 genera, widely distributed mainly in the neotropical regions. In this study, we aimed to investigate the karyotypic evolution, quantity, and distribution of heterochromatic bands in species of the subtribe Pleurothallidinae. Therefore, nine genera and 26 representatives of the subtribe Pleurothallidinae were analyzed using the CMA/DAPI staining technique, with the purpose of expanding the number of genera and species studied with this method. We sought to answer the following questions: 1) Does the variation in chromosomal numbers and CMA/DAPI band patterns in Pleurothallidinae support the segregation of recently proposed genera based on molecular phylogeny? 2) Is the quantity and distribution of CMA/DAPI bands uniform in these genera? 3) Can *Stelis* and related genera be truly characterized by the absence or very small amounts of heterochromatin? Therefore, we hope to contribute to a better understanding of the phylogeny of Pleurothallidinae and to identify the mechanisms involved in the karyotypic evolution of the subtribe. The subtribe Pleurothallidinae exhibits a wide diversity of chromosomal numbers and CMA/DAPI band patterns, potentially usable in the delimitation of taxa at the species and genus levels. The chromosomal numbers of species in the subtribe Pleurothallidinae ranged from $2n = 18$ in a *Pleurothallis* species to $2n = 44$ in *Acianthera*. Additionally, genera such as *Acianthera* and *Specklinia* were characterized by primary basic numbers $x = 20$ and $x = 10$, respectively, while for *Stelis*, the most probable primary basic number is $x = 16$. The quantity and distribution of CMA/DAPI bands varied clearly within the subtribe Pleurothallidinae and, in some cases, within the genera, such as in *Acianthera* and *Stelis*. Initially, the genus *Stelis* seemed to be characterized by having little or no detectable heterochromatin using the CMA and DAPI fluorochrome banding technique. However, *Stelis* showed more variability in terms of the quantity, composition, and number of heterochromatic bands, which are useful in the taxonomic delimitation of related species. Thus, we hope to contribute to a better understanding of the phylogeny of Pleurothallidinae.

Keywords: *Acianthera*; chromosome number; cytotaxonomy; *Pleurothallis*; *Stelis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Metáfases mitóticas das espécies do gênero *Acianthera* da subtribo Pleurothallidinae coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *A. capillaris* com $2n = 40$; **B.** *A. fockei* $2n = 38$; **C.** *A. panduripetala* com $2n = 40$; **D.** *A. prolifera* com $2n = 44$; **E.** *A. macuconensis* com $2n = 38$; **F-G.** *Acianthera saundersiana* com $2n = 40$; **H.** *Acianthera* sp.1 com $2n = 40$; **I.** *Acianthera* sp.2 com $2n = 40$. Barra em **I** corresponde a $10\mu\text{m}$ 38
- Figura 2** - Metáfases mitóticas das espécies de diferentes gêneros da subtribo Pleurothallidinae, coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *Anathallis rubens* com $2n = 30$; **B.** *A. rubens* com $2n = 30$; **C.** *Masdevallia infracta* com $2n = 36$; **D.** *Myoxanthus exasperatus* com $2n = 38$; **E.** *Octomeria* sp. com $2n = 32$; **F.** *Pabstiella rubrolineata* com $2n = 28$; **G.** *Pleurothallis* sp. com $2n = 18$; **H.** *Specklinia grobyi* com $2n = 20$; **I.** *S. picta* com $2n = 20$. Barra em **I** corresponde a $10\mu\text{m}$ 39
- Figura 3** - Metáfases mitóticas das espécies do gênero *Stelis* pertencente a subtribo Pleurothallidinae, coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *S. aprica* com $2n = 32$; **B.** *S. aprica* com $2n = 32$; **C.** *S. concava* com $2n = 28$; **D.** *S. intermedia* com $2n = 32$; **E.** *loefgrenii* com $2n = 32$; **F.** *Stelis* sp. 1 com $2n = 32$; **G.** *Stelis* sp. 2 com $2n = 30$; **H.** *Stelis* sp. 3 com $2n = 32$. Barra em **H** corresponde a $10\mu\text{m}$ 40
- Figura 4** - Arvore filogenética adaptada de Karremans (2016), juntamente com os números cromossômicos haploides e padrões de bandas descritos neste trabalho e nos encontrados na literatura (tabela com levantamento de número cromossômico e bandas em preparação). 41

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Espécies da subtribo Pleurothallidinae analisadas com fluorocromos CMA/DAPI. Sumarizadas por gênero e espécie, coletor, número, local de coleta, contagens cromossômicas prévias (CP), números cromossômicos determinados no presente trabalho (PT), tipos de bandas CMA/DAPI e os antimitóticos utilizados.	35
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Orchidaceae A.Juss.	15
2.2 A subfamília Epidendroideae	16
2.3 Variação Cromossômica.....	17
2.4 Evolução Cariotípica	19
2.5 Citotaxonomia e Bandeamento Cromossômico	21
2.6 A subtribo Pleurothallidinae.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Coleta e Documentação Botânica	27
3.2 Análise Cromossômica.....	27
3.3 Coloração com Fluorocromos CMA/DAPI	27
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Números Cromossômicos	29
4.2 Bandas Heterocromáticas	30
5 DISCUSSÃO	32
5.1 Variação Cromossômica.....	32
5.1 A variabilidade da Heterocromatina	33
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A subtribo Pleurothallidinae Lindl. é um grupo monofilético (PRIDGEON et al., 2001; van den BERG et al., 2009; CHIRON et al., 2012; CHASE et al., 2015), pertencente à tribo Epidendreae, que integra uma das sete tribos contidas na subfamília Epidendroideae (PRIDGEON & CHASE, 2001; PRIDGEON et al., 2001). Compreende 44 gêneros e cerca de 5.100 espécies (KARREMANS, 2016), o que corresponde a cerca de 18,5% das espécies conhecidas de orquídeas (CHASE et al., 2016; CHRISTENHUSZ & BYNG, 2016; WFO, 2021).

No Brasil, Pleurothallidinae está representada por 22 gêneros e cerca de 600 espécies, das quais, aproximadamente 450 são endêmicas, distribuídas principalmente pelas florestas úmidas das regiões Sudeste e Sul do país, sendo menos diversificada nas demais regiões (BFG, 2015). São plantas principalmente de hábito epifítico, podendo também ocorrer como rupícolas e mais raramente como terrestres (LUER, 1986). Apresenta crescimento simpodial, rizoma curto ou rastejante, ramicaules unifoliados sem pseudobulbos, inflorescências terminal ou raramente lateral, simples ou fasciculada, folhas principalmente coriáceas conduplicadas, flores com uma articulação entre o pedicelo e o ovário (PRIDGEON & CHASE, 2003).

A subtribo Pleurothallidinae constitui uma das maiores subtribos da família Orchidaceae, em número de espécies. Todavia, pouco se conhece sobre a evolução cariotípica desse grupo. Atualmente, apenas 12 dos 44 gêneros de Pleurothallidinae possuem registros de números cromossômicos, com um total de apenas 64 espécies analisadas cariologicamente, o que corresponde a aproximadamente 1,5% de toda a subtribo (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Contudo, a subtribo apresenta uma significativa variação de números cromossômicos e do padrão de bandas heterocromáticas. Embora $x = 20$ seja o mais provável número básico para a subtribo, alguns gêneros apresentam números básicos divergentes, como $x = 10$ para *Specklinia* Lindl., $x = 16$ para *Pabstiella* Brieger & Senghas e *Stelis* Sw. e $x = 21$ para *Pleurothallopsis* Porto & Brade (FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, também se observa uma elevada variação numérica, desde $2n = 20$ em *Specklinia grobyi* (Bateman ex Lindl.) F. Barros a $2n = 84$ em *Pleurothallis bivalve* Lindl. (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010).

A utilização de técnicas coloração cromossômica convencionais, como a coloração Giemsa, Orceína ou Felgen, embora permita acessar informações como variação cromossômica numérica e morfologia cromossômica, é pouco informativa, quando se trabalha com grupos de plantas numericamente estáveis, como nos gêneros *Agave* L. (HUANG et al., 1989), *Manihot* Mill. (CARVALHO & GUERRA, 2002) e *Cattleya* Lindl. (QUERINO et al., 2020). A utilização de técnicas de coloração diferencial, especialmente as técnicas de bandeamento cromossômico em vegetais, permitem a visualização da heterocromatina como faixas mais fortemente coradas distribuídas ao longo dos cromossomos (GUERRA, 2000a). Entre as diversas técnicas de visualização da heterocromatina, a coloração com os fluorocromos CMA (Cromomicina A₃) e DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), permite diferenciar as regiões formadas por heterocromatina constitutiva com diferentes concentrações de pares de base. Isso torna possível o reconhecimento das porções heterocromáticas ricas em pares de base GC, mais fortemente coradas com CMA, e, pares de base AT, que coram mais fortemente com o DAPI (BARROS E SILVA & GUERRA, 2009). O uso dessa técnica foi considerado um importante avanço para os estudos de citogenética e citotaxonomia, por permitir um maior detalhamento do cariótipo (GUERRA, 2000a; EL-TWAB et al., 2011). Essa técnica pode ser utilizada na diferenciação de espécies e até mesmo populações, fornecendo um ajuda extra no entendimento das hipóteses filogenéticas, bem como auxiliar no entendimento das relações citotaxonômicas (GUERRA, 1989; 2008). Atualmente esse tipo de informação é amplamente utilizada para a resolução de questões taxonômicas e evolutivas em plantas (BENNETT & LEITCH, 2011).

Para a subtribo Pleurothallidinae, o único estudo sobre evolução cromossômica utilizando essa técnica foi realizado por Oliveira et al. (2015). Nesse trabalho constatou-se uma predominância de heterocromatina rica em GC, com padrões variáveis e uma acentuada bimodalidade nos cariótipos de uma subsecção do gênero *Acianthera*. Além disso, observou-se padrões de bandas característicos para alguns gêneros, como, por exemplo, em *Stelis* com pouca ou nenhuma heterocromatina detectável por essa técnica, sugerindo que a técnica poderá ser importante para o entendimento da evolução cariotípica da subtribo.

Neste trabalho foram analisadas por meio da técnica de coloração CMA/DAPI, nove gêneros e 23 espécies da subtribo Pleurothallidinae, com o intuito de ampliar a

quantidade de gêneros e espécies da subtribo analisadas com essa técnica. Com isso, buscamos responder as seguintes perguntas: 1) A variação de números cromossômicos e padrões de banda CMA/DAPI em Pleurothallidinae suporta a segregação de gêneros recentemente propostos com base em filogenia molecular? 2) A quantidade e distribuição de bandas CMA/DAPI é uniforme nesses gêneros? 3) *Stelis* e gêneros relacionados podem realmente ser caracterizados pela ausência ou quantidades muito pequenas de heterocromatina? Com isso esperamos contribuir para o melhor entendimento da filogenia de Pleurothallidinae e identificar os mecanismos envolvidos na evolução cariotípica da subtribo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Orchidaceae A.Juss.

A família Orchidaceae tem seu nome derivado do grego “*orchis*” (testículo), que faz uma alusão ao formato dos dois pequenos tubérculos presente nas espécies do gênero *Orchis* L. (PABST & DUNGS, 1975). São plantas de grande valor econômico para as grandes indústrias do setor da floricultura em diversos países, seja como planta viva ou flor de corte (ARDITTI, 1992; CRIBB & CHASE, 2005; SHARMA & MUKAI, 2015). Gêneros como *Phalaenopsis* Blume, *Cattleya*, *Dendrobium* SW., estão entre as mais procuradas e mais fáceis de serem encontradas no comércio. As orquídeas possuem importância na alimentação de alguns povos primitivos e até mesmo para a indústria alimentícia, como por exemplo, os tubérculos de *Orchis* L. e *Ophrys* L., que possuem um alto teor de amido e são consumidos como tonificante. Todavia, *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, é amplamente cultivada para a produção da baunilha, utilizada mundialmente a nível industrial, com a finalidade de aromatizar chocolates, doces e tortas (DUNSTERVILLE & GARAY, 1959; ARORA & KAPIL, 1989; MAY et al., 2008; SHARMA & MUKAI, 2015).

As orquídeas são importantes bioindicadores de degradação ambiental, pelo fato da sua especificidade do habitat. São, em sua maioria, plantas herbáceas perenes, epífitas, terrestre ou mesmo rupícola, gostam de ambientes variavelmente sombreados, possuem a mais variada morfologia floral e com crescimento monopodial ou simpodial (DRESSLER, 1993; SHARMA & MUKAI, 2015). Caracterizam-se pela presença de um perianto formado por dois verticilos trímeros (três pétalas e três sépalas), das quais uma das pétalas é modificada, denominada labelo (DRESSLER, 1993).

A família foi estabelecida por Jussieu, em 1789, na publicação de sua obra *Genera Plantarum* (JUSSIEU, 1789). Mas, antes disso, Linnaeus já havia descrito oito gêneros de orquídeas, incluindo o gênero *Epidendrum* L. que incluiu todas as espécies epífitas (LINNAEI, 1753). Alguns dos caracteres mais marcantes, como dependência específica de polinizador, endosperma rudimentar, minúsculas sementes, diferentes níveis de ploidia, propagação vegetativa, associação com fungos micorrizos, faz com que as orquídeas seja um objeto de estudo para vários cientistas de diversos países pelo mundo (SHARMA & MUKAI, 2015).

Ao longo dos anos, a família Orchidaceae vem passando por uma enorme reorganização taxonômica, sempre no intuito de diminuir o número de categorias taxonômicas e tornar o sistema cada vez mais simples possível (CHASE et al., 2003; PRIDGEON et al., 2005, 2009, 2014; CHASE et al., 2015). Além disso, a família se destaca pela riqueza da diversidade de espécies, com cerca de 27.800 espécies, distribuídas entre 899 gêneros, sendo amplamente distribuída pela crosta terrestre e ocupando o posto de segunda maior família dentre as Angiospermas, ficando atrás apenas de Asteraceae Bercht. & J.Presl (THE PLANT LIST, 2021). A cada ano que se passa diversas espécies e gêneros vem sendo descritos, embora, de acordo com Chase et al. (2015), a maioria destas espécies e gêneros são segregados dos já existentes. Claro que isto não é a regra, existem as exceções que com o uso de dados moleculares ajuda no entendimento das relações filogenéticas, suportando a descrição de novos táxons. O gênero *Devogelia* Schuit., por exemplo, é morfologicamente diferente de qualquer outro gênero da tribo Epidendroideae, enquanto *Danxiaorchis* JW Zhai, FW Xing e ZJ Liu difere dos demais membros de Calypsoinae (SCHUITMAN, 2004; ZHAI et al., 2013; CHASE et al., 2015).

No Brasil, ocorrem aproximadamente 2.690 espécies e 251 gêneros da família Orchidaceae, dos quais aproximadamente 1500 espécies e 251 gêneros são endêmicos. É distribuída nos ecossistemas de Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado, Caatinga e Pampa (BFG, 2015). A família Orchidaceae é subdividida em cinco subfamílias, Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae, compreende 22 tribos e 49 subtribos, (PRIDGEON et al. 1999; CHASE et al., 2015). Dentre as subfamílias, Epidendroideae é a de maior diversidade, correspondendo a aproximadamente 76% de todas as espécies da família. É subdividida em 16 tribos e 28 subtribos, das quais a tribo Epidendreae apresenta o maior número de espécies (FREUDENSTEIN & CHASE, 2015; CHASE et al., 2015; CHRISTENHUSZ, et al., 2016).

2.2 A subfamília Epidendroideae

A subfamília Epidendroideae é um grupo monofilético de distribuição principalmente pantropical, podendo ser encontradas em ambientes de clima temperado (CRIBB & CHASE, 2005; FREUDENSTEIN & CHASE, 2015). É um grupo

representado principalmente por orquídeas epífitas que apresenta vários caracteres derivados, tais como uma elevada diversidade da morfologia floral e a presença de polínias ou polinário (DRESSLER, 1993; CHRISTENSON, 2004). Caracteriza-se por apresentar antera incumbente, considerada a principal sinapomorfia para as espécies deste grupo, ou secundariamente ereta, ao contrário das demais subfamílias que possuem, de modo geral, anteras eretas (RASMUSSEN, 1982; DRESSLER, 1993; FREUDENSTEIN et al., 2002). Todavia, alguns membros da tribo Neottieae apresenta algum grau de inflexão da antera, que pode ser variável mesmo em grupos com antera tipicamente incumbente (FREUDENSTEIN & CHASE, 2015). Outra característica taxonomicamente importante é a constituição do polinário que, nesse grupo, consta de um número variável de polínias de consistência cerosa ou cartilaginosa (DRESSLER, 1993).

Embora a filogenia de Epidendroideae seja bem estudada em nível molecular, poucos trabalhos têm avaliado a citotaxonomia de forma exclusiva no grupo. Ao longo dos anos alguns trabalhos têm abordado cariologicamente diversos grupos de orquídeas, incluindo diversos gêneros da subfamília Epidendroideae (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2000, 2005; DAVIÑA et al., 2009). No entanto, Felix e Guerra (2010) revisando a citogenética da subfamília, indicaram $n = 21$ como o número mais recorrente dentre as orquídeas e provável número básico da família Orchidaceae. Na subfamília Epidendroideae $n = 19, 20, 21$ são os números mais frequentemente encontrados, sendo $x = 20$ o número básico mais provável para a maioria dos gêneros.

2.3 Variação Cromossômica

Apenas cerca de 10% das espécies de orquídeas têm contagem cromossômica determinada (SHARMA & MUKAI, 2015), entretanto, ao longo dos anos diversos estudos citogenéticos vêm sendo realizados nos mais diferentes grupos da família (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; AOYAMA et al., 1992; DAWSON et al., 2007; DAVIÑA et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2000, 2010; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA, 2018; PESSOA et al., 2020). A análise cromossômica nos traz o entendimento sobre a evolução cariotípica do grupo, lançando bases para elucidar as relações filogenéticas, taxonômicas, bem como suporte ao melhoramento de plantas (FELIX &

GUERRA, 2000, 2005; GUERRA & SOUZA, 2002), como em estudos nas famílias Rutaceae (GUERRA, 1993) e Cyperaceae (VANZELA, 2003).

Atualmente o número cromossômico básico mais provável para a família Orchidaceae é de $x = 7$, entretanto, em alguns grupos é notória uma constante ocorrência de dois números básicos como $x = 20$ e $x = 21$, fornecendo aporte para a hipótese de que o número básico primário para a família seja $x_1 = 7$, além de indicar prováveis mudanças genômicas (FELIX & GUERRA, 2000, 2005, 2010). Diante dos dados existentes na literatura, a variação cariotípica dentro da família Orchidaceae é bem marcante, os registros mostram uma variação cromossômica variando desde $2n = 10$ em *Erycina pusilla* (L.) N.H. Williams & M.W. Chase até $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (FELIX & GUERRA, 1999, 2010; ASSIS et al., 2013; YEH et al., 2015). Entretanto, $2n = 40$ é o número cromossômico que mais ocorre na subfamília Epidendroideae (FELIX & GUERRA, 2000, 2010; ASSIS et al., 2013; OLIVEIRA et al. 2015; PESSOA et al., 2020).

Em trabalho citogenético realizado em espécies argentinas da família Orchidaceae, Daviña et al. (2009) observaram uma variação cromossômica de $2n = 25$ para *Eltroplectris schlechteriana* (Porto & Brade) Pabst a $2n = 108$ para *Catasetum fimbriatum* (C. Morren.) Lindl. & Paxton e *Oncidium bifolium* Sims. No mesmo estudo, foram encontradas espécies com cariótipo bimodal, assim como também espécies poliploides nas subfamílias Orchidoideae com $2n = 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 56, 64$ e Epidendroideae com $2n = 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 46, 48, 50, 52, 54, 56$ são predominantes, embora $2n = 60$ (*Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl.), $2n = 84$ (*Oncidium pubes* Lindl.), $2n = 108$ (*Oncidium bifolium* Sims) também ocorreram.

Análises cariológicas em espécies do gênero *Epidendrum* com ênfase no subgênero *Amphiglottium* desenvolvidas por Assis et al. (2013) observou-se que o número cromossômico variou desde $2n = 24$, em *E. fulgens* Brongn., a $2n = 240$, em *E. cinnabarinum* Salzm. Ao construir uma árvore filogenética baseada na máxima verossimilhança, observaram que o mais provável número primário básico para o gênero seria $x = 10$. Esse número, seria o mais parcimonioso para explicar a relação de *Epidendrum* com as demais espécies da subtribo Laeliina. No entanto, para o subgênero *Amphiglottium*, $x = 12$ provavelmente representa o seu número básico (ASSIS et al., 2013).

2.4 Evolução Cariotípica

Qualquer estudo biológico, por mais básico que seja, tem por finalidade direta ou indireta de buscar entender a evolução como um fenômeno fundamental aos seres vivos (STEBBINS, 1971; GUERRA, 1988) e a análise cariotípica é uma das chaves para o entendimento dessa evolução. O cariótipo se refere às características fenotípicas do conjunto cromossômico, podendo ser analisado em qualquer uma das fases do ciclo celular, sendo que é preferencialmente analisado na mitose e no estado metafísico (GUERRA, 1988; GUERRA & SOUZA, 2002).

Ao analisar o cariótipo de uma espécie ou um grupo, são avaliados diversos caracteres, como: variabilidade do número cromossômico e os níveis de ploidia e disploidia, a dimensão absoluta (μm), a morfologia e as características na coloração, as ditas distribuição e padrões de bandas heterocromáticas (SHARMA & SEN, 2002). Essas características fazem parte do processo evolutivo (GREILHUBER & EHRENDORFER, 1988; SUMNER, 2003; GUERRA, 2012), que além de possibilitar uma comparação entre os diferentes cariótipos, dos mais diferentes táxons, possibilita uma melhor compreensão da divergência evolutiva entre as espécies (GUERRA, 2008). Portanto, a obtenção de dados cariológicos são informações importantes e servem fundamentalmente como aporte para a sistemática de plantas e nas análises filogenéticas e evolutivas (STACE, 2000; CRAWFORD et al., 2005).

Dentre as características observadas e analisadas no cariótipo, destaca-se o estudo da variação numérica cromossômica. De acordo com Guerra (1988), ela pode ou não variar dentro de diferentes células do mesmo indivíduo, que pode ou não ocorrer de forma programada. Essa variação faz parte da programação genética do indivíduo, sendo encontrada em todos eles e até mesmo dentro da população, como por exemplo, na espécie humana que possui uma variação de $n = 23$ nos gametas, $2n = 46$ na maioria das células teciduais e $2n = 92, 184$ ou mais nos hepatócitos, assim como em abelhas que varia de n nos machos e $2n$ nas fêmeas (GUERRA, 1988). As variações cromossômicas não programadas são de maior interesse do ponto de vista evolutivo, além disso, quando comparado com um cariótipo normal, elas podem ser mutações gênicas do tipo vantajosa, neutra e desvantajosa. As variações cromossômicas vantajosas e neutras, de acordo com Guerra (1988), são mantidas dentro da população e transmitidas para seus descendentes, contribuindo naturalmente e de forma positiva para a evolução cariotípica das espécies, sendo

denominada de polimorfismo cromossômico, que consiste na existência de duas ou mais formas diferentes para o mesmo cromossomo, por exemplo estrutural e numérico. Já a variação cromossômica desvantajosa é a exceção do grau de importância evolutiva, pois ela é ligeiramente eliminada das populações e não apresenta nenhum significado evolutivo.

Neste estudo será abordado os dois mecanismos mais importantes para a evolução e diferenciação cariotípica em plantas: Poliploidia e a Disploidia (GUERRA, 2000). A poliploidia se dá pelo fato da duplicação ou multiplicação do complemento cromossômico inteiro (GUERRA, 2008). Quanto a disploidia, ela está relacionada às alterações nos níveis de simetria do complemento cromossômico e aos aspectos da variação cromossômica numérica em grupos filogeneticamente próximos, que podem resultar na diminuição ou aumento do conjunto cromossômico, sendo caracterizada como disploidia descendente e ascendente, respectivamente. (GUERRA, 1988, 2008).

As mudanças ocasionadas pela disploidia acarreta na formação de uma série cromossômica disploide, podendo ser observada nos mais diferentes gêneros de plantas. Como por exemplo no gênero *Melampodium* L. (Asteraceae), que possui uma série disploide de $n = 9, 10, 11, 12, 14$ e, a partir de análises moleculares, foi mostrado que o número básico primário mais basal seria $x = 11$, portanto sendo um forte indicativo atuação da disploidia ascendente e descendente ao longo do seu processo evolutivo (STUESSY et al., 2011).

A poliploidia pode ser encontrada em aproximadamente 80% das Angiospermas, podendo chegar a 100% se for levado em consideração os antigos eventos de duplicação, sendo considerado como um dos principais fatores evolutivos, fazendo com que ocorra a especiação simpátrica e a diversificação nas plantas (MASTERSON, 1994; OTTO & WHITTON, 2000; WENDEL, 2000; CUI et al., 2006, SOLTIS & SOLTIS, 2009). A poliploidia pode ser dividida em basicamente dois tipos: autopoliploide e alopoliploide. A autopoliploidia é quando ocorre a duplicação ou multiplicação do material genético da espécie e essas cópias extras são oriundas do próprio genoma do indivíduo (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998, 2002). Já a alopoliploidia é a multiplicação de conjuntos cromossômicos que acompanham a hibridização entre espécies ou subespécies geneticamente diferentes (STEBBINS, 1971; HUSBAND et al., 2013). No entanto, a autopoliploidia geralmente é considerada

mais aceitável do que a aloploidia devido à sua tendência em garantir meiose regular com a formação de bivalentes e segregação normal (SOUZA, 2012). Por outro lado, os aloploidos têm maior probabilidade de formar multivalentes complexos na meiose, o que pode levar a uma segregação anormal e à produção de gametas desequilibrados (SOUZA, 2012). Portanto, os autopoliploides e aloploidos diferem em relação ao grau de semelhança filogenética entre os genomas envolvidos no cruzamento, podendo haver condições intermediárias com genomas parcialmente similares (SOLTIS & SOLTIS 2009).

Em trabalho realizado por Felix e Guerra (2010), ao analisarem a variação cariotípica em 22 gêneros e 44 espécies de Epidendroideae e revisaram os números cromossômicos conhecidos para a subfamília, constaram uma variação cromossômica numérica de $2n = 24$ em *Malaxis pubescens* (Lindl.) Grubov a $2n = c. 240$ em *Epidendrum cinnabarinum*. Assim, os números básicos mais prováveis para os gêneros foram $x = 15, 19, 20, 21, 25$, sendo que ocorre amplamente $x = 19$ e $x = 20$ na subfamília Epidendroideae e $x = 21$ em pelo menos um gênero de cada tribo. A hipótese sugere poliploidia como sendo $n = 7, 14, 21$, podendo ocorrer variação de ± 1 em cada nível de ploidia (FELIX & GUERRA, 2005), sugerindo a ocorrência de disploidia descendente na maioria das tribos da subfamília ($x = 21, 20, 19$) e disploidia ascendente na subtribo Angraecinae s.l. ($x = 25$).

2.5 Citotaxonomia e Bandeamento Cromossômico

A citotaxonomia, ou cariosistemática, tem como objetivo estudar as variações estruturais, numéricas e moleculares dos cromossomos de modo a se obter informações que sejam aplicadas a taxonomia (STACE, 1989). Dentre os critérios citotaxonômicos, o número cromossômico é o mais difundido para muitos táxons e, portanto, o mais utilizado como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos (GUERRA, 2008; GUIMARÃES, 2014). Além de ser o mais utilizado pela facilidade e reprodutibilidade de suas informações, número cromossômico constituiu um avanço importante para a filogenia e taxonomia de alguns grupos, sendo uma informação importante na caracterização de gêneros e famílias (veja, por exemplo, CHRISTENHUSZ et al., 2017). Desta forma, determinar os números cromossômicos tem sido uma ferramenta de grande importância para a sistemática e estudos

filogenéticos, complementar as informações obtidas por métodos morfológicos e moleculares, por caracterizar genomas poliploides e outras alterações genômicas importantes que nem sempre são visíveis em outras abordagens (GUERRA, 2008).

A utilização de técnicas de coloração convencional mais utilizada em estudos do cariótipo, é, entretanto, pouco informativa na diferenciação de táxons com número e morfologia cromossômicas similares (GUERRA, 2000a). Para grupos com essas características, são utilizadas técnicas de coloração diferencial. Entre essas técnicas, a coloração com os fluorocromos CMA (Cromomicina A₃) e o DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), é atualmente a mais empregada em estudos de citotaxonomia.

Heitz (1928) foi quem descreveu a porção heterocromática, diferenciando-a da porção eucromática, tendo como base a compactação diferencial ocorrida na interfase. A eucromatina é de fácil acesso, menos condensada e normalmente mais facilmente transcrita, enquanto a heterocromatina é inacessível, fortemente condensada e organizada em matrizes nucleossômicas (HUISINGA et al., 2006). A heterocromatina contém diversos tipos de informações, como sua localização no cromossomo, localização nuclear e a presença de elementos de DNA repetitivo (WEILER & WAKIMOTO, 1995; BIRCHLER et al., 2000; HALL & GREWAL, 2003).

De acordo com estudos sobre as sequências e análises citogenéticas, eles sugerem que a heterocromatina em plantas tenha diferentes origens, composição e dinâmica (FRANSZ et al., 2000). A heterocromatina está localizada preferencialmente na região pericentromérica e telomérica dos cromossomos, tem replicação tardia ocorre na fase S, é composta principalmente por DNA repetitivo (satélite e blocos de sequências repetitivas) e tem baixa densidade genética. Tem localização nuclear muitas vezes agrupada (na periferia nuclear, em torno dos nucleolos), recombinação meiótica indetectável, extensiva metilação do DNA, baixa acetilação da histona, espaçamentos dos nucleossomos regular e baixa acessibilidade da nuclease (EISSENBERG & ELGIN, 2005). Outra característica importante é o papel fundamental que a heterocromatina desempenha na repressão de elementos transponíveis e como componente estrutural dos cromossomos (LAMB et al., 2007). A formação da heterocromatina tem como principal foco as regiões cromossômicas de elevada densidade de DNA repetitivo, elementos como clusters de sequências dos satélites e elementos transponíveis, que são encontrados nos centrômeros e telômeros (BIRCHLER et al., 2000; HALL & GREWAL, 2003; MARTENS et al., 2005).

A heterocromatina pode ser classificada como facultativa (HF) e constitutiva (HC). A heterocromatina facultativa é encontrada em *loci* regulados pelo desenvolvimento, o estado da cromatina pode mudar em respostas aos sinais e atividade genética (GREWAL & JIA, 2007). Nesse caso, não é necessariamente restrita a um cromossomo do par, sendo consideradas regiões epigeneticamente reprimidas, que se comportam como heterocromatina apenas durante uma parte do ciclo de vida (SUMNER, 2003). Um exemplo clássico de heterocromatina facultativa é a inativação de um cromossomo X em fêmeas de mamíferos ocasionada por uma ampla variação de modificações de histonas (CHADWICK & WILLARD, 2004). Quanto a HC, ela é representada por aquelas regiões que permanecem condensadas ao longo do ciclo celular, ricas em sequências repetidas em tandem e transposons, em que seu estado heterocromático é uma característica cromossômica herdável, que ocorre no par cromossômico homólogo (PEDROSA et al., 2001; PARTRIDGE et al., 2002; GREWAL & JIA, 2007).

De acordo com Guerra (2000b), a heterocromatina constitutiva pode não ter o mesmo significado funcional e evolutivo para todas as espécies, e que pode não existir apenas um único padrão de distribuição para todas as angiospermas, mas apenas tendências ou padrões preferenciais para diferentes genomas e estruturas do cariótipo. Desta forma, o emprego de técnicas citológicas convencionais, é possível identificar apenas a HC associada à região organizadora de nucléolo (RON-HC), pela impregnação com nitrato de prata que cora diferencialmente as RONS ativas. Por outro lado, a técnica de bandeamento com Giemsa, além de reconhecer as RONS ativas, reconhece toda a heterocromatina constitutiva (GUERRA, 2000b). Em seu conjunto, todas essas técnicas utilizadas para a localização das porções heterocromáticas do genoma, possuem amplo emprego, pois permite uma análise mais detalhada do conjunto cromossômico, principalmente em grupos de plantas que não apresentam variabilidade no número e na morfologia cromossômica (BARROS E SILVA & GUERRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2015).

Ao longo dos anos muitas técnicas têm sido aprimoradas para a visualização da heterocromatina, pela utilidade do bandeamento cromossômico na caracterização de cariótipos (SUMNER, 2003). Frequentemente o uso de fluorocromos como o CMA ou DAPI, são usados na localização, quantificação e composição das regiões ricas em heterocromatina (GUERRA, 2000b; EL-TWAB et al., 2011), processo chamado de

bandeamento CMA/DAPI. Por meio desta técnica distingue-se alguns tipos de HC, pelo fato dos fluorocromos serem base específicos. Regiões coradas mais fortemente com DAPI correspondem a porções do genoma mais ricas em pares de base AT, enquanto regiões coradas mais fortemente com CMA são mais ricas em GC (SCHWEIZER & AMBROS, 1994; SUMNER, 2003).

A identificação de polimorfismos e variantes quanto aos padrões de bandas heterocromáticas, em linhagens vegetais numericamente 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). Entretanto, estas informações podem ser empregadas nas avaliações das relações genéticas entre as espécies e/ou populações, concedendo um aporte adicional para hipóteses filogenéticas, bem como contribuir para o entendimento das relações citotaxonômicas (GUERRA, 1989; 2008). No gênero *Spondias* L., Almeida et al. (2007) buscaram estudar a origem do suposto híbrido Umbu-Cajá (*Spondias* sp.), com o objetivo de esclarecer uma suposta hibridização entre o Umbu (*S. tuberosa* Arruda Câmara) e o Cajá (*S. mombin* L.). Todas as espécies apresentaram o mesmo número cromossômico ($2n = 32$) e morfologias cariotípicas muito semelhantes. Todavia, as espécies apresentaram diferenças importantes na fração heterocromática. O suposto híbrido, Umbu-Cajá, diferenças no padrão de bandas CMA/DAPI que não suportaram *S. tuberosa* e o *S. mombin* como seus parentais mais prováveis.

Outro exemplo de como a citogenética oferece um importante aporte para a citotaxonomia, é a descoberta e identificação de um novo táxon para o gênero *Gomesa* R.Br., realizado (CORDEIRO et al., 2018). *Gomesa caatingana* J.M.P.Cordeiro, L.P.Felix & M.W.Chase, táxon morfológicamente muito semelhante a *G. flexuosa* (Lodd.) M.W.Chase & N.H.Williams, diferiu desta última por apresentar número cromossômico claramente distintos.

2.6 A subtribo Pleurothallidinae

Dentre as 16 tribos e 28 subtribos de Epidendroideae, na tribo Epidendreae, as subtribos Laeliinae e Pleurothallidinae, se destacam por apresentar os maiores números de espécies (CHASE et al., 2015; CHRISTENHUSZ et al., 2016). Assim,

como boa parte das orquídeas, as Pleurothallidinae despertam o interesse comercial por serem pequenas e apresentarem flores de formatos curiosos, e especialmente grandes em relação ao tamanho das plantas, como nos gêneros *Masdevallia* Ruiz & Pav. e *Dracula* Luer. São plantas usualmente epífitas, podendo ocorrer em ambientes rupícolas ou terrestres (LUER, 1986). Apresentam crescimento simpodial, rizoma curto ou mais ou menos rastejante, ramicaules sem pseudobulbos, unifoliados, inflorescências terminal ou raramente lateral, simples ou fasciculada, folhas principalmente coriáceas conduplicadas, e flores com uma articulação entre o pedicelo e o ovário (PRIDGEON & CHASE, 2003).

De acordos com estudos filogenéticos realizados por Chase et al. (2015), Pleurothallidinae passou a abranger um total de 38 gêneros, diferentemente do que outros trabalhos vinham propondo (PRIDGEON & CHASE, 2001; PRIDGEON et al., 2005). Todavia, análises filogenéticas mais recentes, aliadas a descrição de novos táxons, têm ampliado esses números para 44 gêneros e 5.114 espécies (KARREMANS, 2016), o que representa, em termos de espécies, 18,4% de toda a família Orchidaceae.

As Pleurothallidinae possuem distribuição neotropical, com principais centros de distribuição concentrado nas florestas úmidas de alguns países da América do Sul e Central, além da Mata Atlântica do Brasil (PRIDGEON, 1982a, 1982b; LUER, 1986; NEYLAND et al., 1995; PRIDGEON et al., 2005). No Brasil, ocorrem 22 gêneros e cerca de 600 espécies, dos quais 491 são endêmicas, distribuídas principalmente na Mata Atlântica, mas com ocorrência na Amazônia e Cerrado (BFG, 2015).

Ao longo dos anos a subtribo Pleurothallidinae vem passando por diversas reorganizações taxonômicas, resultante das várias análises filogenéticas que são baseadas em sequências de DNA nuclear e plastidial (PRIDGEON et al., 2001; PRIDGEON & CHASE, 2001, 2003; LUER, 2007; CHASE & PRIDGEON, 2001; BARROS, 2005; CHIRON & van den BERG, 2012; CHASE et al., 2015; KARREMANS, 2016). Essas novas propostas de tratamento taxonômico têm gerado bastante polêmica principalmente entre os taxonomistas convencionais, pois contrariam sistemas de classificação tradicionais baseados em caracteres morfológicos, que resultaram algumas vezes em tratamentos não monofiléticos (ver, LUER, 1986). Essas hipóteses de filogenia têm resultado na ampliação dos 29 gêneros de Pleurothallidinae, conforme a classificação de Luer (1986), para os 38 gêneros

proposto por Chase et al., 2016, e mais recentemente 44 gêneros KARREMANS, 2016. Todavia, de acordo com Chase et al. (2015), o intuito dos trabalhos filogenéticos deveria ser o de estreitar cada vez mais o número de categorias taxonômicas, o que facilitaria a memorização e o aprendizado da comunidade científica.

Para a subtribo Pleurothallidinae, o estudo da variabilidade cromossômica, assim como em outros grupos de plantas, pode ajudar no entendimento da evolução filogenética e na delimitação de determinadas linhagens da. Em termos cariológicos, as informações que se têm sobre subtribo Pleurothallidinae é fragmentada e insuficiente. Há registro de número cromossômico para cerca de 70 espécies, o que equivale a cerca de 1,4% das espécies da subtribo (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA, 2018). Todavia, desde a publicação do trabalho de Oliveira et al. (2015), com as muitas descrições de novas espécies para a subtribo, o número de espécies aumentou das 4.600 espécies referidas por Chase et al. (2015) para as 5.114 referidas por Karremans (2016). Nesse sentido, muitas das propostas de tratamento taxonômico propostos para a subtribo necessitam ser corroborados com a citotaxonomia, o que representa uma tarefa gigantesca. No entanto, apenas 21 espécies possuem uma análise mais detalhada destes cromossomos, como o detalhamento sobre a composição heterocromática, que pode ser observado por meio do uso de fluorocromos (OLIVEIRA et al., 2015; SILVA, 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Documentação Botânica

As espécies analisadas neste trabalho são oriundas de coletas realizadas em diferentes regiões fisiográficas do Brasil. Todo esse material foi mantido em cultivo no Jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias – *Campus II*, na cidade Areia-PB, Brasil. De todo o material analisado foram preparadas exsicatas depositadas no Herbário Jaime Coelho de Moraes (EAN). Foram analisadas 23 espécies, pertencentes a nove gêneros da subtribo Pleurothallidinae. Na Tabela 1 encontram-se sumarizadas todas as espécies analisadas, juntamente com os voucheres e de locais de coleta.

3.2 Análise Cromossômica

Para as preparações cromossômicas foi utilizado o protocolo proposto por Guerra & Souza (2002), que consiste na utilização de pontas de raízes. Inicialmente as pontas das raízes foram pré-tratadas com os antimitóticos 1,4-Diclorobenzeno (Paradiclorobenzeno) por 4 horas ou com 8-hidroxiquinoleína (8Hq) por 24 horas, ambos tratamentos mantidos na geladeira a 10 °C. Posteriormente, as pontas de raízes foram fixadas em Carnoy (3:1 – etanol: ácido acético), permanecendo nesta solução por 2-24 horas, à temperatura ambiente, estocadas em freezer a -20°C até o preparo das lâminas. As raízes foram digeridas em uma solução enzimática contendo 2% celulase e 20% pectinase a 37°C por 40-60 minutos, esmagadas em ácido acético 60%. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente.

3.3 Coloração com Fluorocromos CMA/DAPI

Após envelhecimento, as lâminas foram coradas por meio do protocolo proposto por Vaio et al. (2018). Foi utilizado 10 µL de CMA (Cromomicina A₃) (0,1 mg/ml) por uma hora em câmara escura, e em seguida, as lamínulas foram removidas com um jato de água destilada e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 12 µL de DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) (1 µg/ml) com meio de

montagem e tampão Mcllvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). Após a montagem as lâminas foram estocadas em câmara escura, a temperatura ambiente por no mínimo três dias. As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio *Zeiss* com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o *software* Axiovision 4.8. As imagens foram processadas com auxílio do Photoshop CS6.

4 RESULTADOS

4.1 Números Cromossômicos

Baseado na filogenia proposta por Karremans (2016), foram plotados os números cromossômicos haploides conhecidos para subtribo Pleurothallidinae, incluindo os descritos neste trabalho. Observa-se que há variabilidade cromossômica numérica do conjunto haploide dentro e entre os gêneros, desde os mais basais até os mais derivados (Figura 4). No entanto, aparentemente a variabilidade cromossômica numérica é mais acentuada a partir do gênero *Acianthera*. O número cromossômico varia de $n = 6$ no gênero *Andinia* (Luer) Luer a $n = 45$ no gênero *Pleurothallis* R.Br.

Foram analisadas através da coloração com os fluorocromos CMA/DAPI nove gêneros e 26 representantes da subtribo Pleurothallidinae (Tabela 1). De modo geral, as espécies analisadas aparentam possuírem cromossomos pequenos, simétricos e variando de tamanho gradativamente. Em *Acianthera fockei* (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase com $2n = 38$ (Figura 1B) e *A. prolifera* (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase com $2n = 44$, observou-se, respectivamente, um conjunto de 14 e 20 cromossomos claramente maiores e mais fortemente corados, o que caracteriza uma bimodalidade mais acentuada para essas espécies. Para as demais espécies do gênero *Acianthera* Scheidw. a coloração foi uniformemente distribuída por todos os cromossomos de ambos os complementos monoploides.

Para o gênero *Acianthera*, foram confirmadas as contagens prévias de $2n = 40$ para *A. capillaris* (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase (Figura 1A) e *A. panduripetala* (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase (Figura 1C), $2n = 44$ para *A. prolifera* (Figura 1C), e $2n = 38$ para *A. macuconensis* (Barb.Rodr.) F.Barros (Figura 1E). Por outro lado, as contagens de $2n = 38$ para *A. prolifera* e $2n = 36$ para *A. saundersiana* (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase divergiram das nossas contagens para essas espécies (Tabela 1). Para os demais gêneros, todas as contagens prévias foram confirmadas, com exceção da contagem prévia de $2n = 40$ para *Masdevallia infracta*, que divergiu da nossa contagem de $2n = 36$ para uma outra população dessa mesma espécie. Para as espécies *Acianthera fockei* (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase com $2n = 38$, *Myoxanthus exasperatus* (Lindl.) Luer com $2n = 38$, uma *Octomeria* sp. com $2n = 32$, *Pabstiella rubrolineata* (Hoehne) Luer com $2n = 28$ e *Stelis concava* M.R.Miranda, S.G.Furtado & Menini, todas apresentaram contagens inéditas (Tabela 1).

4.2 Bandas Heterocromáticas

A distribuição de bandas heterocromáticas conhecidas para subtribo Pleurothallidinae, baseada na filogenia está ilustrada na figura 4. Com base no levantamento de dados, incluindo este trabalho, pode-se observar que há a ocorrência de diferentes tipos de bandas heterocromáticas na subtribo, sendo predominante desde os gêneros mais basais até os mais derivados os tipos CMA⁺/DAPI⁻ terminal, CMA⁺/DAPI⁻ pericentromérica e CMA⁺/DAPI⁰ pericentromérica. Enquanto que as bandas DAPI⁺/CMA⁻ terminal, DAPI⁺/CMA⁻ pericentromérica e DAPI⁺/CMA⁰ pericentromérica surgem a partir gênero *Acianthera* e em apenas mais três gêneros, *Anathallis* Barb.Rodr., *Stelis* e *Pabstiella*.

Neste trabalho, a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI mostrou quatro tipos de heterocromatina: bandas CMA⁺/DAPI⁻, CMA⁺/DAPI⁰, DAPI⁺/CMA⁻ e DAPI⁺/CMA⁰ (Tabela 1), localizadas nas regiões pericentromérica e terminais de um número variável de cromossomos. Para o gênero *Acianthera*, as regiões mais fortemente coradas com DAPI foram observadas ocupando a maior parte de ambos os braços cromossômicos de *A. panduripetala* (Figura 1C), nas regiões proximais do conjunto cromossômico maior de *A. prolifera* (Figura 1D), e em um ou em ambos terminais cromossômicos de *A. saundersiana* (Figuras 1F-G). Bandas DAPI discretas foram observadas em *A. capillaris* (Figura 1A) e em alguns cromossomos de *Acianthera* sp.1 (Figura 1H). Bandas CMA foram, em geral, mais discretas para todas as espécies analisadas de *Acianthera*. Essas foram principalmente restritas às RONS heterocromáticas localizadas nos terminais de um par cromossômico, além de algumas bandas pericentroméricas discretas, localizadas em um ou poucos pares cromossômicos de algumas espécies do gênero *Acianthera* (Tabela 1). Todavia, para *Acianthera fockei* observou-se grandes blocos de heterocromatina rica em GC ocupando a quase totalidade dos braços cromossômicos do conjunto de cromossomos maior.

Para os demais gêneros, foram observados grandes blocos DAPI⁺ na região proximal de um ou de ambos os braços cromossômicos de *Specklinia grobyi*, enquanto bandas DAPI⁺ menores foram visualizadas na região proximal de um ou de poucos cromossomos de *Pabstiella rubrolineata* (Fig. 2E), *Specklinia picta* (Fig. 2I) e *Stelis* sp.3 (Fig. 3H). Grandes blocos CMA⁺ ocupando total ou parcialmente os braços

cromossômicos foram visualizados em *Masdevallia infracta* (Fig. 2D), *Specklinia picta* (fig. 2I) e *Stelis* sp. 3 (Fig. 3H). As demais espécies apresentaram pelo menos um par de bandas CMA proximal ou terminal correspondendo à RON heterocromática, exceto *Acianthera prolifera*, *Stelis aprica* (Fig. 2B), *S. loefgrenii* (Fig. 2E) e *Stelis* sp. 1 (Fig. 2F), que não apresentaram heterocromatina rica em GC visível. Bandas CMA proximais pequenas foram observadas nas regiões proximais dos cromossomos de *Stelis concava* (Fig. 3C) e *Masdevallia infracta* (Fig. 2C).

5 DISCUSSÃO

5.1 Variação Cromossômica

Dentre os 44 gêneros e cerca 5.100 espécies descritos para Pleurothallidinae (KARREMANS, 2016), são conhecidos registros cromossômicos para apenas 13 gêneros e 69 espécies (OLIVEIRA et al. 2015). Somando-se com os resultados de números cromossômicos do presente trabalho (um gênero e cinco espécies), totalizou-se 31,8% do total de gêneros e 1,45% do total de espécies da subtribo. Apesar da baixa representatividade de espécies analisadas, é notável a variabilidade cromossômica numérica, com registros desde $2n = 18$ para uma espécie indeterminada de *Pleurothallis*, coletada em Vitória da Conquista, Bahia, até $2n = 84$ para *Pleurothallis bivalvis* Lindl., uma espécie de ampla ocorrência desde o México até o norte da América do Sul (WCSP, 2021). Esses extremos de variação suportam a ideia de que a subtribo é numericamente variável, uma condição que muitas vezes não é observada em outras subtribos de Epidendreae, como na subtribo Laeliinae, onde alguns gêneros são notavelmente estáveis para números cromossômicos (ver, por exemplo, FELIX & GUERRA, 2010; QUERINO et al., 2020).

Algumas famílias de plantas possuem números cromossômicos variáveis entre gêneros. Alstroemeriaceae Dumort., por exemplo, cada gênero é caracterizado por um único número básico, como $x = 8$ para *Alstroemeria* L. e $x = 9$ para *Bomarea* Mirb. (CHACÓN ET AL., 2012). Em Pleurothallidinae, o gênero *Specklinia* com $2n = 20$ para todas as espécies analisadas e *Stelis* com números variando de $2n = 28$ a $2n = 32$, são grupos de Pleurothallidinae com números básicos mais facilmente detectáveis. O mesmo pode ser aplicado ao gênero *Acianthera* que tem forte predomínio de $2n = 40$, um número também compartilhado com outros gêneros da tribo Epidendreae (FELIX & GUERRA, 2010). Este é o mais bem amostrado gênero da subtribo Pleurothallidinae, com número básico $x = 20$ e números cromossômicos variando deste $2n = 36$ para uma população previamente analisada de *A. saundersiana*, até $2n = 48$ para *A. welsiae-windischiae* (Pabst) Pridgeon & M.W.Chase, o que confere a este gênero a maior série dispolide conhecida para a subtribo. Entre as espécies analisadas, *Acianthera fockei*, com cariótipo aparentemente assimétrico, corrobora com a bimodalidade observada por Oliveira et al. (2015) para duas outras espécies da subseção *Pectinata*. Espécies híbridas como *Milium vernale* M.Bieb. (BENNETT et al., 1992), *Emilia fosbergii* Nicolson (MORAES & GUERRA, 2010), de outras

famílias de angiospermas, muitas vezes apresentam cariótipo bimodal. Essa bimodalidade cariotípica está relacionada ao cariótipo dos parentais que apresentam tamanhos cromossômicos claramente distintos. Em *Acianthera*, a bimodalidade observada para três espécies de uma mesma secção, pode estar relacionada a uma origem híbrida para toda essa linhagem. Linhagens híbridas com cariótipo bimodal têm sido observadas em outros grupos de plantas distantemente relacionadas. A subfamília Agavoideae (Agavaceae Dumort.), por exemplo, tem sua bimodalidade cariotípica por um único evento de hibridização ancestral (MCKAIN et al., 2012).

Variações numéricas intraespecíficas observadas para *Acianthera prolifera* e *Masdevallia infracta*, em que nossas contagens divergiram de contagens prévias para essas espécies, são compatíveis com variações intraespecíficas observadas em outros grupos de plantas. Como por exemplo no gênero *Habenaria* Willd., em que *H. obtusa* Lindl. que apresentou populações diploides com $2n = 50$ e populações tetraploides com $2n = 100$ (FELIX & GUERRA, 2005). Para o gênero *Anthurium* Schott da família Araceae Juss., *A. gracile* (Rudge) Schott apresentou uma única população da Bahia com $2n = 30$ e duas outras populações, uma da Paraíba e outra de São Paulo, com $2n = 40$ (NASCIMENTO et al., 2020). Em nosso caso e também para os registros da literatura não foram observadas diferenças significativas na morfologia dos diferentes citótipos.

5.1 A variabilidade da Heterocromatina

A quantidade, distribuição e composição das bandas heterocromáticas variaram entre e dentro dos diferentes gêneros de Pleurothallidinae. No gênero *Acianthera*, por exemplo, a única espécie com cariótipo bimodal se destacou das demais por apresentar grandes blocos de heterocromatina rica em GC restrita ao conjunto de cromossomos grandes. Esse mesmo padrão de coloração foi previamente observado em outras duas espécies do gênero por Oliveira et al. (2015), indicando que esse grupo de plantas forma uma linhagem caracterizada por apresentar cariótipo bimodal com variável número de grandes blocos CMA⁺. Para três outras espécies de *Acianthera* (*A. panduripetala*, *A. prolifera* e *A. saundersiana*) houve o predomínio de grandes blocos de heterocromatina rica em AT com distribuição pericentromérica em *A. panduripetala* e *A. prolifera* ou terminal em *A. saundersiana*). São plantas caracterizadas por apresentar rizoma longo e folhas crassas, de formato variável, e

que tem sua ocorrência relacionada a ambientes mais secos, podendo ocorrer em ambientes de matas úmidas de altitude e no Sul do Brasil. Para as demais espécies a distribuição das bandas CMA foi mais variável e não foi possível correlacionar com nenhuma variante ambiental ou taxonômica.

Para os demais gêneros, foi notável a presença de grandes blocos CMA⁺ como em alguns cromossomos de *Masdevallia infracta*. Curiosamente, na análise prévia do padrão de bandas de uma outra população da Bahia (OLIVEIRA et al., 2015), distante menos de 100Km da população de Santa Teresinha, Bahia, analisada aqui, foi observado um padrão de bandas distinto, com apenas um par de bandas CMA terminal. Bandas CMA têm uma evolução reconhecidamente rápida, por se tratar de regiões destituídas ou pobres de genes (Dillon, 2004). Em vegetais, embora pouco comum, algumas espécies podem apresentar regiões heterocromáticas com padrões de bandas variáveis dentro de uma mesma espécie, em diferentes populações. Em *Anthurium gracile*, por exemplo, populações com o mesmo ou com diferentes números cromossômicos apresentaram padrões de bandas distintos (NASCIMENTO et al., 2020).

Para o gênero *Specklinia*, com duas únicas espécies analisadas até o presente, *S. grobyi* e *S. picta* foram caracterizadas por apresentar grandes blocos de heterocromatina rica em AT associados a bandas CMA menores. O gênero *Specklinia* é atualmente composto por aproximadamente 100 espécies e sua delimitação tem sido bastante controversa entre diferentes autores. O gênero *Specklinia* tem sido relacionado aos gêneros *Andinia*, *Dryadella* Luer, *Muscarella* Luer, *Platystele* Schltr., *Scaphosepalum* Pfitzer, *Specklinia* Lindl. e *Teagueia* (Luer) Luer (KARREMANS, 2016). Entretanto, para a subtribo Pleurothallidinae, $2n = 20$ tem sido referido apenas para *S. concava* M.R.Miranda, S.G.Furtado & Menini. Esse número, além de um padrão de bandas caracterizado por apresentar grandes blocos DAPI⁺ associados às bandas CMA pericentroméricas, poderia representar sinapomorfias para o gênero. Em *Specklinia grobyi* as bandas DAPI pericentroméricas estão distribuídas por todos os cromossomos do complemento, enquanto em *S. picta*, um par cromossômico não possui bandas DAPI e, em seu lugar, apresenta um grande bloco CMA⁺. Padrões de bandas CMA/DAPI distintos, têm sido amplamente empregados na separação de espécies proximamente relacionadas, como na distinção de espécies e híbridos cultivados de *Citrus* L. (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007), diferentes espécies de

Brassavola R.Br. da família Orchidaceae (QUERINO et al., 2020) e *Leucocoryne* Lindl. da família Amaryllidaceae J.St.-Hil. (SOUZA et al., 2015).

Os gêneros *Myoxanthus* Poepp., *Octomeria* R.Br., *Pabstiella* Brieger & Senghas e *Pleurothallis* R. Br., foram pouco representados em número de espécies. Quanto ao gênero *Stelis*, foram analisadas oito espécies. Em uma análise prévia de outras oito amostras do gênero *Stelis*, observou-se a ocorrência de pouca ou nenhuma heterocromatina detectável pela técnica de coloração CMA/DAPI (OLIVEIRA et al., 2015). Em nossa amostra, a maioria das espécies apresentou pequena quantidade de heterocromatina CMA⁺, corroborando com os dados previamente reportados. Todavia, para *S. concava*, *Stelis* sp1. e *Stelis* sp3., além das bandas CMA⁺ pequenas, ocorreram bandas DAPI distribuídas pela região pericentromérica e/ou terminal. Isso demonstra, que mesmo em grupos com aparentemente pouca heterocromatina, a fração heterocromática é variável. Nesses casos, a presença de distintos padrões de bandas poderia ser uma ferramenta importante na caracterização dessas ou de outras espécies proximamente relacionadas. Na família Cactaceae Juss., por exemplo, ocorre uma estabilidade para bandas CMA terminais. Todavia, em *Melocactus* Link & Otto, além das bandas terminais ocorre um número variável de bandas pericentroméricas que possibilitaram a caracterização cariotípica de todas as espécies analisadas (CASTRO et al., 2019).

6 CONCLUSÃO

A subtribo Pleurothallidinae se destaca como um dos grupos mais diversificados de orquídeas. A notável variedade de números cromossômicos e padrões de bandas CMA/DAPI oferece uma perspectiva promissora para a delimitação de táxons estreitamente relacionados, proporcionando uma abordagem potencialmente valiosa para identificar novas espécies e apoiar a segregação de gêneros com base na filogenia molecular. O compartilhamento de características cariotípicas similares como número cromossômico e padrão de bandas, pode constituir uma ferramenta auxiliar no suporte de hipóteses de filogenia.

Os números cromossômicos das espécies da subtribo Pleurothallidinae analisadas neste trabalho variaram de $2n = 18$, em uma espécie de *Pleurothallis*, a $2n = 44$ em *Acianthera*. A quantidade e distribuição de bandas CMA/DAPI foi claramente variável dentro da subtribo Pleurothallidinae e em alguns casos dentro dos gêneros, como em *Acianthera* e *Stelis*. O gênero *Stelis* inicialmente parecia ser caracterizado por apresentar pouca ou nenhuma heterocromatina detectável pela técnica de bandejamento com os fluorocromos CMA e DAPI. Todavia, *Stelis* mostrou-se mais variável em termos de quantidade, composição e número de bandas heterocromáticas utilizáveis na delimitação taxonômica de espécies relacionadas. Com isso espera-se contribuir para o melhor entendimento da filogenia da subtribo Pleurothallidinae.

Tabela 1. Espécies da subtribo Pleurothallidinae analisadas com fluorocromos CMA/DAPI, sumarizadas por gênero e espécie, coletor, número, local de coleta, contagens cromossômicas prévias (CP), números cromossômicos determinados no presente trabalho (PT), tipos de bandas CMA/DAPI e os antimitóticos utilizados.

Taxon	Local de coleta †	Voucher	CP* 2n	PT 2n	Bandas heterocromáticas				Antimitótico	Figuras
					CMA ⁺ /DAPI ⁻	CMA ⁺ /DAPI ⁰	DAPI ⁺ /CMA ⁻	DAPI ⁺ /CMA ⁰		
<i>Acianthera</i> <i>Scheidw.</i>										
<i>A. capillaris</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Santa Terezinha – BA	EMA 1044	40	40	2 term	40 peri	40 term	—	8HQ	1A
<i>A. fockei</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Comodoro – MT	LPF 16439	—	38**	6 term	—	ca 30 peri	4 peri	8HQ	1B
<i>A. panduripetala</i> (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase	Quatro Barras – PR	LPF 16534	40	40	12 peri	—	—	—	PDB	1C
<i>A. prolifera</i> (Herb. ex Lindl.) Pridgeon &M.W. Chase	Santa Terezinha - BA	LPF S/N	38,44	44	4 peri	—	—	—	PDB	1D
<i>A. macuconensis</i> (Barb.Rodr.) F.Barros	Una – BA	EMA 1458	38	38	2 term	2 peri	—	—	PDB	1E
<i>A. saundersiana</i> (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase	Maranguape – CE	LPF 13812	36	40	2 term	ca. 40 peri	6 term	—	8HQ	1F
<i>A. saundersiana</i> (Rchb. f.) Pridgeon & M.W.Chase	Pacoti - CE	LPF 15099	36	40	2 term	ca. 40 peri	ca. 40 term	—	PDB	1G

<i>Acianthera</i> sp. 1	Santa Terezinha – BA	LPF 15628	-	40	6 term	14 peri	8 term	—	PDB	1H
<i>Acianthera</i> sp. 2	Una – BA	EMA 1488	-	40	2 term	ca. 18 peri	—	—	PDB	1I
<i>Anathallis</i>										
Barb.Rodr.										
<i>A. rubens</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Mirante 1 – PR	LPF 16563	30	30	—	—	2 term	—	PDB	2A
<i>A. rubens</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Cultivada	LPF S/N	30	30	2 peri	—	4 term	—	PDB	2B
<i>Masdevallia</i> Ruiz & Pav.										
<i>M. infracta</i> Lindl.	Santa Terezinha – BA	LPF 14686	40	36	-	6 peri	—	—	PDB	2C
<i>Myoxanthus</i> Poepp.										
<i>M. exasperatus</i> (Lindl.) Luer	Santa Terezinha – BA	EMA 1050	-	38**	2 term	6 peri	—	—	PDB	2D
<i>Octomeria</i> R.Br.										
<i>Octomeria</i> sp. 1	Maranguape - CE	LPF 8592	-	32**	2 term	—	—	—	8HQ	2E
<i>Pabstiella</i> Brieger & Senghas										
<i>P. rubrolineata</i> (Hoehne) Luer	Cubatão – SP	LPF 16851	-	28**	4 term	—	28 peri	—	PDB	2F
<i>Pleurothallis</i> R. Br.										
<i>Pleurothallis</i> sp.	Vitória da Conquista – BA	LPF 16168	-	18	4 peri	14 peri	—	—	PDB	2G

***Specklinia* Lindl.**

<i>S. grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F.Barros	Manaus – AM	LPF 17226	20	20	20 peri	–	–	20 peri	PDB	2H
<i>S. picta</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Novo Airão – AM	LPF 16317	20	20	2 term/18 peri	–	–	18 peri	8HQ	2I

***Stelis* Sw.**

<i>S. aprica</i> Lindl.	Uruburetama – CE	AMSSantos 13	32	32	2 term	–	–	-	PDB	3A
<i>S. aprica</i> Lindl.	Pacoti - CE	LPF 15109	32	32	2 term	–	–	-	PDB	3B
<i>S. concava</i> M.R.Miranda, S.G.Furtado & Menini	Caraguatatuba – SP	LPF 17059	–	28**	6 peri	–	4 term	–	8HQ	3C
<i>S. intermedia</i> Poepp. & Endl.	Venda Nova do Imigrante - ES	EMA 1293		32	1 term	2 peri	–	–	PDB	3D
<i>S. loefgrenii</i> Cogn.	Maranguape – CE	LPF 13808	32	32		2 peri	–	–	PDB	3E
<i>Stelis</i> sp. 1	Pacoti - CE	LPF 15102	-	32	2 term	–	4 peri	–	PDB	3F
<i>Stelis</i> sp. 2	Ibateguara - AL	LPF S/N	-	30		–	–	–	PDB	3G
<i>Stelis</i> sp. 3	Santa Terezinha – BA	EMA 1048	-	32	4 term	–	ca. 8 peri	–	PDB	3H

† Estados brasileiros referentes aos locais de coleta: AL, Alagoas; AM, Amazonas; BA, Bahia; CE, Ceará; ES, Espírito Santo; MT, Mato Grosso; PE, Pernambuco; PR, Paraná; SP -São Paulo; *Fonte para as contagens cromossômicas prévias: Chromosome Counts Database (CCDB), 2021; Felix & Guerra, 2010; Oliveira et al., 2015; Silva, 2018. **Contagem inédita para a espécie. As posições das bandas nos cromossomos estão abreviadas como segue: Term = Terminais; Peri = Pericentroméricas.

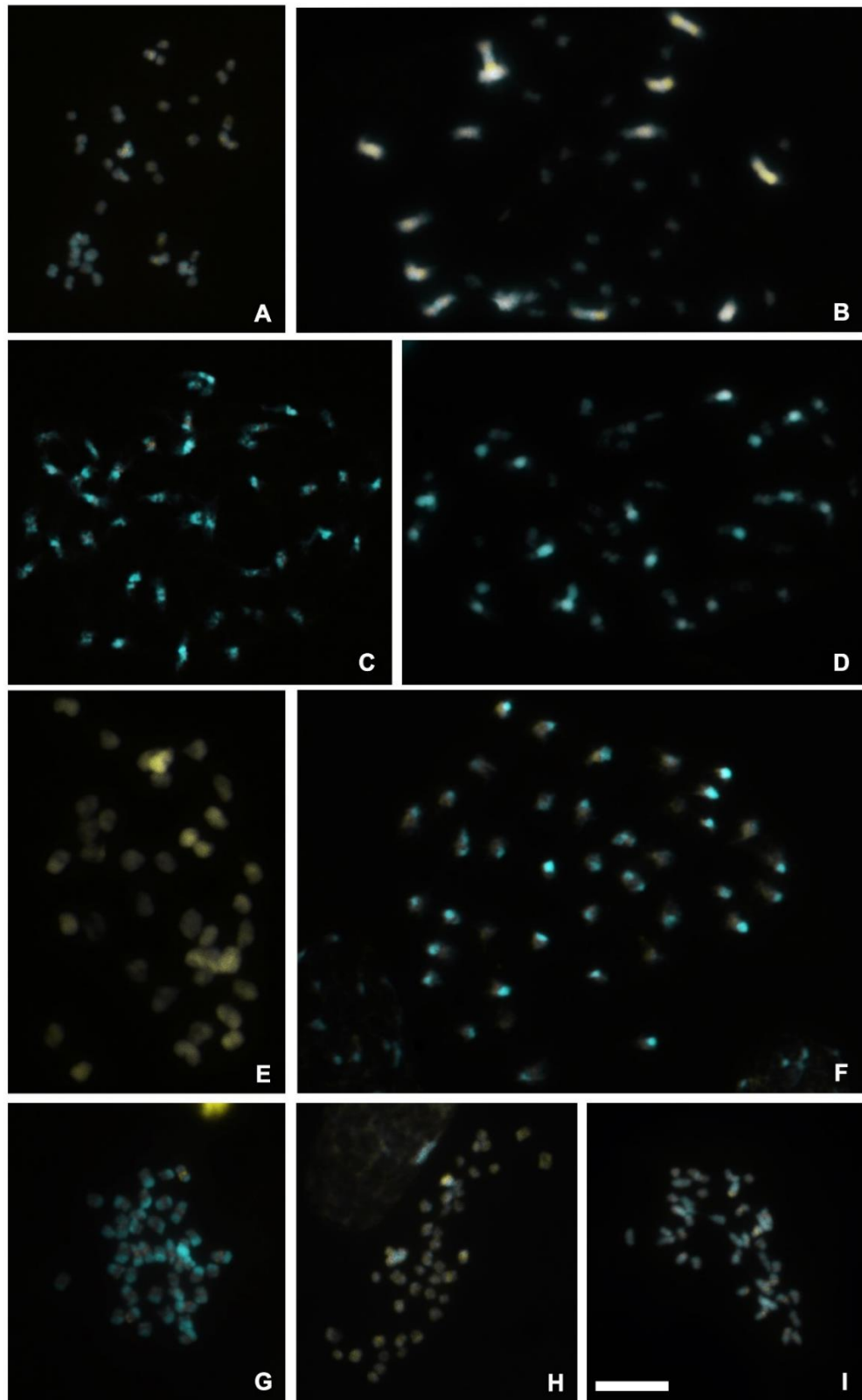


Figura 1. Metáfases mitóticas das espécies do gênero *Acianthera* da subtribo Pleurothallidinae coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *A. capillaris* com $2n = 40$; **B.** *A. fockei* $2n = 38$; **C.** *A. panduripetala* com $2n = 40$; **D.** *A. prolifera* com $2n = 44$; **E.** *A. macuconensis* com $2n = 38$; **F-G.** *Acianthera saundersiana* com $2n = 40$; **H.** *Acianthera* sp.1 com $2n = 40$; **I.** *Acianthera* sp.2 com $2n = 40$. Barra em **I** corresponde a $10\mu\text{m}$.

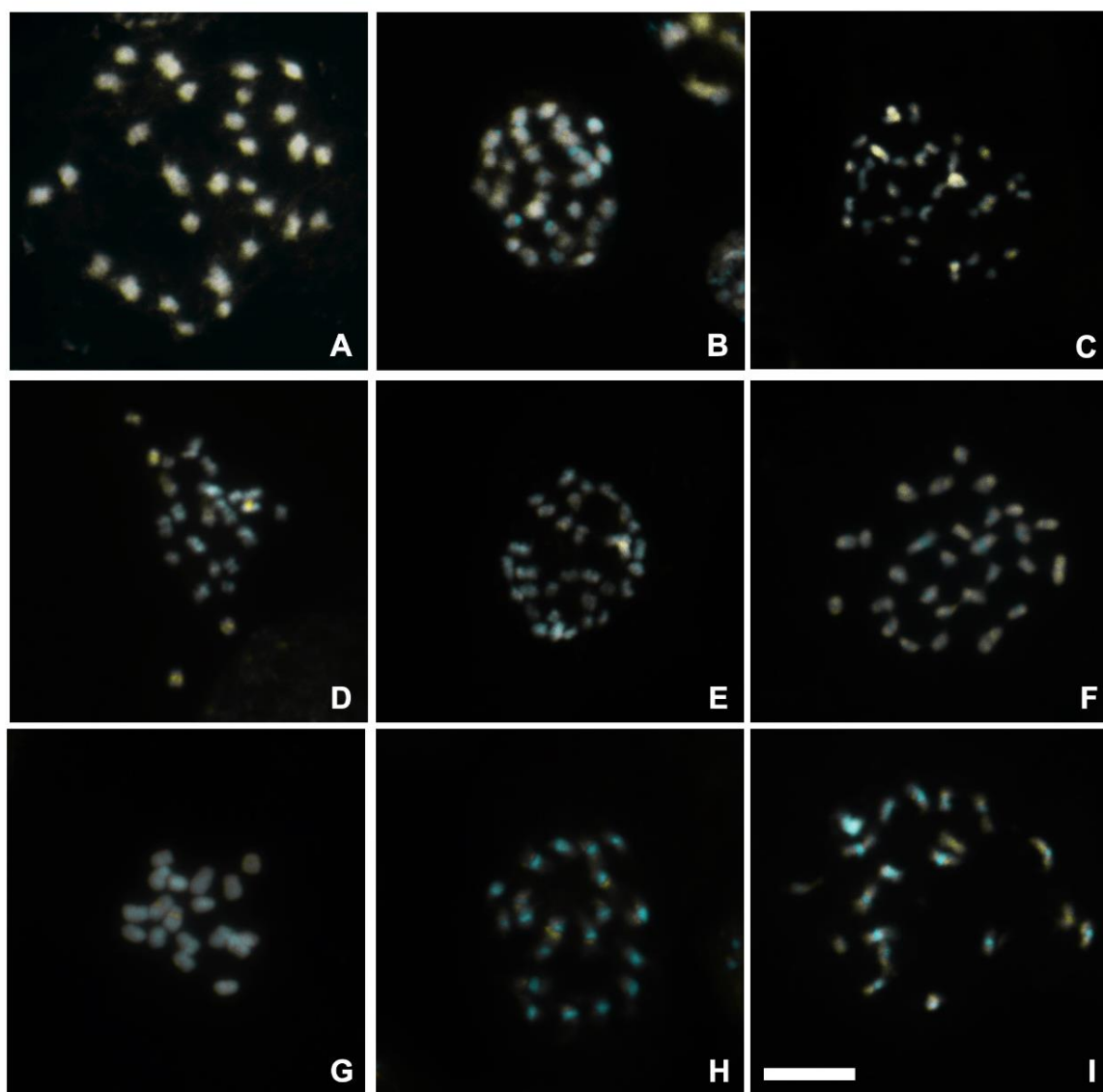


Figura 2 – Metáfases mitóticas das espécies de diferentes gêneros da subtribo Pleurothallidinae, coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *Anathallis rubens* com $2n = 30$; **B.** *A. rubens* com $2n = 30$; **C.** *Masdevallia infracta* com $2n = 36$; **D.** *Myoxanthus exasperatus* com $2n = 38$; **E.** *Octomeria* sp. com $2n = 32$; **F.** *Pabstiella rubrolineata* com $2n = 28$; **G.** *Pleurothallis* sp. com $2n = 18$; **H.** *Specklinia grobyi* com $2n = 20$; **I.** *S. picta* com $2n = 20$. Barra em I corresponde a $10\mu\text{m}$.

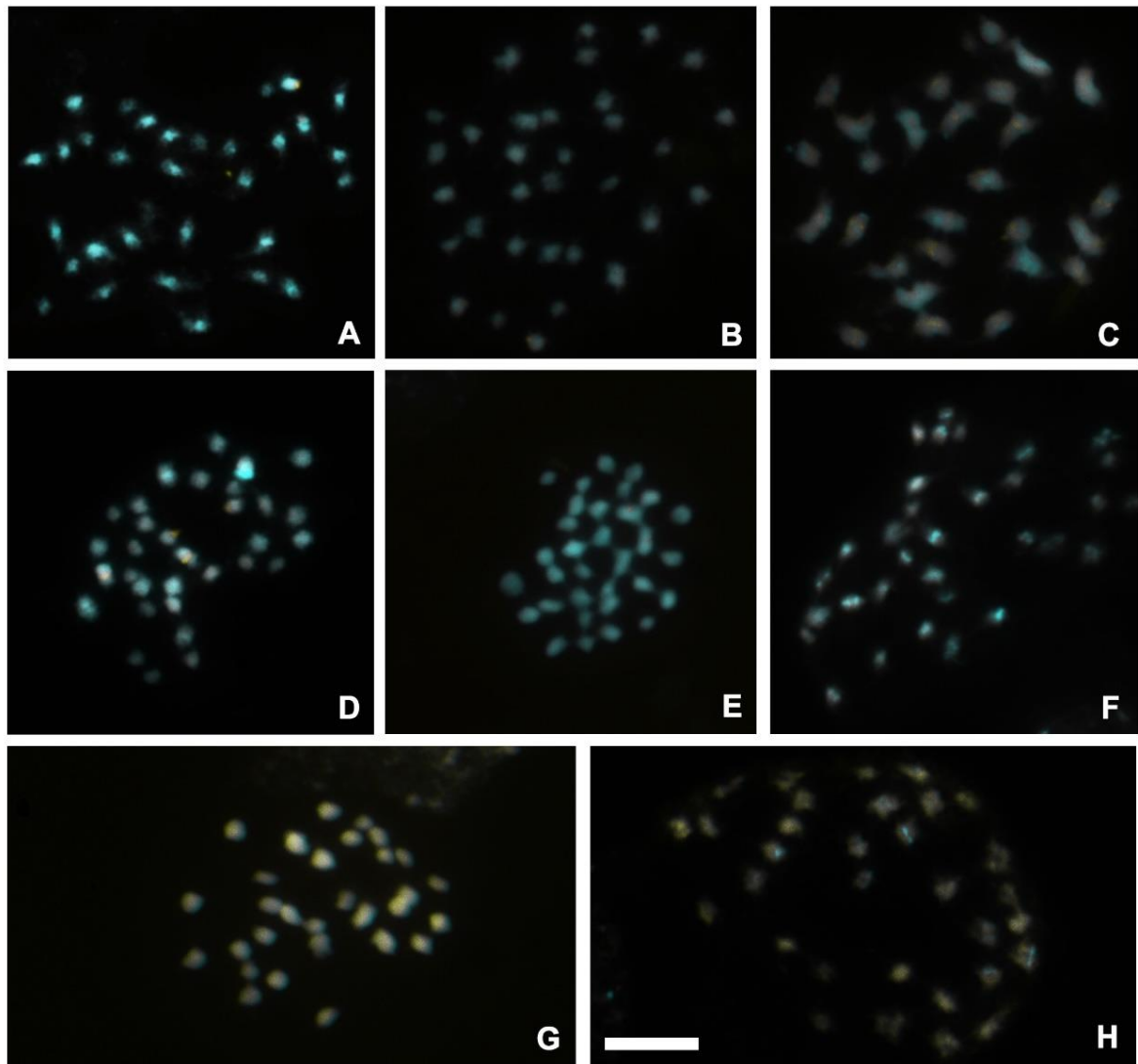


Figura 3 – Metáfases mitóticas das espécies do gênero *Stelis* pertencente a subtribo Pleurothallidinae, coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *S. aprica* com $2n = 32$; **B.** *S. aprica* com $2n = 32$; **C.** *S. concava* com $2n = 28$; **D.** *S. intermedia* com $2n = 32$; **E.** *loefgrenii* com $2n = 32$; **F.** *Stelis* sp. 1 com $2n = 32$; **G.** *Stelis* sp. 2 com $2n = 30$; **H.** *Stelis* sp. 3 com $2n = 32$. Barra em **H** corresponde a $10\mu\text{m}$.

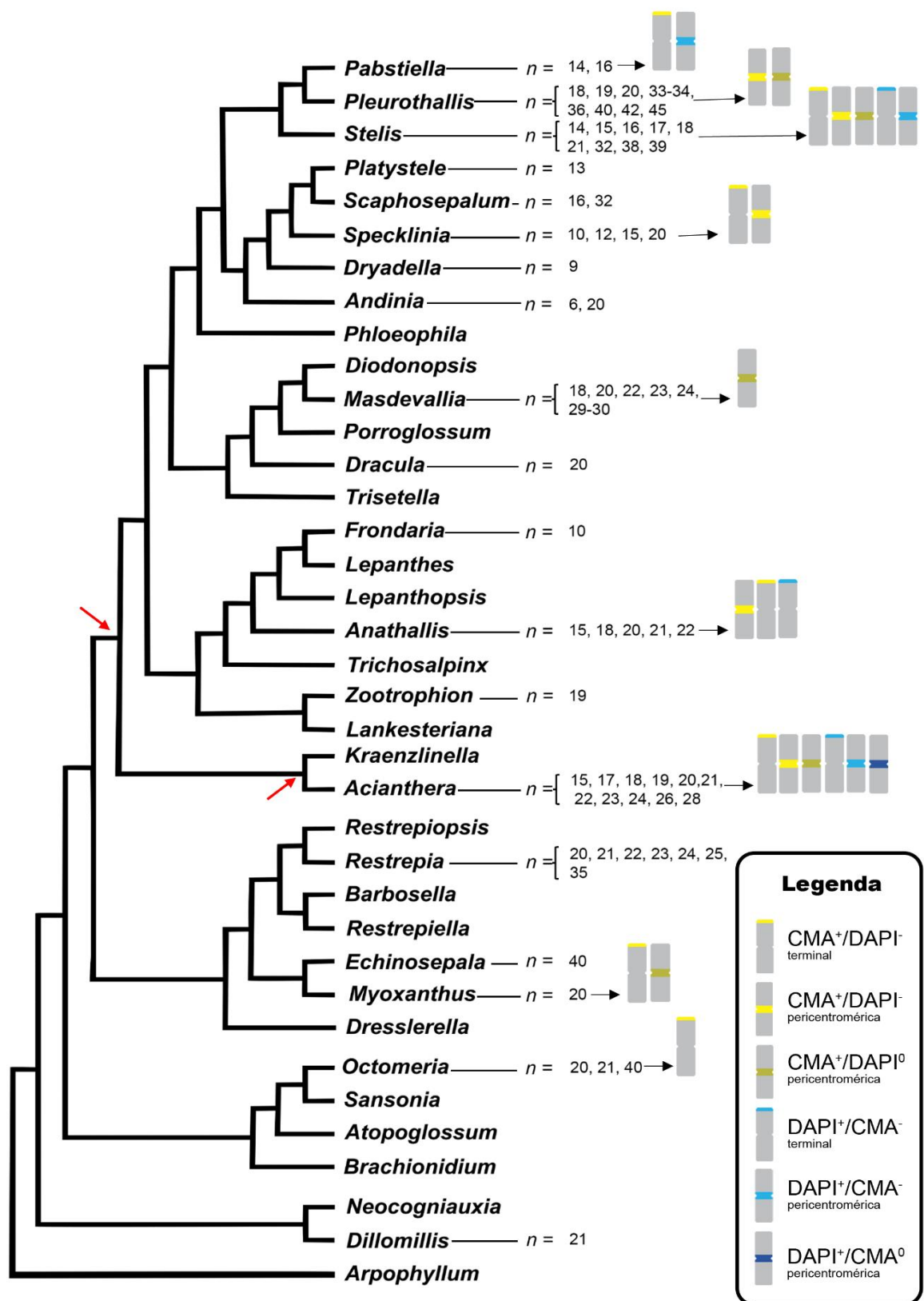


Figura 4 – Arvore filogenética adaptada de Karremans (2016), juntamente com os números cromossômicos haploides e padrões de bandas descritos neste trabalho e encontrados na literatura (tabela com levantamento de número cromossômico e bandas em preparação).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, P. C. De L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 541-547, 2007.
- AOYAMA, M.; CHEN, S.-C.; ZHANG, D.-M.; TANAKA, R.; NAKATA, M. Chromosome numbers of some species of the Orchidaceae from China (1). **Journal of Japanese Botany**, v. 67, p. 330-334. 1992.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: J. Wiley and Sons, 691p. 1992.
- ARORA, S.; KAPIL, R. N. Comparative study of pollinia of two species of *Pholidota* Lindl. **Phytomorphol.** v. 39, n. 4, p. 343-52. 1989.
- ASSIS, F. N. M. **Mecanismos de Evolução Cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. 132f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba. Areia. 2013.
- BARROS, F. Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Acianthera*, *Anathallis*, *Specklinia* e *Heterotaxis* (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 32, p. 421-428, 2005.
- BARROS E SILVA, A. E.; GUERRA M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH produces. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2009.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, v. 107, p. 467-590, 2011.
- BIRCHLER, J. A.; BHADRA, M. P.; BHADRA, U. Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 10, p. 211-216, 2000.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; SOARES FILHO, W. D. S.; GUERRA, M. A simple chromosomal marker can reliably distinguish *Poncirus* from *Citrus* species. **Genetica**, v. 3, n. 129, p. 273-279, 2007.
- CASTRO, J. P.; MORAES, A. P.; CHASE, M. E.; SANTOS, A. M. S.; BATISTA, F. R. C.; FELIX, L. P. Karyotype characterization and evolution of chromosome number in Cactaceae with special emphasis on subfamily Cactoideae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 135-148, 2018.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, p. 159-168, 2002.

CHACON, J.; ASSIS, M. C.; MEEROW, A. W., RENNER, S. S. 2012. From East Gondwana to Central America: historical biogeography of the Alstroemeriaceae. **Journal of Biogeography**, v. 39, p. 1806-1818, 2012.

CHADWICK, B. P.; WILLARD, H. F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. **Biological Sciences**, v. 101, n. 50, p. 17450-17455, 2004.

CHASE, M. W., CAMERON, K. M., BARRETT, R. L. & FREUDENSTEIN, J.V. **DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification**. In: DIXON, K.W.; KELL, S. P.; BARRETT, R. L; CRIBB, P. J. (eds). Orchid conservation. Natural History Publications, Sabah, p. 69-89, 2003.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG C.; SCHUITMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151-174, 2015.

CHASE, M. W.; M. CHRISTENHUSZ, J. M.; FAY, M. F.; BYNG, J. W.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

CHIRON, G. R.; GUIARD, J.; van den BERG, C. Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis sensu lato* (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. **Phytotaxa**, v. 46, p. 34-58, 2012.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; CHASE, M. W. **An Illustrated Encyclopedia of Vascular plants**. Royal Botanic Garden. Kew Richmond, UK, 2017.

CHRISTENSON, E. Conservation in action: Ecuagenera. **Orchid Digest**, 68: p. 114-117, 2004.

CORDEIRO, J. M.; NOLLET, F.; BURIL, M. T.; CHASE, M. W.; FELIX, L. P. A new species of *Gomesa* (Oncidiinae, Orchidaceae) from inselbergs in Brazilian caatinga: morphological and karyological evidence. **Phytotaxa**, v. 374, n. 2, p. 147-154, 2018.

CRIBB, P.J.; CHASE, M.W. Distribution. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, RASMUSSEN, F. N., eds. **Genera orchidacearum**, vol. 3. Oxford: Oxford University Press, v. 3, 2005.

DAVIÑA, J. R.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J. C.; HOJSGAARD, D. H.; ALMADA, R. D.; INSAURRALDE, I. S. E.; HONFI, A. I. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 811-821, 2009.

DAWSON, M. I.; MOLLOY, B. P. J. AND E BEUZENBERG, E. J. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora-39. Orchidaceae. **New Zealand Journal of Botany**, v. 45, p. 611-684. 2007.

DILLON, N. Heterochromatin structure and function. **V Biology of the Cell**, v. 96, p. 631-637, 2004.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, 314p., 1993.

DUNSTERVILLE, G. C. K.; GARAY, L. A. **Venezuelan orchids illustrated I**. London: André Deustsch, 448p., 1959.

EISSENBERG, J. C.; ELGIN, S. C. R. **Heterochromatin and Euchromatin**. Encyclopedia of Life Sciences, 7 p., 2005.

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

FELIX, L. P., Guerra M. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson and Dressler: The smallest chromosome number known in Orchidaceae. **Caryologia**. 52: p. 165-168, 1999.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 957-978, 2000.

FELIX, L.P.; GUERRA, M. Basic chromosome number of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, v 254, n. 3, p. 131-148, 2005.

FELIX, L. P.; GUERRA M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 163, p. 234-278, 2010.

FLORA DO BRASIL 2020. **Orchidaceae**. Em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 05 mar. 2021.

KARREMANS, A. P. *GENERA PLEUROTHALLIDINARUM*: An updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v. 16, ed. 2, p. 219-241. 2016.

LAMB, M. E.; ORBACH, Y.; HERSHKOWITZ, I.; ESPLIN, P. W.; HOROWITZ, D. A structured forensic interview protocol improves the quality and informativeness of investigative interviews with children: A review of research using the NICHD Investigative Interview Protocol. **Child abuse & neglect**, v. 31, n. 11-12, p. 1201-1231, 2007.

FREUDENSTEIN, J. V.; HARRIS, E. M.; RASMUSSEN, F. N. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 11, p. 1747-1755, 2002.

FREUDENSTEIN, J. V.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations; progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, p. 66-681. 2015.

GREWAL, S. I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature**, v. 8, p. 35-46, 2007.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Editora Guanabara: Rio de Janeiro, 142p., 1989.

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

GUERRA, M. **Chromosome number variation and evolution in monocots. Monocots: Systematics and Evolution**. Eds. K.L.Wilson and D.A. Morrison. (CSIRO: Melbourne), p.127-136, 2000a.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n.4, p. 1029-1041, 2000b.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, 131p., 2002.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome research**, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

GUIMARÃES, L. R. S. Filogenia e citotaxonomia do clado *Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Cranichideae, Orchidoideae, Orchidaceae). **Tese** (Doutorado Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 101 p., 2014.

HALL, I. M.; GREWAL, S. I. Structure and function of heterochromatin: implications for epigenetic gene silencing and genome organization. In: HANNON, G. J. **RNAi: A guide to gene silencing**. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, p. 205-232, 2003.

HEITZ, E. **Das heterochromatin der moose. Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik**. v. 69, p. 762-818, 1928.

HUANG, S. F.; ZHAO, Z. Y.; CHEN, S. J.; HUANG, X. X.. 1989. Chromosome counts on one hundred species and infraspecific taxa. *Acta Botanica Austro Sinica*, *Austro Sin*, v. 5, p. 161–176, 1989.

HUISINGA, K. L.; BROWER-TOLAND, B.; ELGIN, S. C. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. **Chromosoma**, v. 115, p. 110-122, 2006.

JUSSIEU, A. L., **Genera Plantarum: secundum ordines naturalis disposita, juxta methodum in: Horto régio parisiensi exaratam**, anno M.DCC.LXXIV. Parisiis: *apud viduam herissant et Theophillum Barrois*, 1789.

LINNAEI, C. **Species Plantarum**: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas...Holmiae: Impensis Laurentii Salvii, 1753.

LUER, C. A. Icones Pleurothallidarum I. Systematics of the Pleurothallidinae. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 15, 81p., 1986.

LUER, C. A. Icones Pleurothallidarum XXIX. A Third Century of *Stelis* of Ecuador, Systematics of *Apoda-Prorepentia*, Systematics of Miscellaneous Small Genera, Addenda New Genera, Species and Combinations (Orchidaceae). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**. v. 112, p.1-130. 2007.

MARTENS, J. H. A.; O'SULLIVAN, R. J.; BRAUNSCHWEIG, U.; OPRAVIL, S.; RADOLF, M.; STEINLEIN, P.; JENUWEIN, T. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. **The Embo Journal**, v. 24, p. 800-812, 2005.

MAY, A.; MORAES, A. R. A.; CASTRO, C. E. F.; JESUS, J. P. F.F. **Baunilha**. Disponível em: < http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/46.pdf >. Acesso em: jan. 2021, 2006.

MCKAIN, M. R.; et al. Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 397-406, 2012.

MÓ, E.; CETZAL-IX, WILLIAM; BASU, S. K.; NOGUERA-SAVELLI, E.; VEGA, H.; CASANOVA-LUGO, F.; PALLANDRE, J.-M. Diversity of Pleurothallidinae in Guatemala: An Endangered Orchid Subtribe with High Economic and Horticultural Potentials. **International Journal on Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 64-86, 2017.

MORAES, A. P.; GUERRA, M. 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**, v. 287, n. 3, p. 113-118, 2010.

NAKATA, M.; HASHIMOTO, T. Karyomorphological studies on species of *Pleurothallis*. **Annals of the Tsukuba Botanical Garden**, v. 2, p. 11-32, 1983.
NEYLAND, R.; URBATSCH, L. E.; PRIDGEON, A. M. A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 117, n. 1, p. 13-28, 1995.

OLIVEIRA, I. G.; MORAES, A. P.; ALMEIDA, E. M.; ASSIS, F. N. M.; CABRAL, J. S.; BARROS, F.; FELIX, L. P. Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae):

Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 102-120, 2015.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasiliensis**. Band 1. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 408p., 1975.

PARTRIDGE, J. F.; SCOTT, K. S. C.; BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T.; ALLSHIRE, R. C. Cisacting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. **Current biology**, v. 12, p. 1652-1660, 2002.

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

PESSOA, E. M.; CORDEIRO, J. M. P.; FELIX, L. P.; ALMEIDA, E. M.; COSTA, L.; NEPOMUCENO, A.; SOUZA, G.; CHASE, M. W.; ALVES, M.; van den BERG, C. Too many species: morphometrics, molecular phylogenetics and genome structure of a Brazilian species complex in *Epidendrum* (Laeliinae; Orchidaceae) reveal fewer species than previously thought. **Botanical Journal of The Linnean Society**, v. 195, p. 161-188, 2020.

PRIDGEON, A. M. Numerical analysis in the classification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 103-131, 1982a.

PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 69, n. 6, p. 921-938, 1982b.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**. Vol 1. General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Nova Iorque, Oxford University Press. 197p., 1999.

PRIDGEON, A. M.; CHASE, M. W. A phylogenetic reclassification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Lindleyana**, v. 16, p. 235-271, 2001.

PRIDGEON, A. M.; SOLANO R.; CHASE M. W. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2286-2308, 2001.

PRIDGEON, A. M. & CHASE, M. W. Phylogenetics of the subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) based on combined evidence from DNA sequences. **Lankesteriana**, v. 7, 49-50, 2003.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**. v. 4. Oxford University Press, New York, 696 p., 2005.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J., CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*, Vol. 5. Oxford: Oxford University Press, New York, 612 p., 2009.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J., CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**, Vol. 6. Oxford: Oxford University Press. 576 p., 2014.

QUERINO, B. C., FERRAZ, M. E., MATA-SUCRE, Y., SOUZA, G., & FELIX, L. P. Cytomolecular diversity of the subtribe Laeliinae (Epidendroidae, Orchidaceae) suggests no relationship between genome size and heterochromatin abundance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, p. 1-15, 2020.

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

RASMUSSEN, F. N. **The gynostemium of the neottiid orchids**. 96 p., 1982.
REFLORA 2020. **Flora do Brasil 2020: Orchidaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 26 fev., 2021.

SANTOS, Angeline Maria Da Silva et al. Evolução cromossômica em plantas de inselbergues com ênfase na família Apocynaceae Juss. 137f. **Tese** (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba, Areia – PB, 2017.

SCHUITEMAN, A. *Devogelia* (Orchidaceae), a new genus from the Moluccas and New Guinea. **Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 49, n. 2-3, p. 361-366, 2004.

SCHWEIZER, D.; AMBROS, P. F. Chromosome banding. In: **Chromosome analysis protocols**. Humana Press, p. 97-112, 1994.

SHARMA, S. K.; MUKAI, Y. Chromosome research in orchids: current status and future prospects with special emphasis from molecular and epigenetic perspective. **The Nucleus**, v. 58, n. 3, p. 173-184, 2015.

SILVA, J. L. Determinação do número de cromossomos e composição da heterocromatina em espécies da subtribo Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae). 34f. **Monografia** (Bacharel em Agronomia) Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APGIII**. 3º Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 768p., 2012.

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

STACE, C. A. **Plant Taxonomy and Biosystematics**. 2nd ed. Cambridge University Press, New York, 1989.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing Ltd. United Kingdom. 287p., 2003.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. *In*: J. Arditti, (eds.). **Orchid Biology Reviews and Perspective III**. Ithaca: Coenell University Press, p. 324-410, 1984.

THE PLANT LIST. **A working list of all known plant species**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 6 de jan. 2021.

VAIO, M. et al. Multiple karyotype changes distinguish two closely related species of *Oxalis* (*O. psoraleoides* and *O. rhombo-ovata*) and suggest an artificial grouping of section Polymorphae (Oxalidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 188, n. 3, p. 269-280, 2018.

van den BERG, C. et al. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417-430. 2009.

VANZELA, A. L. L. Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). **Genetic and Molecular Biology**, v. 26, p. 199-201, 2003.

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

WEILER, K. S.; WAKIMOTO, B. T. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 577-605, 1995.

WFO. **World Flora Online**. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/>>. Acesso em: 08 mar. 2021.

WCSP. **World Checklist of Selected Plant Families**. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://wcsp.science.kew.org/>>. Acessado em: 12 mar. de 2021.

ZHAI, J. W.; ZHANG, G. Q.; CHEN, L. J.; XIAO, X. J.; LIU, K. W.; TSAI, W. C.; HSIAO, Y. Y.; TIAN, H. Z.; ZHU, J. Q.; WANG, M. N.; WANG, F. G.; XING, F.W.; LIU, Z. J. A new orchid genus, *Danxiaorchis*, and phylogenetic analysis of the tribe Calypsoeae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-10, e60371, 2013.