



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ENOQUE MEDEIROS NETO**

**Padrões de distribuição de bandas CMA/DAPI  
em *Epidendrum* L. Subgênero *Amphiglottium* e  
híbridos naturais interespecíficos**

CAMPINA GRANDE – PB  
2012

ENOQUE MEDEIROS NETO

**Padrões de distribuição de bandas CMA/DAPI  
em *Epidendrum* L. Subgênero *Amphiglottium* e  
híbridos naturais interespecíficos**

Monografia apresentada ao Curso de  
Licenciatura Plena em Ciências  
Biológicas da Universidade Estadual da  
Paraíba, em cumprimento à exigência  
para obtenção do grau de licenciado.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix

CAMPINA GRANDE – PB  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

M488p

Medeiros Neto, Enoque.

Padrões de distribuição de bandas CMA/DAPI em *Epidendrum L.* subgênero *Amphiglotium* e híbridos naturais interespecíficos [manuscrito] / Enoque Medeiros Neto. – 2012.

59 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix, Universidade Federal da Paraíba”

“Co-Orientação: Profa. Dra. Dilma Maria de Brito Melo Trovão, Departamento de Ciências Biológicas”

1. Heterocromatina. 2. Híbrido interespecífico. 3. *Orchidaceae*. 4. DNA. I. Título.

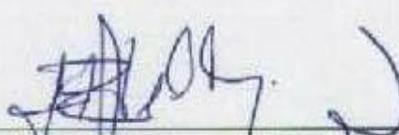
CDD 21. ed. 576

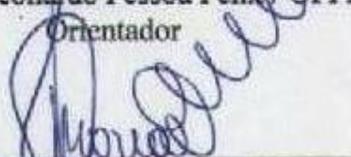
ENOQUE MEDEIROS NETO

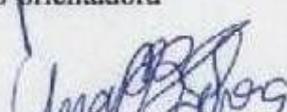
**Padrões de distribuição de bandas CMA/DAPI  
em *Epidendrum* L. Subgênero *Amphiglottium* e  
híbridos naturais interespecíficos**

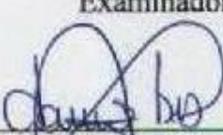
Monografia apresentada ao Curso de  
Licenciatura Plena em Ciências  
Biológicas da Universidade Estadual da  
Paraíba, em cumprimento à exigência  
para obtenção do grau de licenciado.

Aprovado em 24 / 09 / 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix / UFPB  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Dilma Maria de Brito Melo Trovão / UEPB  
Co-orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Ana Emilia Barros e Silva / UFPB  
Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª MSc Lânia Isis Ferreira Alves / UFPB  
Examinadora

## **DEDICATÓRIA**

A minha mãe, pela dedicação, apoio e amor, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar pela graça de todos os dias.

A mamãe “DONA BETH” e meus irmãos Danilo, Djalminha e Andreza pelo apoio de amor e carinho.

Ao professor Dr. Leonardo Pessoa Felix e a professora Dr<sup>a</sup> Ana Emília Barros e Silva por ter aberto as portas do Laboratório de Citogenética, onde aprendi a fazer ciência e onde consegui fechar mais um ciclo de minha vida, que é este trabalho. A ele ainda agradeço pelas sugestões e orientação.

A todos os meus amigos do laboratório: Felipe, Lânia, Nice, Manu, Sarah, Erton, Juliana, Bruno, Saulo, as duas Lucianas, Aquiles, Gaby, Álex, Jéssica, Ícaro, Paulo e Suelen. A todos vocês agradeço pelo dia a dia de trabalho, as brincadeiras, os encontros para as discussões de artigos, as festinhas, enfim, por tudo um muito obrigado.

Aos professores do Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da UEPB, em especial, a Érica, Dilma, Ana Paula e Mônica, que contribuíram ao longo do curso para a construção do meu profissional, mostrando-me o que é ser um professor, obrigado por sua competência e carinho.

A todos os amigos, aqueles próximos e aos mais distantes, fica aqui o meu agradecimento pelo eterno companheirismo, Ju, Jaqui, Fram, Chris, Èllida, Renata, Ricardo, Bruna, Marcelo, Bebel, Gizélia, Aline, Fabiano, Téríkles (*in memoriam*) e Altiéres (*in memoriam*).

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio.

"Viver não é relatável. Viver não é vivível. Terei que criar sobre a vida. E sem mentir. Criar sim, mentir não. Criar não é imaginação, é correr o grande risco de se ter a realidade. Entender é uma criação, meu único modo." Clarice Lispector

## RESUMO

Nas últimas décadas, as técnicas de bandeamento cromossômico têm sido bastante utilizadas na citogenética e citotaxonomia especialmente em fanerógamas. Entre os corantes utilizados nessas técnicas, os fluorocromos CMA e DAPI são os mais amplamente empregados em citogenética de plantas, principalmente na forma de dupla coloração, o que tem permitido caracterizar regiões heterocromáticas, revelando um número variável de regiões cromossômicas. *Epidendrum* L. é provavelmente o maior gênero neotropical de orquídeas, com cerca de 1500 espécies, onde seu alto grau de polimorfismo é especialmente elevado em alguns grupos sul-americanos, como, o complexo *Epidendrum secundum*, que também apresenta elevada variação cromossômica numérica. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o padrão de bandas heterocromáticas em espécies do gênero *Epidendrum* e híbridos interespecíficos. Foram analisadas três espécies do gênero *Epidendrum*, *E. fulgens*, *E. xanthinum* e *E. secundum*. Adicionalmente, foram analisados dois híbridos interespecíficos e seus possíveis parentais, o primeiro *E. xanthinum* x *E. secundum*, proveniente de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, o segundo *E. fulgens* e *E. secundum*, designado aqui como *Epidendrum* sp. aff. *fulgens*, encontrado em simpatria com as duas últimas no município de São João do Tigre, estado da Paraíba. Para as análises mitóticas, foram coletadas raízes e submetidas à pré-tratamento com 8-HQ, fixadas em Carnoy e estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posteriormente digeridas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em solução de celulase e pectinase. As lâminas foram preparadas com uma gota de ácido acético, coradas com CMA e DAPI, e montadas em glicerol e tampão McIlvaine. As melhores metáfases foram capturadas com uma câmera de vídeo Cohu usando o software Leica QFISH. Foram feitas também as medidas cromossômicas e calculados os índices de assimetria, além das análises morfométricas, onde calculou-se em seguida os dados de ACP. Os números cromossômicos variaram de  $2n = 24$  em *E. fulgens* até  $2n = 64$  em *Epidendrum* sp. aff. *fulgens*, enquanto o tamanho dos cromossomos de *E. secundum* variaram desde  $0,75\ \mu\text{m}$  no menor cromossomo da população de Atibaia - SP, a  $7,10\ \mu\text{m}$  no maior cromossomo da população de Nova Friburgo - RJ. Os cariótipos de todas as espécies apresentaram-se geralmente simétricos, formados por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Nos terminais de pelo menos um par cromossômico, foram identificadas regiões  $\text{CMA}^{-}/\text{DAPI}^{+}$ , algumas regiões  $\text{CMA}^{+}/\text{DAPI}^{-}$  e  $\text{CMA}^{0}/\text{DAPI}^{-}$ , estas últimas, sem formar bandas claramente visualizáveis, mesmo após a sobreposição e processamento digital das imagens. Para a população de São João do Tigre, a análise de Agrupamento identificou a formação de três grupos morfologicamente distintos e relacionados, contudo, indicou uma similaridade maior entre o híbrido e *E. secundum*. Entre os materiais analisados, duas espécies constituem prováveis híbridos interespecíficos, o primeiro proveniente de Nova Friburgo, com  $2n = 42$  e número cromossômico intermediário aos dois possíveis parentais: *E. xanthinum* ( $2n = 28$ ) e *E. secundum* ( $2n = 56$ ). O segundo em São João do Tigre, Paraíba, onde a análise de números cromossômicos revelou que esta espécie, *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* ( $2n = 64$ ), apresentou número cromossômico claramente divergente de ambos os parentais, *E. fulgens* ( $2n = 50 + 1B$ ) e *E. secundum* ( $2n = 56$ ). O padrão de bandas CMA/DAPI observado no suposto híbrido, com grandes blocos  $\text{CMA}^{-}/\text{DAPI}^{+}$  sugere uma clara relação com estas espécies, relação também suportada pelas análises morfométricas. Tanto a variação cromossômica numérica, quanto o padrão de bandas heterocromáticas foram bastante informativos na caracterização de dois híbridos interespecíficos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. Contudo, o híbrido da região Nordeste, resultante do cruzamento entre *E. secundum* e *E. fulgens* de São João do Tigre, apresentou número cromossômico divergente do esperado a partir do cruzamento dos seus supostos parentais, sugerindo a ocorrência de alterações estruturais pós-hibridização.

**PALAVRAS-CHAVE:** Displóidia, Heterocromatina, Hibridização, Orchidaceae, Poliplóidia.

## ABSTRACT

In recent decades, the chromosome banding techniques have been widely used in cytogenetics and cytotaxonomy especially in phanerogams. Among the dyes used in these techniques, the fluorochrome DAPI and CMA are more widely employed in cytogenetics of plants, mostly in the form of double staining which has allowed characterization of heterochromatic regions, revealing a variable number of chromosomal regions. *Epidendrum* L. is probably the largest neotropical genus of orchids, with about 1500 species, where their high degree of polymorphism is particularly large in some South American groups, such as the *Epidendrum secundum* complex, which also has high chromosome number variation. The aim of this study was to characterize the pattern of heterochromatic bands in the genus *Epidendrum* and interspecific hybrids. We analyzed three species of the genus *Epidendrum*, *E. fulgens*, *E. xanthinum* and *E. secundum*. Additionally, we analyzed two interspecific hybrids and their putative parents, the first *E. xanthinum* x *E. secundum*, from Nova Friburgo, Rio de Janeiro, the second *E. fulgens* and *E. secundum*, designated here as *Epidendrum sp. aff. fulgens* found in sympatry with the last two in São João do Tigre, Paraíba. For mitotic analysis, roots were collected and subjected to pretreatment with 8-HQ, fixed in Carnoy and stored at -20 ° C, then digested at 37 ° C for 30 minutes in a solution of cellulase and pectinase. Slides were prepared with a drop of acetic acid, stained with CMA and DAPI, and mounted in glycerol and McIlvaine buffer. The best metaphases were captured with a Cohu video camera using the Leica software QFISH. We also made measurements and Chromosomal Indices of Asymmetry, beyond the morphometric analyzes, which then were calculated the PCA data. The chromosome numbers varied from  $2n = 24$  in *E. fulgens* to  $2n = 64$  in *Epidendrum sp. aff. fulgens*, while the size of the chromosomes of *E. secundum* ranged from 0.75  $\mu\text{m}$  to the smallest chromosome in the population of Atibaia - SP, to 7.10  $\mu\text{m}$  for the largest chromosome in the population of Nova Friburgo - RJ. The karyotypes of all species were generally symmetrical, consisting of metacentric and submetacentric chromosomes. The terminals of at least one chromosome pair were identified regions  $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ , some regions  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  and  $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^-$ , the latter, without forming bands clearly viewable even after the overlay and the digital processing of the images. For the population of São João do Tigre, Cluster analysis identified the formation of three morphologically distinct and related groups, however, indicated a greater similarity between the hybrid and *E. secundum*. Between the materials analyzed, two species are likely interspecific hybrids, the first from Nova Friburgo, with  $2n = 42$  and intermediate chromosome number to the two putative parents: *E. xanthinum* ( $2n = 28$ ) and *E. secundum* ( $2n = 56$ ). The second in São João do Tigre, Paraíba, where analysis of chromosome numbers revealed that this specie, *Epidendrum sp. aff. fulgens* ( $2n = 64$ ) showed clearly divergent chromosome number of both parents, *E. fulgens* ( $2n = 50 + 1B$ ) and *E. secundum* ( $2n = 56$ ). The CMA / DAPI banding patterns observed in the supposed hybrid, with large blocks  $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ , suggests a clear relationship with these species, relationship also supported by morphometric analysis. Both the chromosome number variation, and the pattern of heterochromatic bands were very informative in characterizing two interspecific hybrids of Southeast and Northeast of Brazil. However, the hybrid of the Northeast, resulting from the crossing of *E. secundum* and *E. fulgens* of São João do Tigre, showed divergent chromosome number than expected from crossing of their putative parents, suggesting the occurrence of structural changes post-hybridization.

**KEYWORDS:** Dysploidy, Heterochromatin, Hybridization, Orchidaceae, Polyploidy.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 –</b>	Espécies do gênero <i>Epidendrum</i> L (subgênero <i>Amphiglottium</i> ), com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide ( $2n$ ), número cromossômico haploide ( $n$ ), fórmula cariotípica ( <b>FC</b> ), número fundamental ( <b>NF</b> ), variação no tamanho cromossômico, média total do comprimento cromossômico haplóide ( <b>tl</b> ), média do comprimento cromossômico ( <b>C</b> ), relação entre o cromossomo maior e o menor no complemento ( <b>R</b> ), média da relação entre os braços cromossômicos ( <b>r</b> ), índice de assimetria intracromossômica ( <b>A<sub>1</sub></b> ) e índice de assimetria intercromossômica ( <b>A<sub>2</sub></b> ) .....	30
<b>TABELA 2 –</b>	Espécies de <i>Epidendrum</i> L. (subgênero <i>Amphiglottium</i> ) com seus respectivos números cromossômicos diplóides ( $2n$ ), tipo e número de bandas terminais heteocromáticas, tipo e número de bandas pericentroméricas e números de bandas intersticiais .....	31
<b>TABELA 3 –</b>	Sumário da estatística descritiva para as características morfológicas qualitativas medidas em 18 indivíduos de <i>E. secundum</i> , <i>E. fulgens</i> e <i>Epidendrum</i> sp. aff. <i>fulgens</i> ocorrendo em simpatria na população de São João do Tigre, Paraíba .....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 –</b>	Células metafásicas de <i>Epidendrum fulgens</i> com $2n = 24$ ( <b>a-c: Panelas, PE</b> ), <i>E. fulgens</i> com $2n = 50 + 1B$ ( <b>d-f: São João do Tigre, PB</b> ), <i>E. secundum</i> com $2n = 56$ ( <b>g-i: São João do Tigre, PB</b> ), <i>Epidendrum sp. (aff. fulgens)</i> com $2n = 64$ ( <b>j-l: São João do Tigre, PB</b> ), coradas com CMA ( <b>a, d, g, j</b> ), DAPI ( <b>b, e, h, k</b> ) e imagens dos dois fluorocromos ( <b>c, f, i, l</b> ). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas, bandas terminais CMA <sup>+</sup> /DAPI. Inseto em <b>c</b> destaca bandas terminais DAPI <sup>+</sup> /CMA <sup>-</sup> inconspícuas, em <b>f</b> destaca cromossomo B, em <b>l</b> destaca bandas CMA <sup>+</sup> /DAPI discretas. A barra em <b>j</b> corresponde a 10µm	32
<b>FIGURA 2 –</b>	Células metafásicas de <i>Epidendrum secundum</i> com $2n = 56$ ( <b>a-c: Atibaia, SP</b> ) e $2n = 58$ ( <b>d-f: Nova Friburgo, RJ</b> ), coradas com CMA ( <b>a, d</b> ), DAPI ( <b>b, e</b> ) e imagens sobrepostas com os dois corantes ( <b>c, f</b> ). As setas amarelas indicam bandas terminais CMA <sup>+</sup> /DAPI. Insetos em <b>f</b> destaca bandas intersticiais CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> . Barra em <b>d</b> corresponde a 10µm	33
<b>FIGURA 3 –</b>	Células metafásicas de espécimes coletados em Nova Friburgo, RJ: <i>Epidendrum secundum</i> com $2n = 56$ ( <b>a-c</b> ), <i>E. xanthinum</i> com $2n = 28$ ( <b>d-f</b> ), híbrido entre <i>E. secundum</i> x <i>E. xanthinum</i> com $2n = 42$ ( <b>g-i</b> ). Em <b>a, d, g</b> células coradas com CMA, em <b>b, e, h</b> coradas com DAPI, e imagens sobrepostas dos dois corantes em <b>c, f, i</b> . Setas amarelas indicam bandas terminais CMA <sup>+</sup> /DAPI e as brancas indicam os cromossomos maiores. Insetos menores em <b>f</b> detalha padrão de banda terminal CMA <sup>-</sup> /DAPI <sup>+</sup> adjacente a banda pericentromérica DAPI <sup>-</sup> /CMA <sup>+</sup> , o inserto maior detalha banda CMA <sup>-</sup> /DAPI <sup>+</sup> intersticial, em <b>i</b> detalha cromossomo provavelmente herdado de <i>E. xanthinum</i> . A barra em <b>g</b> corresponde a 10µm	34
<b>FIGURA 4 –</b>	Dendograma da matriz de distâncias, pelo método de agrupamento por ligação simples.....	35
<b>FIGURA 5 –</b>	Correlação entre os caracteres morfológicos florais ao eixo de ordenação. Os componentes principais 1 e 2 explicam 76,67% e 9,94% da variação total, respectivamente .....	36
<b>FIGURA 6 –</b>	ACP de 18 indivíduos com base em 15 caracteres morfológicos florais (Tabela 3). Os espécimes de <i>E. secundum</i> estão identificados pela sigla SN92, <i>Epidendrum fulgens</i> estão identificados como SN93, e <i>Epidendrum sp. aff. fulgens</i> estão identificados como SN94. Os componentes principais 1 e 2 explicam 76,67% e 9,94% da variação total, respectivamente .....	37

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1	<b>Família Orchidaceae</b> .....	13
2.1.1	Subfamília Epidendroideae.....	15
2.1.2	Gênero <i>Epidendrum</i> L.....	16
2.2	<b>Citogenética Vegetal</b> .....	17
2.2.1	Bandeamento com Fluorocromos.....	19
2.2.2	Heterocromatina.....	21
2.3	<b>Evolução Cariotípica</b> .....	23
2.3.1	Poliploidia.....	24
2.3.2	Disploidia.....	25
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4	<b>RESULTADOS</b> .....	28
4.1	Análise dos cromossomos mitóticos.....	28
4.2	Análises morfométricas.....	35
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

# **Padrões de distribuição de bandas CMA/DAPI em *Epidendrum* L. Subgênero *Amphiglottium* e híbridos naturais interespecíficos**

## **1. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, as técnicas de bandeamento cromossômico têm sido bastante utilizadas na citogenética e citotaxonomia especialmente em fanerógamas (Guerra, 2000). Entre os corantes utilizados nessas técnicas, os fluorocromos CMA (cromomicina A3) e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol 2HCl), são os mais amplamente empregados em citogenética de plantas. O princípio da técnica baseia-se na ligação específica com pelo menos quatro pares de bases repetidas em tandem no sulco menor do DNA, através da formação de pontes de hidrogênio e outras interações eletrostáticas (Manzini *et al.*, 1985). A coloração com DAPI produz uma banda fluorescente azul brilhante nas regiões cromossômicas ricas em AT, enquanto o CMA se liga as regiões ricas em GC, emitindo uma fluorescência amarela brilhante (Baguley, 1982). A coloração simultânea com os fluorocromos CMA e DAPI tem permitido caracterizar regiões heterocromáticas em plantas (Guerra, 1993; Guerra *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2007; Barros e Silva & Guerra, 2009; Feitosa *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2012), revelando um número variável de regiões cromossômicas mais brilhantes ou positivas (+), ausentes ou negativas (-), ou neutras (0) (Schweizer, 1981). O bandeamento resultante permite uma caracterização mais eficiente do cariótipo em relação à coloração convencional com Giemsa, ou ao bandeamento C, geralmente utilizado para detectar regiões heterocromáticas, porém sem especificar sua composição (Guerra, 2000).

As regiões heterocromáticas geralmente variam entre as espécies, mas são melhor conservadas entre populações de uma mesma espécie (Greilhuber, 1984), o que permite investigar a origem híbrida de uma espécie a partir dos padrões de bandas heterocromáticas. Almeida *et al.* (2007), por exemplo, analisaram a possível origem híbrida de Umbu-cajá (Anacardiaceae do gênero *Spondias*) a partir do bandeamento CMA/DAPI, verificando que o cariótipo do suposto híbrido não apresentava padrões semelhantes de distribuição da heterocromatina aos seus supostos parentais (*S. mombin* e *S. tuberosa*) Por outro lado, Moraes & Guerra (2010) demonstraram claramente através desta coloração, que *Emilia fosbergii* é uma espécie alotetraplóide e *E. sonchifolia* é um de seus parentais.

*Epidendrum* L. é provavelmente o maior gênero neotropical de orquídeas, com cerca de 1500 espécies (Chase *et al.*, 2003; Pinheiro & Barros, 2007). O grupo apresenta extensa variabilidade morfológica intra e interespecífica, o que dificulta a delimitação de suas espécies (Pabst & Dungs, 1975; Hágsater, 1984; Pinheiro & Barros, 2005, 2007). O alto grau de polimorfismo é especialmente elevado em alguns grupos sul-americanos, como por exemplo, o complexo *Epidendrum secundum*, que também apresenta elevada variação cromossômica numérica (Pinheiro & Barros, 2007; Assis *et al.*, *in press*). Apesar dos esforços para a compreensão das relações filogenéticas entre estes táxons, ainda não há um tratamento taxonômico formal para o grupo, principalmente por causa da escassez de informações moleculares e citogenéticas disponíveis na literatura.

Apenas 2,8% das espécies de *Epidendrum* foram estudadas citologicamente, e esta caracterização é representada exclusivamente por contagens cromossômicas. A análise de sua variação cromossômica numérica demonstrou a ocorrência de diferentes números cromossômicos entre espécies estreitamente relacionadas e entre diferentes populações de uma mesma espécie. As espécies do subgênero *Amphiglottium* apresentam números cromossômicos que variam de  $2n = 24$  em *E. fulgens* (Pinheiro *et al.*, 2009) a  $2n = 240$  em *E. cinnabarinum* (Guerra, 2000; Conceição *et al.*, 2006; Felix & Guerra, 2010). O número mais freqüente para o gênero é  $n = 20$ , observado em aproximadamente 70% das espécies com registros cromossômicos. Este número é também o mais freqüente entre os membros da subtribo Laeliinae, sugerindo que  $x = 20$  é o número básico para o gênero, e possivelmente para toda a subtribo (Felix & Guerra, 2010). Para o gênero *Epidendrum*, não há nenhum registro na literatura de bandeamento com fluorocromos, e nenhum trabalho foi feito com o intuito de caracterizar a heterocromatina nestas espécies, o que dificulta compreender a história evolucionária do gênero, e a direção de sua evolução cariológica, dentre muitos outros aspectos de suas relações filogenéticas (incluindo seu número básico primário) que permanecem obscurecidos.

No presente trabalho foram analisadas três espécies pertencentes ao subgênero *Amphiglottium*, duas pertencentes a seção *Tuberculata* (*Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*) e *Epidendrum fulgens* do clado Atlântico, conforme delimitação proposta por Pinheiro *et al.* (2009). Entre as espécies do subgênero *Amphiglottium* da Região Nordeste, foi observada a ocorrência em simpatria, em um afloramento granítico na Serra do Paulo, município de São João do Tigre, Estado da Paraíba, Brasil, de três

morfotipos distintos: *Epidendrum fulgens*, *E. secundum* e *Epidendrum* sp. aff. *fulgens*, este último com características morfológicas intermediárias entre os dois primeiros. Adicionalmente, na Região Sudeste do Brasil, em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, foi encontrado um híbrido natural entre *E. xanthinum* e *E. secundum*. O objetivo do trabalho foi verificar a origem híbrida desses dois táxons, através da análise cariotípica destas cinco espécies com a utilização da técnica de coloração com os fluorocromos CMA e DAPI. Para tanto, foram estudados materiais provenientes das populações de onde foram coletados os supostos parentais e seus respectivos híbridos. Além disso, para as amostras de São João do Tigre, foi realizada uma análise morfométrica a partir de flores coletadas do suposto híbrido e seus parentais.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Família Orchidaceae**

Orchidaceae, uma das maiores e mais complexas famílias dentre as fanerógamas (Pridgeon *et al*, 1999; Souza & Lorenzi, 2008), apresenta cerca de 800 gêneros (Dressler, 1993) e 25.000 espécies (Chase *et al.*, 2003). Caracterizam-se por apresentarem grãos de pólen agrupados em políneas de texturas variáveis, ovário ínfero, fruto do tipo cápsula seca que se abre para a libertação das muito numerosas e diminutas sementes desprovidas de cotilédones e com embriões indiferenciados (*sensu* Angiosperm Phylogeny Group, 2003). As orquídeas são plantas herbáceas, perenes e geralmente micotróficas, e podem ser facilmente reconhecidas por suas flores zigomorfas, nas quais os estames são adnatos basalmente ao estilete formando uma estrutura denominada ginostêmio (Dressler, 1981). As orquídeas possuem distribuição cosmopolita, embora a maioria das espécies ocorra nas regiões tropicais. No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies (Souza & Lorenzi, 2008).

A família Orchidaceae é claramente monofilética, e apresenta caracteres sinapomórficos conspícuos (Freudenstein & Rasmussen, 1999), como por exemplo, a redução dos estames adaxiais, sementes micotróficas sem endosperma, e o ginostêmio, que é uma estrutura única nas monocotiledôneas. De acordo com Benzing (1987), os padrões evolutivos na família estão relacionados a características do habitat, especiação floral e micotrofia, e mesmo sem ter proposto um sistema de classificação formal para este grupo, relacionou a família com um possível ancestral liliáceo. A produção de

grande quantidade de sementes também é uma estratégia evolutiva bastante eficiente, através da qual as espécies procuram aumentar as chances de estabelecimento das plântulas em função da especificidade de seus habitats, permitindo o estabelecimento de poucos indivíduos em locais distantes de sua origem, de maneira dispersa, gerando populações disjuntas (Pinheiro & Barros, 2005).

Um grande número de estudos tem demonstrado que as flores das orquídeas podem ser altamente susceptíveis a convergência morfológica devido à pressão de seleção do polinizador, e tradicionalmente os caracteres florais eram os principais utilizados para classificar a família (Dodson, 1962; Dressler & Dodson, 1960). Contudo, caracteres florais usualmente apresentam fortes descontinuidades, frequentemente correspondendo a sinapomorfias únicas, as quais são ineficientes na inferência de relações filogenéticas. Além disso, caracteres florais são frequentemente inconsistentes quando comparadas a outras evidências taxonômicas (por exemplo, números cromossômicos). Como resultado, poucos tratamentos taxonômicos infragenéricos partindo de uma abordagem filogenética segura encontram-se disponíveis na literatura.

Um novo sistema de classificação filogenética para a família Orchidaceae foi proposta recentemente por Chase *et al.* (2003), baseado em um considerável número de evidências morfológicas e moleculares (*atpB*, *rbcL*, *matK*, *psaB*, *trnLF*), e consiste na subdivisão da família em cinco subfamílias, duas das quais são bastante consensuais: Apostasioideae e Cyripedioideae. A terceira subfamília, Vanilloideae, é questionada por alguns autores (Szlachetko, 1995; Cameron *et al.*, 1999; Cameron & Chase, 1999) e pouco conhecida entre os botânicos, porém é fortemente suportada por diversas linhas de evidências, inclusive moleculares. Outras evidências indicam que Spiranthoideae *sensu* Dressler (1993) deve ser incluída em Orchidoideae, e Tropicidae deve ser transferida para Epidendroideae, esta última também considerada controversa em função de pequenos níveis de divergências em sequências, relativas ao número de taxa envolvidos (Chase *et al.*, 2003). Em Epidendroideae, a árvore das sequências de DNA contradiz fortemente grande parte das propostas de classificação anteriores (Chase *et al.*, 2003).

A família Orchidaceae é relativamente pouco conhecida em termos de números cromossômicos, com aproximadamente 11% de espécies citologicamente conhecidas (Felix & Guerra, 2001). Contudo, a variação cromossômica numérica é bastante elevada, com registros de  $2n = 12$  em *Psychomorchis pusilla* (Dodson, 1957) até  $2n = 240$  em *Epidendrum cinnabarinum* (Felix & Guerra, 2001). Em face dessa variação

cromossômica numérica tão elevada e da ecologia das espécies cujos níveis de ploidia são elevados, é possível que a família Orchidaceae tenha uma correlação positiva entre quantidade de DNA e habitat terrestre (Leitch *et al.*, 2009), o mesmo ocorrendo com a poliploidia no gênero *Oncidium* que parece relacionada ao habitat terrestre ou rupícola (Felix & Guerra, 2000).

### 2.1.1. Subfamília Epidendroideae

Epidendroideae é a maior subfamília em Orchidaceae, incluindo 650 gêneros e 18.000 espécies, abrangendo mais gêneros e espécies do que todas as outras subfamílias juntas (Pridgeon *et al.*, 2005). Esta subfamília é composta principalmente por plantas epífitas, porém também apresenta plantas terrestres e rupícolas. Morfologicamente é bastante diversificada, caracterizando-se por possuir um único estame fértil, antera incumbente e duas, quatro, seis ou oito polínias, geralmente com apêndices e inflorescência lateral ou terminal (Pridgeon *et al.*, 2005). Ocorre principalmente nos trópicos e subtropicais, mas também é encontrada em clima temperado até o Círculo Ártico (Cribb & Chase, 2005). Atualmente são reconhecidas formalmente 16 tribos, onde a tribo Epidendreae é considerada a maior de todas elas (Pridgeon *et al.*, 2005).

Na subfamília Epidendroideae os números variam de  $2n = 24$  em *E. mosenii* Barb. Rodr., *E. fulgens* Brongn. e *Malaxis pubescens* (Lindl.) Kuntze. a  $2n = 240$  em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (Felix & Guerra, 2010). A subtribo Laeliinae é relativamente pouco conhecida em termos de números cromossômicos com aproximadamente 2,5% de espécies citologicamente conhecidas. Dentre os gêneros desta subtribo, alguns são poucos estudados cariologicamente, quando comparados com outros gêneros da própria subtribo. Um bom exemplo disso é o gênero *Cattleya* Lindl. que apresenta quase metade de suas espécies estudadas, enquanto gêneros como *Encyclia* Hook. apenas sete das 154 espécies pertencentes a este gênero apresentam registro cromossômico (Felix & Guerra, 2010). Apesar de apresentar uma variação cariológica significativa,  $2n = 40$  é o número mais frequente na subtribo (Tanaka & Kamemoto, 1984) e  $x = 20$  é seu número básico, sugerindo que a evolução tenha sido por poliploidia seguido de disploidia (Felix & Guerra, 2010).

### 2.1.2. Gênero *Epidendrum* L.

*Epidendrum* é um gênero composto por cerca de 1500 espécies distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos (Carolina do Norte) até o Norte da Argentina (Chase *et al.*, 2003; Pinheiro & Barros, 2007). Ocorre em uma grande diversidade de habitats, apresentando espécies terrestres, rupícolas e epífitas (Paula & Silva, 2004). O gênero *Epidendrum* caracteriza-se morfológicamente por apresentar caules cilíndricos ou pseudobulbosos, algumas vezes cespitosos, folhas dísticas, inflorescências variáveis, flores ressupinadas ou não, labelo fundido com a base da coluna, estigma com lobos laterais bem desenvolvidos, e antera com duas ou quatro políneas sésseis. De acordo com Hágsater & Soto-Arenas (2005), *Epidendrum* encontra-se morfológicamente bem definido, cuja espécie-tipo é *Epidendrum nocturnum* Jacq.

Através de análises filogenéticas, baseadas em dados de sequências de DNA ribossomal (ITS), *Epidendrum* é considerado polifilético (van den Berg *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2003). Além disso, a ocorrência de números cromossômicos tão diferentes, aliada a grande variação morfológica, é um indicativo claro de sua complexidade taxonômica. O gênero *Epidendrum* tem sido longamente considerado um depósito de espécies taxonomicamente "mal resolvidas" (Dressler, 1993), e alguns aspectos da taxonomia e da evolução do grupo permanecem obscuros, especialmente aqueles relacionados ao desmembramento de *Epidendrum* e à criação de novos gêneros como *Neolehmannia* Kraenzl, ou algumas secções de *Epidendrum*, como a secção *Aulizeum*, que têm sido longamente considerados controversos. Alguns autores criticam a utilização de caracteres morfológicos individuais que têm sido utilizados para a segregação do gênero (Dressler, 1967).

Apenas 2,8% das espécies de *Epidendrum* são conhecidas citologicamente (Tabela 1), e estas demonstram variações cromossômicas entre espécies proximamente relacionadas e entre populações de uma mesma espécie. Em termos de variação cromossômica numérica, os registros variam de  $2n = 24$  em *E. mosenii* e *E. fulgens* (Tanaka & Kamemoto, 1984) até  $2n = 240$  em *Epidendrum cinnabarinum*, este último, o maior número cromossômico conhecido para a família Orchidaceae (Felix, 2001). O número cromossômico diplóide mais freqüente é consistentemente  $2n = 40$ , ocorrendo em 70% das espécies para as quais já se tem registro. *Epidendrum secundum*, *E. ciliare*, *E. nocturnum*, *E. radicans* e *E. xanthinum* são espécies que apresentam notável variação, formando séries poliplóides divergentes, com diversos casos de disploidias e

aneuploidias que, aliados ao pequeno número de espécies com registro cromossômico, dificulta o estabelecimento de um número básico para o gênero. Apesar da escassez de dados, alguns números cromossômicos no gênero *Epidendrum* são interpretados por alguns autores como séries de outros números básicos, i.e.  $x = 19$ , originando  $2x = 38$ ,  $3x = 57$ , e seria um caso de duplicação de  $x = 10$  com disploidia descendente de um cromossomo para produzir o número neobásico  $x = 19$  (Hágsater & Soto-Arenas, 2005). Outras linhagens de *Epidendrum* apresentam séries poliplóides divergentes, como em *E. fulgens* e *E. mosenii*, sendo  $n = 12$  resultante de disploidia ascendente.

*Epidendrum secundum* é um exemplo marcante de polimorfismo cromossômico numérico, apresentando diversos níveis de ploidia atualmente conhecidas, com  $2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80$  e  $84$  (Pinheiro & Barros, 2009; Felix & Guerra, 2010). *Epidendrum secundum* é uma das espécies mais variáveis e taxonomicamente menos compreendida (Brieger, 1976, 1977), com um grande número de sinônimos associados a ele, tais como *E. ansiferum* Rchb. *E. crassifolium* Lindl., *E. ellipticum* Graham. e *E. elongatum* Jacq. (Pinheiro & Barros, 2007a). Contudo, trata-se apenas de uma espécie altamente polimórfica, apresentando elevada variação morfológica contínua entre suas populações (Pinheiro & Barros, 2007). *E. secundum* encontra-se distribuído pela América do Sul, ocorrendo em uma variedade de habitats tais como os Andes, planalto central do Brasil, campos rupestres, ao longo da costa do Atlântico e em inselbergues na Caatinga (Pinheiro & Barros, 2007a), e demonstram grande habilidade de colonizar novos habitats.

*E. secundum* pertence ao subgênero *Amphiglottium*, que encontra-se subdividido em quatro seções: *Imbricata*, *Bifaria*, *Ancipta* e *Amphiglottium*, esta última, a qual pertence *E. secundum*, foi subdividida em três subseções (*Integra*, *Carinata*, e *Tuberculata*). Contudo, apenas as subseções *Tuberculata* e *Integra* são consideradas monofiléticas (Pinheiro *et al.*, 2009). *Epidendrum secundum* é classificado como pertencente a subseção *Tuberculata* (seção *Amphiglottium*), com base na morfologia dos calos do labelo (Pinheiro & Barros, 2007b).

## 2.2. Citogenética Vegetal

O uso de dados citogenéticos na taxonomia vem sendo feita desde o início do século passado, como um dos instrumentos importantes na sistemática vegetal para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução cromossômica

nas mais diversas categorias taxonômicas (Stebbins, 1971; Guerra, 1990). Diversos dados cromossômicos têm sido taxonomicamente utilizados, incluindo número, tamanho, morfologia, comportamento meiótico e conteúdo de DNA (Stuessy, 1990).

Os dados de números cromossômicos de vários estudos têm nos permitido avaliar apenas superficialmente a variabilidade numérica das plantas vasculares como um todo. O maior número conhecido em plantas,  $n = 630$ , foi observado em *Ophioglossum reticulatum* L., uma pteridófita homosporada (Stebbins, 1971). Nas angiospermas, os números cromossômicos têm variado de  $2n = 4$ , em cinco espécies de famílias distintas, incluindo *Rhynchospora tenuis* Link. da família Cyperaceae (Vanzela *et al.*, 1996), até  $2n = 640$  em *Sedum suaveolens* Kimnach, uma Crassulaceae (Leitch & Bennett, 1997). Algumas famílias apresentam uma notável variação numérica, como em Orchidaceae, com  $2n = 12$  em *Erycina pusilla* L. a  $2n = 240$  em *Epidendrum cinnabarinum* (Felix, 2001) e Commelinaceae com  $2n = 12$  a  $2n = 76$  (Pitrez *et al.*, 2001), enquanto outras são bastante regulares, como Phytolaccaceae, que apresenta apenas registros de  $n = 9$  ou seus múltiplos (Stuessy, 1990).

O número cromossômico é o parâmetro mais utilizado na citogenética vegetal, e a característica citológica sobre a qual se dispõe de um maior número de dados (Stuessy, 1990). Os primeiros estudos citogenéticos de plantas estavam restritos à determinação do número e da morfologia cromossômica com o uso de colorações convencionais (Guerra, 2000). No entanto, nas espécies vegetais com cromossomos de tamanho e morfologia semelhantes, as análises convencionais eram limitadas e pouco informativas. Como a caracterização do conjunto cromossômico de uma espécie é essencial para a pesquisa citogenética, novas técnicas visando contornar essas limitações foram desenvolvidas.

A introdução das técnicas de bandeamento cromossômico ocorreu por volta de 1970 e possibilitou a exploração de novos enfoques na caracterização cromossômica pela coloração diferencial de determinadas regiões dos cromossomos (Casperson *et al.*, 1970). Técnicas de coloração diferencial como bandeamento Q, G ou R permitiram ampliar as análises de caracterização e evolução cariotípica em diversas espécies (Friebe *et al.*, 1996). A técnica de bandeamento C é amplamente empregada na citogenética vegetal e se caracteriza por revelar blocos de heterocromatina constitutiva que permanecem condensadas durante todo o ciclo celular e se distribuem preferencialmente nas regiões terminais e/ou proximais dos cromossomos (Guerra, 2000; Summer, 2003). Schwarzacher *et al.* (1980), baseando-se no padrão de

distribuição de bandas C de duas espécies do gênero *Cephalanthera* Rich., identificou os pares dos seus cromossomos homólogos. Guerra (2000) analisou os padrões de distribuição da heterocromatina nos cromossomos de 105 espécies pertencentes a 90 gêneros de angiospermas, onde se utilizou tanto a coloração com fluorocromos como o bandeamento C. Ainda, Tuna *et al.* (2001) analisaram a distribuição da heterocromatina de 20 acessos da espécie *Bromus riparius* Rehm. (PI 440215) utilizando a técnica de bandeamento C, o que os possibilitou parear todos os homólogos e montar um cariógrama a partir do tamanho cromossômico e posição das bandas C.

O bandeamento C provou ser uma ótima ferramenta na citotaxonomia, mas apresenta limitações importantes, uma delas relacionada à conservação da morfologia cromossômica, pois o procedimento atua fortemente nos cromossomos, levando a perda de DNA e proteínas, principalmente nas regiões eucromáticas (Summer, 2003)

### **2.2.1. Bandeamento com Fluorocromos**

Devido à utilidade do bandeamento cromossômico na caracterização de cariótipos, muitas técnicas têm sido aprimoradas para a visualização da heterocromatina. Os estudos citogenéticos passaram a incorporar o uso de fluorocromos, corantes que apresentam propriedades fluorescentes base-específicas que permitem caracterizar sequências repetitivas pela proporção de pares de bases GC (guanina/citosina) e AT (adenina/timina) (Schweizer & Ambros, 1994). Dentre os fluorocromos que apresentam afinidade pelas bases AT se destacam o DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), o Hoechst 33258 e a Quinacrina, enquanto que a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e a Mitramicina apresentam afinidade por regiões ricas em GC (Schweizer & Ambros, 1994; Sumner, 2003). Dos fluorocromos acima citados, os mais comumente utilizados na citogenética vegetal são o CMA e o DAPI, principalmente na forma de dupla coloração, técnica onde a mesma lâmina é corada com um fluorocromo e contracorada com outro, respectivamente nesse caso, o CMA seguido do DAPI. As reações dos fluorocromos com os cromossomos dependem principalmente da composição das bases nitrogenadas da molécula de DNA, de tal forma que cada região do cromossomo pode apresentar reações positivas (+), negativas (-) ou neutras (0) com um dado fluorocromo (Schweizer, 1981).

O uso em conjunto dos dois fluorocromos CMA/DAPI tem permitido comparar cariótipos e esclarecer relações evolutivas em vários gêneros vegetais (Roser, 1994,

1995; Moraes *et al.*, 2007a,b). Hizume *et al.* (1989), por exemplo, conseguiram caracterizar e identificar todos os cromossomos de *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. e *P. thunbergii* Parl. Almeida *et al.* (2007) utilizando CMA/DAPI, além de outras técnicas como FISH e GISH, analisaram varias espécies relacionadas do gênero *Spondias* L. e demonstraram que o umbu-cajá não é resultado da hibridização de *S. tuberosa* Arruda Câmara com *S. monbin* L. como supunham anteriormente. Moraes & Guerra (2010) confirmaram que *Emilia sonchifolia* (L.) DC. é um dos parentais de *E. forsbergii* Nicolson utilizando os padrões de distribuição das bandas CMA/DAPI, sítios de DNA ribossomal 5S e 45S, além da técnica de GISH, a qual forneceu dados mais precisos para afirmar que *E. forsbergii* tem uma origem híbrida.

Poucos são os estudos dos padrões de distribuição da heterocromatina na família Orchidaceae. Kao *et al.* (2001) estudaram os padrões de acúmulo de heterocromatina de nove espécies do gênero *Phalaenopsis* Blume, D'Emerico *et al.* (2005) estudaram a HC de algumas espécies do gênero *Ophrys* L., Cabral *et al.* (2006) analisando os padrões de distribuição da HC em quatro espécies do gênero *Maxillaria* Ruiz & Pav., observaram que os sítios de DNAr 5S e 45S co-localizam com algumas das bandas CMA<sup>+</sup>. Koehler *et al.* (2008) analisaram filogeneticamente 48 espécies utilizando intron plastidial *trnL* e espaçador intergênico *trnL-F*, além do estudo dos padrões de distribuição de HC em 18 espécies de *Maxillariinae*, onde foi possível esclarecer os fenômenos envolvidos na evolução cariotípica do grupo. As espécies analisadas apresentaram um número maior de cromossomos contendo bandas DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup> do que cromossomos com bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI. A partir destas análises os autores sugerem que a fusão e/ou fissão cêntrica é o principal mecanismo envolvido na diferenciação displóide do número cromossômico para algumas espécies do gênero *Christensonella* Szlach., Mytnik, Górnjak & Smiszek, especialmente em *C. ferdinandiana*. (Barb.Rodr.) Szlach., Mytnik, Górnjak & Smiszek. Conforme Koehler *et al.* (2008), o padrão de distribuição da heterocromatina provou ser uma fonte valiosa de informação relacionada aos padrões evolutivos dentro do grupo. No estudo da subtribo Laelliinae, Souza (2011) observou a distribuição da HC e dos sítios de DNAr 5S e 45S, e verificou que todas as bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI co-localizam com os sítios 45S, além de serem conspicuamente heteromórficas, demonstrando também a existência de bandas DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup>. Apesar de o número cromossômico  $2n = 40$  na subtribo Laelliinae representar 70% das espécies para as quais existem contagens cromossômicas, o uso da técnica de bandeamento com fluorocromos e o uso de marcadores cito-moleculares revelam uma grande variabilidade

cariotípica nestas espécies, o que não seria possível verificar apenas pelo uso de técnicas com coloração convencional.

### 2.2.2. Heterocromatina

Emil Heitz (1923) foi o primeiro a distinguir a heterocromatina da eucromatina ou cromatina verdadeira com base na compactação da cromatina de células em interfase. A heterocromatina foi descrita como uma região do cromossomo que permanecia condensada em todo ciclo celular. Posteriormente, Nagl (1979) revelou em seus estudos uma parte da eucromatina que permanecia condensada durante a interfase, conhecida como “eucromatina condensada” presentes nos cromocentros. Brown (1966) classificou a heterocromatina em duas classes: heterocromatina facultativa (HF), a qual permanecia condensada durante todo o ciclo celular, ocorrendo apenas em um dos cromossomos do par homólogo, assim apresentando a mesma composição de DNA da cromatina do homólogo eucromático; e a heterocromatina constitutiva (HC) que ocorre no mesmo sítio de ambos os cromossomos homólogos. A HF está geralmente associada com os cromossomos sexuais e diferenciação sexual, mas não está necessariamente restrita a um dos pares cromossômicos. Estas designações sempre relacionam o tipo de cromatina as suas propriedades de condensação e coloração.

Com o intuito de diferenciar a cromatina dos cromossomos, muitos citogeneticistas utilizam o bandeamento C, que revela os blocos de HC que permanecem condensadas durante todo o ciclo celular e se distribuem preferencialmente nas regiões terminais e/ou proximais dos cromossomos (Guerra, 2000; Summer, 2003). Muitos trabalhos foram desenvolvidos com o uso dessa técnica e conseguiram bons resultados (Schwarzacher *et al.*, 1980; Guerra, 2000; Tuna *et al.*, 2001). O bandeamento C mostrou-se como uma ótima ferramenta para a citotaxonomia, mas apresenta limitações, como a distorção da morfologia dos cromossomos (Summer, 2003), ou mesmo sua ineficiência em detectar bandas heterocromáticas muito pequenas, como em *Emilia forsbegii* (Moraes & Guerra, 2010), onde o bandeamento com fluorocromos mostrou-se mais sensível em localizar blocos pequenos de heterocromatina. O uso dos fluorocromos permite a detecção de sequências repetitivas pela proporção de pares de bases GC (guanina/citosina) e AT (adenina/timina) (Schweizer & Ambros, 1994). Essa técnica auxilia a distinguir alguns tipos de heterocromatina em plantas (Schweizer, 1976). Além disso, tem permitido comparar a distribuição das regiões heterocromáticas

nos cromossomos e esclarecer relações evolutivas em vários gêneros vegetais (Hizume *et al.*, 1989; Roser, 1994, 1995; Moraes *et al.*, 2007a,b; Almeida *et al.*, 2007; Moraes & Guerra 2010).

A HF é melhor definida como uma região que é reprimida epigeneticamente e é heterocromática por apenas uma parte do ciclo celular (Sumner, 2003). A HC pode ser definida como uma substância que tende a ter uma composição de DNA diferente da eucromatina, e não ser transcrita devido a sua composição de DNA (Sumner, 2003).

A heterocromatina tem um papel importante na manutenção de milhares de genes e inibição de outros elementos de DNA em ordem a permitir um seqüencia estruturada de eventos transcricionais durante o desenvolvimento (Fransz & Tessadori, 2006). Nos processos de silenciamento gênico está uma cadeia de interações moleculares epigenéticas, incluindo a metilação do DNA e as modificações de histonas. Embora o silenciamento gênico epigenético tenha se tornado quase sinônimo de heterocromatização, existem vários artigos na literatura nos quais a formação da heterocromatina é necessária para a ativação da expressão gênica (Weiler & Wakimoto, 1995; Lu *et al.*, 2000; Yasuhara & Wakimoto, 2006; Grewal & Jia, 2007).

A formação da heterocromatina e sua manutenção integram diversos tipos de informações, incluindo localização cromossômica, localização nuclear e presença de elementos de DNA repetitivo (Weiler & Wakimoto, 1995; Hall & Grewal, 2003). As análises dos padrões de distribuição de HC nos complementos cromossômicos das angiospermas em geral é dificultada pela alta variabilidade da HC junto à variabilidade de outros parâmetros cariotípicos. De acordo com Guerra (2000), nas análises dos padrões de bandas da HC de diferentes espécies devem-se considerar alguns aspectos como: a não homogeneidade da HC, sua variação qualitativa e quantitativa entre espécies; a freqüência de polimorfismos no número e tamanho das bandas dentro de uma mesma espécie; ainda que tanto a HC como a eucromatina possam sofrer mudanças relativas em um curto período de tempo, que diferentes técnicas de coloração podem revelar diferentes frações da HC, e ainda que espécies muito diferentes podem apresentar diferenças simultâneas no número, tamanho e morfologia cromossômica, tanto quanto a quantidade, composição e distribuição da HC (Greilhuber, 1982; John, 1988; Sumner, 1990).

Vários trabalhos com intuito de caracterizar a distribuição das bandas da HC entre espécies relacionadas têm sido realizados (Hizume *et al.*, 1989; Almeida *et al.*, 2007; Guerra, 2008; Moraes & Guerra, 2010), como também na família Orchidaceae

(Kao *et al.*, 2001; D'Emerico *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2006; Koehler *et al.*, 2008; Souza, 2011). Questões acerca da evolução cariotípica de alguns grupos a partir de técnicas de coloração diferencial e de hibridização *in situ* também têm sido levantadas, no entanto, o significado funcional e evolucionário da HC pode não ser o mesmo para todas as espécies, e um padrão simples de distribuição para todas as angiospermas pode não existir, apenas tendências ou padrões preferenciais para diferentes genomas e arquiteturas cariotípicas (Guerra, 2000).

### **2.3. Evolução Cariotípica**

Após um intervalo de tempo suficientemente longo, populações tendem a se diferenciar devido a pequenas mudanças cumulativas, ou seja, como consequência de mutações. Estas populações podem eventualmente se diferenciar a tal ponto, que se tornam isoladas reprodutivamente dos indivíduos da população original. Isto se deve, em parte, a processos adaptativos da espécie à própria instabilidade biótica e abiótica do seu habitat, e, em parte, ao fato de que a variabilidade genética das espécies não apenas serve como um tampão para as variações cíclicas e acíclicas do meio ambiente, como também está sujeita às forças do acaso, sendo, portanto, um processo estocástico. O conjunto de processos adaptativos e estocásticos leva a que muitas das características gênicas e cariotípicas de uma espécie sejam alteradas ao longo da evolução. Por essa razão, uma espécie ancestral só coexiste com suas espécies derivadas se a divergência tiver sido relativamente recente (Guerra, 1988).

Cariótipo é o aspecto morfológico do complemento cromossômico visto em qualquer uma das fases do ciclo celular na mitose ou meiose (Stebbins, 1971; Guerra, 1988). Diferentes organismos apresentam diferentes conjuntos cromossômicos, e no geral os cariótipos de espécies relacionadas são mais similares que aqueles cariótipos de espécies relativamente distantes (Sumner, 2003). Mudanças no tamanho do cromossomo e morfologia são características do processo evolutivo, e é possível descrever os vários caminhos pelos quais cada cromossomo ou mesmo todo o genoma percorreu durante o tempo, de uma espécie para outra (Sumner, 2003). O uso dos dados cariológicos na taxonomia, tradicionalmente referido como citotaxonomia (Greilhuber & Ehrendorfer, 1988) contribuem na avaliação das relações genéticas entre espécies ou populações e a um melhor entendimento de como eles divergiram um do outro (Guerra, 2008).

### 2.3.1. Poliploidia

Estima-se que 30 a 80% das angiospermas são poliplóides (Moore, 1995; Otto & Whitton, 2000), portanto esse mecanismo demonstra ser muito importante na evolução desse grupo (Otto & Whitton, 2000). A poliploidia consiste na ocorrência de mais de duas cópias genômicas em um único núcleo (Adams & Wendel, 2005), principalmente como consequência de endomitoses ou pela fusão de gametas não reduzidos. Portanto, é também uma das principais causas da variação cromossômica numérica, não programada geneticamente, que pode ocorrer entre espécies, entre indivíduos de uma mesma espécie ou entre populações (Guerra, 1988).

A poliploidia é muito mais complexa do que uma mera interação que surge entre dois genomas, é um fenômeno que envolve amplo espectro de ajustamentos moleculares e fisiológicos (Adams & Wendel, 2005), complexas reorganizações genéticas, incluindo trocas entre genomas, alterações na expressão gênica e nos padrões de metilação de DNA, silenciamento genético induzido epigeneticamente, perda de sequências curtas, além de novos fenótipos que emergem através da poliploidia (Levy & Feldman, 2004; Sumner, 2003). Além do mais, a poliploidia é um fenômeno recorrente na evolução das plantas, podendo direcionar a perda diferencial de genes, e está frequentemente associada à hibridização (Stebbins, 1971).

Acredita-se que a poliploidia é o mecanismo pelo qual algumas espécies evoluíram números cromossômicos muito altos, como *Sedum suaveolens*, com  $2n = 640$  ca.  $80x$ , a maior contagem cromossômica entre as angiospermas (Uhl CH., 1978) e *Ophioglossum pycnostichum* (uma pteridófito) com  $2n = 1260$  ca.  $84x$ , a maior contagem entre as plantas (Love *et al.*, 1977). Na família Orchidaceae, *Epidendrum cinnabarinum* apresenta  $2n = 240$  (ca.  $24x$ ), sendo a maior contagem cromossômica dentre todas as orquídeas para as quais já apresentam-se analisadas (Félix & Guerra, 2005).

Diversos gêneros, nos quais um número básico forma uma série poliplóide, podem conter um segundo número básico, derivado do primeiro, pela duplicação cromossômica seguida da perda (ou ganho) de um ou mais cromossomos no início de uma linhagem nova, o qual se denomina número básico secundário, que iniciam no grupo uma nova série poliplóide (Brandham, 1999). Uma grande variação no número cromossômico observados em muitos grupos de orquídeas terrestres dificulta o

reconhecimento de  $x = 7$  como número básico para a família Orchidaceae (Guerra, 2008). No entanto, quando o número básico de cada gênero foi identificado, muitos deles se enquadravam em séries poliplóides  $n = 7 \pm 1$ ,  $14 \pm 1$ , e  $21 \pm 1$ , sugerindo que a disploidia ocorreu em todos os níveis de ploidia e em alguns gêneros o número dominante foi o displóide em vez do número euplóide (Felix & Guerra, 2005).

Berjano *et al.* (2009) analisando representantes do gênero *Aristolochia* L. “*sensu lato*” sugeriram *A. paucinervis* como sendo um hexaploide, considerando  $x = 6$  como número básico e que tenha sofrido uma redução por disploidia de  $2n = 36$  a  $2n = 34$ , ou mesmo considerando  $x = 7$  como número básico, demonstrando uma forte redução por disploidia. Moraes & Guerra (2010) analisando a origem híbrida do tetraplóide *Emilia forbergii* ( $2n = 20$ ) sugeriram que o conjunto de cromossomos menores de *E. forbergii* pertencem ao diplóide *E. sonchifolia* ( $2n = 10$ ). Xiong & Pires (2011) identificaram os cromossomos homeólogos correspondentes do alopoliplóide *Brassica napus* ( $2n = 38$ ) entre o genoma A (de *B. rapa*,  $2n = 20$ ) e o genoma C (de *B. oleracea*,  $2n = 18$ ), com base em um robusto mapeamento gênico utilizando a técnica BAC-FISH, além da localização dos sítios de DNAr 5S e 45S.

Autopoliplóides recentes frequentemente conservam muito das características cariotípicas, como morfologia dos cromossomos, bandas heterocromáticas, quantidade de DNA, número e posição de sítios de DNAr, enquanto os poliplóides mais antigos tendem a perder algumas dessas sequências e tornam-se menos parecidos com suas espécies relacionadas diplóides (Weiss & Maluszynska, 2000; Bennet & Leitch, 2005; Kovarik *et al.*, 2008). Souza *et al.* (2010), estudando espécies do gênero *Ipheion*, demonstraram que *I. uniflorum*, com  $2n = 24$ , apresenta duplicação quase exata da morfologia dos cromossomos, bandas CMA<sup>+</sup>, e sítios de DNAr, em relação ao citotipo diplóide de outro exemplar de *I. uniflorum* com  $2n = 12$ , sugerindo ao autopoliplóide uma origem recente.

### 2.3.2. Disploidia

Ehrendirfer (1964) descreve disploidia como sendo o aumento ou diminuição gradativa no número cromossômico haplóide observado entre as espécies, frequentemente formando séries displóides. Na literatura encontramos exemplos clássicos de séries displóides como em *Crepis*, *Haplopappus*, *Luzula*, *Clarkia*, *Crocus*, *Podocarpus* e muitos outros (Stebbins, 1971; Grant, 1982). Diferente das aneuploidias,

onde há perda ou ganho de material genético, nas disploidias pode haver redução ou aumento no número cromossômico sem haver alteração quantitativa ou qualitativa no material genético (Guerra, 1988). Isso pode ocorrer devido a rearranjos estruturais do tipo translocação e fusão ou fissão cêntricas (Guerra, 1988; Sumner, 2003).

Em *Vicia faba* sequências teloméricas têm sido encontradas nos centrômeros do único par de cromossomos metacêntricos, supostamente originado a partir de uma fusão de dois cromossomos telocêntricos (Schubert, 1992). Jones (1998) listou diversos gêneros onde um grande número de séries displóides é reportado, e são claramente relacionadas à translocação Robertsoniana, incluindo *Cymbispatha*, *Gibasis*, *Lycoris*, *Nothoscordum*, entre outros. Guerra (2008) sugere que *Nothoscordum macrostemon*, com  $2n = 10$  (6M + 4A), tenha sofrido possivelmente uma fissão ou fusão cromossômica, com base no cariótipo de *N. montevidense*, com  $2n = 8$  (8M), uma espécie relacionada. Salles de Melo *et al.* (2010) analisando espécies da subtribo Vernonieae sugeriram que o principal mecanismo carioevolutivo para o grupo foi a disploidia, provavelmente associada a poliploidia por processos de hibridações ancestrais gerando a maioria dos gêneros paleotetraploides.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

*Material Botânico* – Foram analisadas três espécies do gênero *Epidendrum*, incluindo *E. fulgens*, *E. xanthinum* e *E. secundum*. Adicionalmente, foram analisados dois híbridos interespecíficos, o primeiro entre *E. xanthinum* x *E. secundum*, proveniente de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, e que ocorre em simpatria com as espécies parentais utilizadas no presente estudo, o segundo entre *E. fulgens* e *E. secundum*, designado aqui como *Epidendrum* sp. aff. *fulgens*, encontrado em simpatria com as duas últimas no município de São João do Tigre, estado da Paraíba (Tabela 1). As espécies foram obtidas através de coletas no campo, ou gentilmente cedidas pelo Instituto de Botânica de São Paulo (IBT). Todas as espécies foram mantidas em cultivo no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba – Campus II.

*Preparação cromossômica* – Para as análises mitóticas, coletaram-se pontas de raízes jovens imediatamente submetidas à pré-tratamento com 8-HQ (8-hidroxiquinoleína) por 24 horas a 18°C, e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1

(etanol: ácido acético glacial) por 3 horas à temperatura ambiente e depois estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior análise. As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos e digeridas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em solução contendo 2% de celulase (Onozuka) – e 20% de pectinase (Sigma, Saint Louis, MO) (w/v).

O meristema de cada raiz individual foi fragmentado sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45%, coberto com uma lamínula e esmagado, sendo a lamínula posteriormente removida após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente.

*Coloração com Fluorocromos Cromomicina A<sub>3</sub> e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (CMA/DAPI)* – após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com CMA e DAPI como descrito previamente (Barros e Silva & Guerra, 2010). As lâminas foram coradas com CMA<sub>3</sub> (0.5 mg/ml) durante uma hora, lavadas em água destilada, secas ao ar, coradas com DAPI (1 µg/ml) por 30 minutos, lavadas novamente, secas, e montadas em glicerol e tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). As melhores metáfases foram capturadas com uma câmera de vídeo Cohu usando o software Leica QFISH. Os principais dados obtidos com a coloração CMA/DAPI estão sumarizados na Tabela 2.

*Análises e medidas cromossômicas* – Para cada espécie, foram medidas três metáfases com morfologia cromossômica clara utilizando-se o software Image tool versão 3.0. A relação entre os braços cromossômicos (comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) foi utilizada para classificar os cromossomos como metacêntricos (1 – 1,4), submetacêntricos (1,5 – 2,9), ou acrocêntricos ( $\geq 3,0$ ), de acordo com Guerra (1986). Além disso, foram calculadas a média total do comprimento cromossômico haplóide (tl), a média do comprimento cromossômico (C), relação entre o maior e o menor cromossomo do complemento (R) e a média da relação entre os braços (r). A assimetria cariotípica foi estimada utilizando-se os índices intracromossômicos (A<sub>1</sub>) e intercromossômicos (A<sub>2</sub>) conforme Romero Zarco (1986). Utilizou-se também a categoria de assimetria de Stebbins na classificação dos cariótipos das espécies analisadas. Ideogramas foram construídos com base nos padrões de distribuição de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup>, CMA<sup>0</sup>/DAPI<sup>-</sup> para ilustrar os tipos de cromossomos encontrados em cada espécie.

*Análises morfométricas* – foram analisados 15 caracteres morfológicos florais (Tabela 3) com base em Pinheiro e Barros (2007b), com algumas modificações. Todas as medidas foram tomadas com o auxílio de um paquímetro digital JOMARCA®, a partir do ponto de maior dimensão para cada caractere. Exsiccatas de todos os materiais analisados encontram-se depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (EAN) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Os dados foram analisados com o software STATISTICA version 10.0 StatSoft, Inc. (2011) para o cálculo das médias e do desvio padrão (Tabela 3). Procedeu-se uma análise multivariada e de Agrupamento, utilizando-se o método de agrupamento do vizinho mais próximo, para identificar a ocorrência de grupos morfológicamente bem definidos. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizada para sumarizar a variação entre as populações e identificar a natureza intermediária das características morfológicas florais do híbrido entre *E. fulgens* e *E. secundum*. Na ACP, o número de eixos informativos foi determinado pelos autovalores.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise dos cromossomos mitóticos

A lista das espécies analisadas, seus respectivos locais de coleta, números cromossômicos, características cariomorfológicas e índices de assimetria estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão sumarizados o número e tipo de bandas heterocromáticas para cada espécie. Os números cromossômicos variaram de  $2n = 24$  em *E. fulgens* até  $2n = 64$  em *Epidendrum* sp. aff. *fulgens*, enquanto o tamanho dos cromossomos de *E. secundum* variaram desde 0,75  $\mu\text{m}$  no menor cromossomo da população de Atibaia - SP, a 7,10  $\mu\text{m}$  no maior cromossomo da população de Nova Friburgo – RJ. Os cariótipos de todas as espécies apresentaram-se geralmente simétricos, formados por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Nos terminais de pelo menos um par cromossômico, foram identificadas regiões  $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$  (exceto população de Nova Friburgo de *E. secundum*), algumas regiões  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  (exceto em uma única população de *E. fulgens* de São João do Tigre) e  $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^-$  (exceto em uma única população de *E. secundum* de São João do Tigre), estas últimas, sem formar bandas claramente visualizáveis, mesmo após a sobreposição e processamento digital das imagens. Em geral, as regiões pericentroméricas

apresentaram-se  $CMA^0/DAPI^-$ , enquanto grandes blocos  $CMA^-/DAPI^+$  ocupando quase todo ou os terminais dos braços curtos de alguns cromossomos de todas as espécies, com exceção de *Epidendrum secundum* de Nova Friburgo. Apenas *E. xanthinum* apresentou uma banda intersticial  $CMA^-/DAPI^+$  em apenas um par cromossômico.

Das duas populações de *Epidendrum fulgens* analisadas, a população de Panelas (Pernambuco), com  $2n = 24$  (Figura 1a-c), apresentou um cariótipo bimodal (Figura 1c), com 15 cromossomos metacêntricos e nove submetacêntricos, com um par de bandas terminais  $CMA^+/DAPI^-$  heteromórficas (Figura 1c, setas amarelas), seis bandas terminais  $CMA^-/DAPI^+$  (Figura 1c), sendo três blocos grandes e três pequenas bandas nos terminais dos braços curtos de cromossomos submetacêntricos (Figura 1c, insertos). A população coletada em São João do Tigre (Paraíba) apresentou cariótipo com  $2n = 50$  (Figura 1d-f), e ocorrência, em algumas células, de um pequeno cromossomo supranumerário inteiramente  $CMA^0/DAPI^-$  (Figura 1f, inserto), com ligeira bimodalidade devido a presença de um par cromossômico claramente maior que os demais. Foram visualizadas 16 bandas terminais  $CMA^-/DAPI^+$ , seis das quais localizadas nos braços longos, e as demais nos braços curtos, além de quatro bandas  $CMA^0/DAPI^-$  (Figura 1f, setas amarelas) nos terminais do braço curto de dois pares cromossômicos pequenos submetacêntricos.

Em São João do Tigre, foram encontrados em simpatria com *E. fulgens*, indivíduos de *E. secundum* com  $2n = 56$  (Figura 1g-i). Nesse caso, só foram obtidas células prometáfásicas, não sendo possível detalhar a morfologia cromossômica deste citótipo em virtude do estágio de condensação dos cromossomos. Foram observadas oito bandas terminais  $CMA^-/DAPI^+$ , quatro delas localizadas em cromossomos maiores e as demais em cromossomos medianos. Também foram visualizadas três pequenas bandas  $CMA^+/DAPI^-$  (Figura 1i, setas amarelas), duas delas formando pequenos satélites distendidos. Além de *E. fulgens* e *E. secundum*, foi observado nesta mesma localidade, uma população com características de morfologia floral intermediária entre essas duas espécies. Esse material, denominado *Epidendrum* sp. (*aff. fulgens*), apresentou  $2n = 64$  (Figura 1j-l), cariótipo ligeiramente bimodal devido à presença de um par cromossômico maior (Figura 1l, setas brancas). Foram visualizadas três bandas  $CMA^+/DAPI^-$  (Figura 1l, insertos) provavelmente correspondentes as RONS, além de 14 bandas terminais  $CMA^-/DAPI^+$ , geralmente localizadas no braço curto de sete pares metacêntricos e submetacêntricos (Figura 1l).

**Tabela 1.** Espécies do gênero *Epidendrum* L (subgênero *Amphiglottium*), com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diploide (**2n**), número cromossômico haploide (**n**), fórmula cariotípica (**FC**), número fundamental (**NF**), variação no tamanho cromossômico, média total do comprimento cromossômico haploide (**tl**), média do comprimento cromossômico (**C**), relação entre o cromossomo maior e o menor no complemento (**R**), média da relação entre os braços cromossômicos (**r**), índice de assimetria intracromossômica (**A<sub>1</sub>**) e índice de assimetria intercromossômica (**A<sub>2</sub>**).

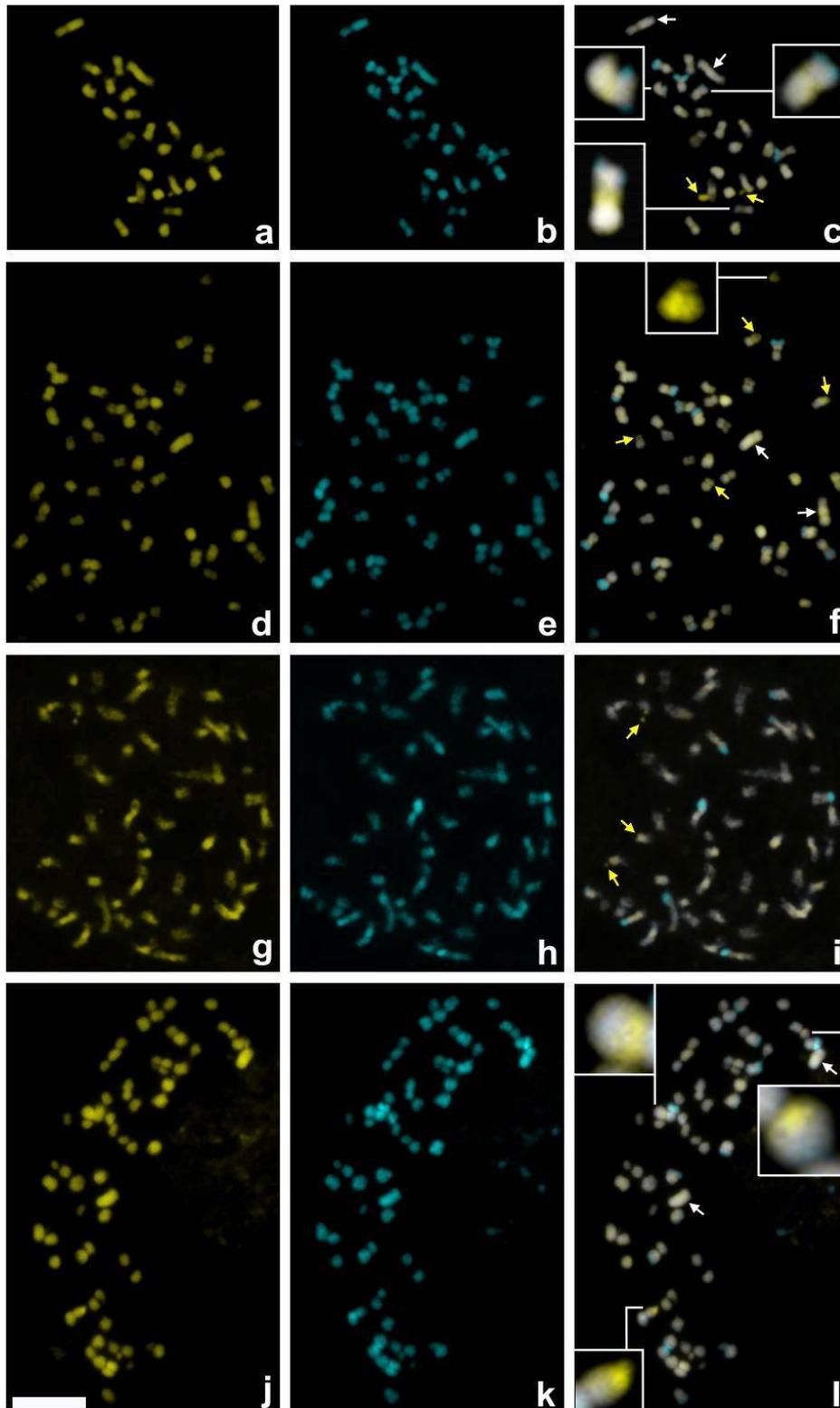
Espécie	Coletor	Local de Coleta	2n	n	FC	NF	Tamanho cromossômico (µm)	tl	C	R	r	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
<i>Epidendrum fulgens</i> Brongn.	L.P.Felix, 12515	Panelas, PE	24	12	15 MT + 9 SM	48	1,75 – 4,49	32,17	2,47	2,33	1,37	0,29	0,24
<i>E. fulgens</i> Brongn.	S.N. 93	São João do Tigre, PB	50+1B	25	40 MT + 10 SM	100	1,28 – 4,24	57,55	2,30	3,21	1,30	0,21	0,27
<i>Epidendrum</i> sp. ( <i>aff. fulgens</i> )	S.N. 92	São João do Tigre, PB	64	32	26 MT + 38 SM	128	0,82 – 2,91	53,72	1,68	2,96	1,63	0,35	0,25
<i>E. secundum</i> Jacq.	IBT 17660	Atibaia, SP	56	28	31 MT + 25 SM	112	0,75 – 3,34	46,99	1,68	3,71	1,49	0,28	0,32
<i>E. secundum</i> Jacq.	IBT 17841s	Nova Friburgo, RJ	58	29	31 MT + 27 SM	116	1,27 – 7,10	87,52	3,02	4,97	1,63	0,34	0,43
<i>E. secundum</i> Jacq.	IBT 17840	Nova Friburgo, RJ	56	28	31 MT + 25 SM	112	1,10 – 3,35	51,31	1,90	2,67	1,59	0,32	0,26
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	IBT 17671	Nova Friburgo, RJ	28	14	18 MT + 10 SM	56	1,57 – 5,0	37,91	2,71	3,02	1,48	0,29	0,35
<i>E. secundum</i> x <i>E. xanthinum</i>	IBT 19L	Nova Friburgo, RJ	42	21	18 MT + 24 SM	84	1,28 – 5,88	68,45	3,26	4,20	1,72	0,36	0,33

**Tabela 2.** Espécies de *Epidendrum* L. (subgênero *Amphiglottium*) com seus respectivos números cromossômicos diplóides ( $2n$ ), tipo e número de bandas terminais heterocromáticas, tipo e número de bandas pericentroméricas e números de bandas intersticiais.

Espécie	Local de coleta	Bandas Terminais			Bandas Intersticiais
		CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	CMA <sup>-</sup> /DAPI <sup>+</sup>	CMA <sup>0</sup> /DAPI <sup>-</sup>	
<i>Epidendrum fulgens</i>	Panelas, PE	02	06	08	-
<i>E. fulgens</i> (parental)	São João do Tigre, PB	-	16	04	-
<i>Epidendrum</i> sp. ( <i>aff. fulgens</i> )	São João do Tigre, PB	03	14	06	-
<i>E. secundum</i> (parental)	São João do Tigre, PB	03	08	-	-
<i>E. secundum</i> Jacq.	Atibaia, SP	04	02	08	-
<i>E. secundum</i>	Nova Friburgo, RJ	02	-	04	02 DAPI/CMA <sup>+</sup>
<i>E. secundum</i> (parental)	Nova Friburgo, RJ	06	02	04	-
<i>E. xanthinum</i> (parental)	Nova Friburgo, RJ	03	04	06	02 DAPI <sup>+</sup> /CMA <sup>-</sup>
<i>E. secundum</i> x <i>E. xanthinum</i>	Nova Friburgo, RJ	04	02	03	-

**Tabela 3.** Sumário da estatística descritiva para as características morfológicas qualitativas medidas em 18 indivíduos de *E. secundum*, *E. fulgens* e *Epidendrum* sp. *aff. fulgens* ocorrendo em simpatria na população de São João do Tigre, Paraíba.

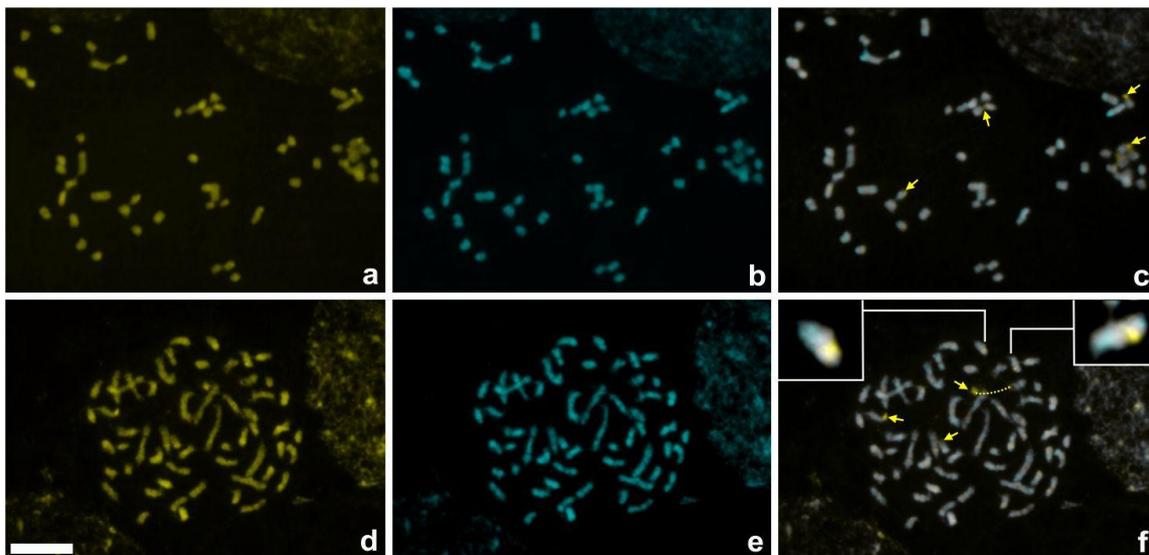
Caracteres	Sigla	Médias	Desvio padrão
Comprimento da sépala dorsal	DS-L	9,13	1,47
Largura da sépala dorsal	DS-W	3,76	0,90
Comprimento da sépala lateral	LS-L	9,58	1,37
Comprimento da sépala lateral	LS-W	4,05	0,69
Comprimento da pétala	PT-L	9,14	1,44
Largura da pétala	PT-W	3,73	1,07
Comprimento do labelo	LA-L	4,93	0,76
Largura do labelo	LA-W	9,91	2,45
Comprimento da coluna	CO-L	6,85	1,50
Comprimento do lóbulo lateral	LL-L	4,32	1,34
Largura do lóbulo lateral	LL-W	4,69	1,76
Comprimento do lóbulo central	CL-L	3,26	0,52
Largura do lóbulo central	CL-W	4,53	1,08
Comprimento do calo do labelo	CA-L	2,63	0,34
Largura do calo do labelo	CA-W	2,04	0,67



**Figura 1** Células metafásicas de *Epidendrum fulgens* com  $2n = 24$  (**a-c**: Panelas, PE), *E. fulgens* com  $2n = 50 + 1B$  (**d-f**: São João do Tigre, PB), *E. secundum* com  $2n = 56$  (**g-i**: São João do Tigre, PB), *Epidendrum* sp. (*aff. fulgens*) com  $2n = 64$  (**j-l**: São João do Tigre, PB), coradas com CMA (**a, d, g, j**), DAPI (**b, e, h, k**) e imagens dos dois fluorocromos (**c, f, i, l**). Setas brancas indicam cromossomos maiores, setas amarelas, bandas terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI. Inseto em **c** destaca bandas terminais DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup> inconspícuas, em **f** destaca

cromossomo B, em I destaca bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> discretas. A barra em j corresponde a 10µm.

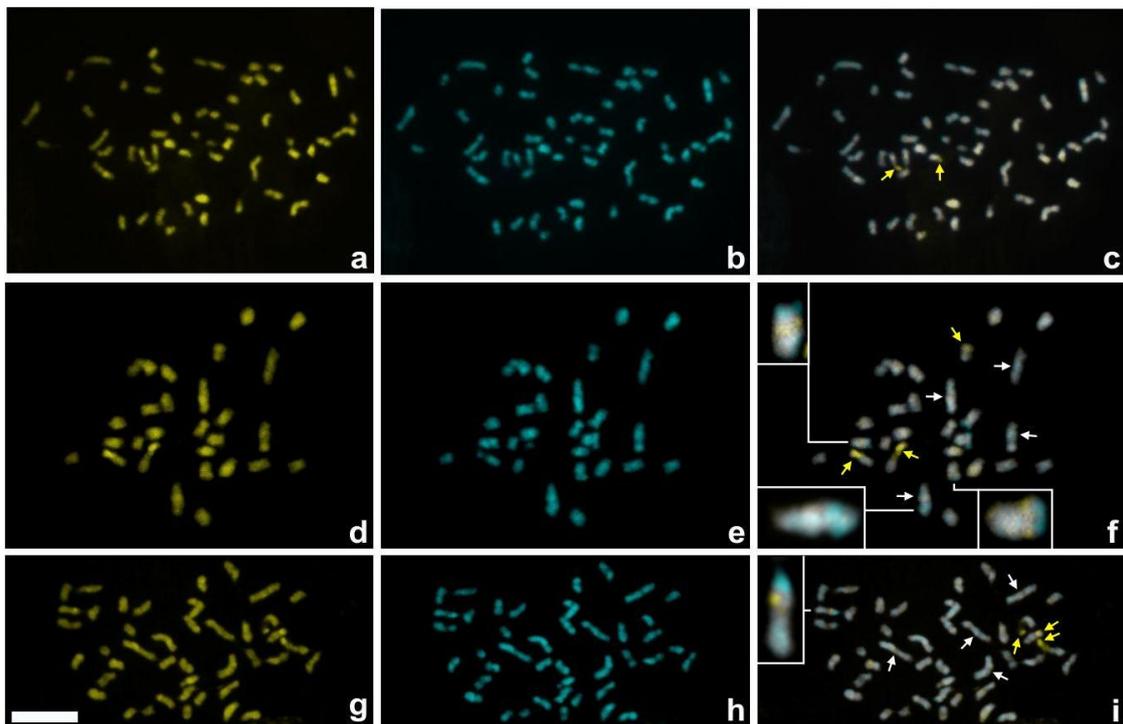
Foram analisadas outras duas populações de *E. secundum*, sendo uma de Atibaia, estado de São Paulo e outra de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, ambas da Região sudeste do país. Na população de Atibaia foi observado um citotipo com  $2n = 56$  (Figura 2c) exibindo 31 cromossomos metacêntricos e 25 submetacêntricos, com quatro bandas terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Figura 2c, setas amarelas), provavelmente correspondentes as RONS, além de dois grandes blocos CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> no braço curto em um dos pares cromossômicos maiores (Figura 2c). Por outro lado, a população de Nova Friburgo apresentou cariótipo com  $2n = 58$  (Figura 2d-f), composto por 31 cromossomos metacêntricos e 27 submetacêntricos. Este citótipo diferiu do anterior por apresentar apenas três bandas terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> e um par de pequenas bandas CMA intersticiais (Figura 2f, setas amarelas e insertos), além de não terem sido visualizadas bandas terminais CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> em um par cromossômico grande.



**Figura 2** Células metafásicas de *Epidendrum secundum* com  $2n = 56$  (a-c: Atibaia, SP) e  $2n = 58$  (d-f: Nova Friburgo, RJ), coradas com CMA (a, d), DAPI (b, e) e imagens sobrepostas com os dois corantes (c, f). As setas amarelas indicam bandas terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Insertos em f destaca bandas intersticiais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Barra em d corresponde a 10µm.

Além desse citotipo, também foi observado na população de *E. secundum* de Nova Friburgo, indivíduos com cariótipo formado por  $2n = 56$ , com padrão de bandas ligeiramente distinto do citotipo com  $2n = 58$  (figura 3a-c). A análise de uma população de *E. xanthinum*, também de Nova Friburgo (RJ), revelou um cariótipo bimodal com  $2n = 28$ , com quatro cromossomos maiores (Figura 3f, setas brancas), formado por 18

cromossomos metacêntricos e 10 cromossomos submetacêntricos (Tabela 1). Foram observadas duas grandes bandas terminais  $CMA^+/DAPI^-$  (Figura 3f, setas amarelas), além de uma banda  $CMA^+/DAPI^-$  em um dos braços de um cromossomo metacêntrico e de quatro bandas terminais  $CMA^-/DAPI^+$  (Figura 3f), duas das quais localizadas nos braços curtos, adjacentes a pequenas bandas  $CMA^0/DAPI^-$  (Figura 3f, insertos menores) e uma banda intersticial  $CMA^-/DAPI^+$  (Figura 3f, inserto maior) em um cromossomo grande.



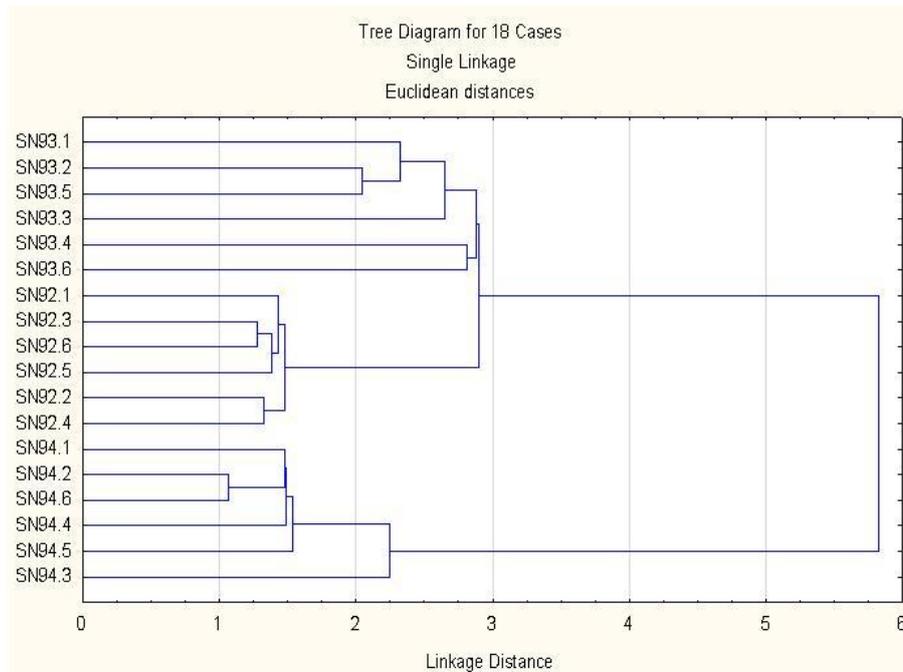
**Figura 3** Células metafásicas de espécimes coletados em Nova Friburgo, RJ: *Epidendrum secundum* com  $2n = 56$  (a-c), *E. xanthinum* com  $2n = 28$  (d-f), híbrido entre *E. secundum* x *E. xanthinum* com  $2n = 42$  (g-i). Em a, d, g células coradas com CMA, em b, e, h coradas com DAPI, e imagens sobrepostas dos dois corantes em c, f, i. Setas amarelas indicam bandas terminais  $CMA^+/DAPI^-$  e as brancas indicam os cromossomos maiores. Insertos menores em f detalha padrão de banda terminal  $CMA^-/DAPI^+$  adjacente a banda pericentromérica  $DAPI^-/CMA^+$ , o inserto maior detalha banda  $CMA^-/DAPI^+$  intersticial, em i detalha cromossomo provavelmente herdado de *E. xanthinum*. A barra em g corresponde a  $10\mu m$ .

Foram analisados indivíduos híbridos provenientes de duas zonas de contato entre populações de *E. secundum* e *E. xanthinum* de Nova Friburgo, ambos com  $2n = 42$  (Figura 3g-i), com cariótipo composto por 18 cromossomos metacêntricos (quatro dos quais maiores) (Figura 3i, setas brancas) e 24 submetacêntricos. Foram visualizadas quatro bandas  $CMA^+/DAPI^-$ , três das quais grandes e terminais, provavelmente correspondentes as RONS (Figura 3i, setas amarelas), e uma banda pericentromérica

adjacente a uma banda CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup>, (Figura 3i, inserto) provavelmente herdado de *E. xanthinum*. Outras regiões terminais CMA<sup>0</sup>/DAPI<sup>-</sup> menores e menos conspícuas também podem ser visualizadas.

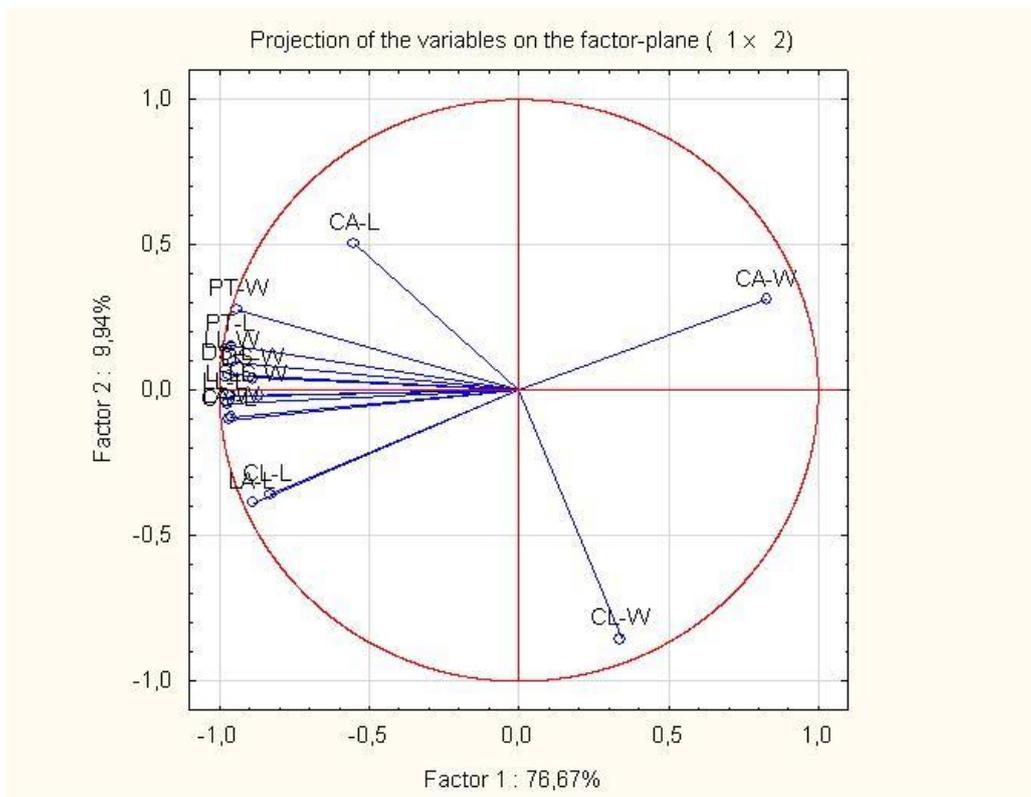
#### 4.2. Análises morfométricas

Para a população de São João do Tigre (PB), foram analisados estatisticamente 15 caracteres morfológicos florais (Tabela 3) de um total de 18 indivíduos simpátricos (seis de cada espécie) de *Epidendrum fulgens* (Figura 1d-f, identificados como SN93), *E. secundum* (Figura 1g-i, identificados como SN92) e *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* (Figura 1j-l, identificados como SN94). A análise de Agrupamento, com base na distância euclidiana, identificou a formação de três grupos morfológicamente distintos e relacionados (Figura 4). Com base na distância entre grupos, o primeiro grupo refere-se a *E. fulgens*, que embora relacionado ao segundo grupo, formado por *E. secundum*, os identifica como os grupos principais. O terceiro grupo, formado por *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* (híbrido) apresenta-se morfológicamente intermediário entre os dois primeiros grupos, mas não foi agrupado em nenhum dos grupos anteriores, apresentando-se como o terceiro grupo morfológicamente distinto. A distância euclidiana, contudo, indicou uma similaridade maior entre o híbrido e *E. secundum* (Figura 4).

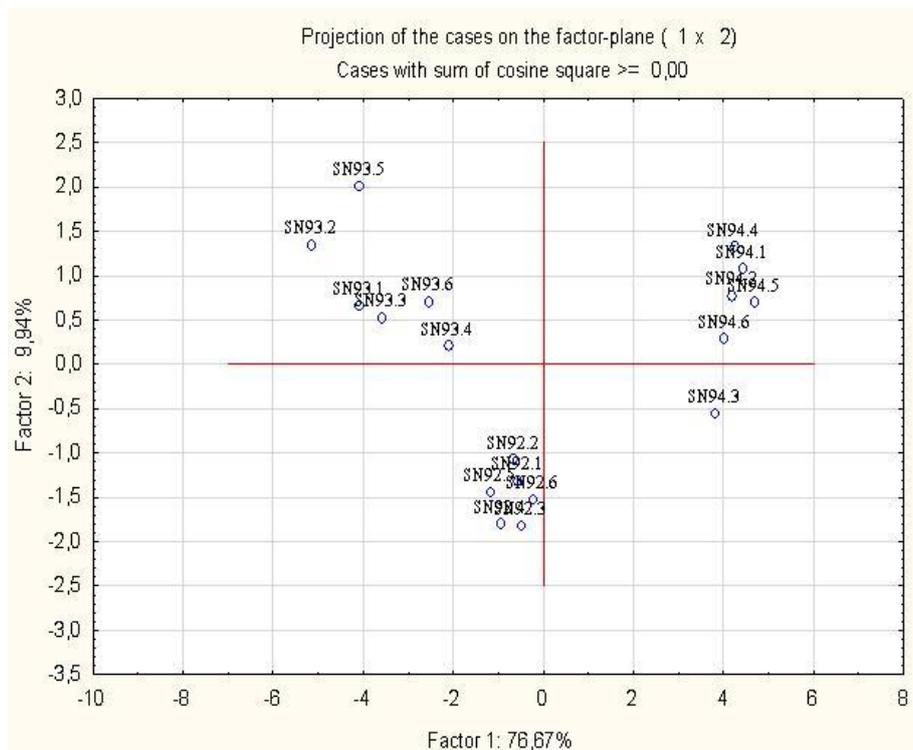


**Figura 4** Dendrograma da matriz de distâncias, pelo método de agrupamento por ligação simples.

A Análise dos Componentes Principais identificou que os caracteres morfológicos florais apresentaram-se fortemente correlacionados com o eixo 1 (Figura 5), e os principais caracteres que definiram este eixo foram PT-W, PT-L, LL-W, DS-L, DS-W, LS-L, LL-L, LA-W e CO-L, os outros caracteres apresentaram direções distintas (Tabela 3). A Análise de Componentes Principais demonstrou a formação de grupos bem separados (Figura 6), cada um correspondente às três espécies analisadas na presente amostra, embora com uma maior variação entre os indivíduos de *E. fulgens*. Os espécimes analisados do híbrido apresentaram-se bastante coesos e formaram um grupo morfológicamente homogêneo, enquanto uma variação intermediária foi observada entre os indivíduos de *E. secundum*, em relação aos demais grupos.



**Figura 5** Correlação entre os caracteres morfológicos florais ao eixo de ordenação. Os componentes principais 1 e 2 explicam 76,67% e 9,94% da variação total, respectivamente.



**Figura 6** ACP de 18 indivíduos com base em 15 caracteres morfológicos florais (Tabela 3). Os espécimes de *E. secundum* estão identificados pela sigla SN92, *Epidendrum fulgens* estão identificados como SN93, e *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* estão identificados como SN94. Os componentes principais 1 e 2 explicam 76,67% e 9,94% da variação total, respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

Dois híbridos interespecíficos tiveram seus cariótipos analisados pela primeira vez. O primeiro deles, referente a uma zona de hibridização entre *E. fulgens* e *E. secundum* do Município de São João do Tigre, estado da Paraíba, aqui designado como *Epidendrum* sp. aff. *fulgens*, enquanto o segundo refere-se a uma zona de hibridização entre *E. secundum* e *E. xanthinum* de Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Foram confirmadas as contagens prévias de  $2n = 24$  para *E. fulgens* (Tanaka & Kamemoto, 1984),  $2n = 54, 56, 58$  para *E. secundum* (Assis *et al.*, 2009 - dados não publicados) e de  $2n = 28$  para *E. xanthinum* (Blumenschein, 1960; Pinheiro *et al.*, 2009). Por outro lado, a contagem de  $2n = 50$  para *E. fulgens* é inédita para a espécie e sugere a ocorrência de poliploidia, seguida disploidia ascendente. Variação cromossômica numérica interespecífica para táxons do subgênero *Amphiglottium* tem sido previamente observada em *E. radicans*, *E. secundum* e *E. xanthinum*. Esse padrão de variação tem se mostrado especialmente elevado no complexo em *E. secundum*, com registros de  $2n =$

28, 40, 42, 48, 52, 54, 56, 58, 68, 80, 84 (Pinheiro *et al.*, 2009; Assis *et al.*, em preparação), com populações morfológicamente indistinguíveis.

De uma forma geral, todas as espécies apresentaram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e cariótipos simétricos a ligeiramente assimétricos. Este tipo de cariótipo se caracteriza por apresentar cromossomos com poucas discrepâncias de tamanho, com centrômeros localizados nas posições medianas ou submedianas (Stebbins, 1971). As medidas dos cromossomos variaram continuamente de pequenos até medianos em cada cariótipo, com exceção de *E. fulgens* com  $2n = 24$  e *E. xanthinum* com  $2n = 28$  que apresentaram pelo menos um par de cromossomos com duas ou mais vezes o tamanho dos menores cromossomos, tornando esses cariótipos ligeiramente bimodais. Bimodalidade cariotípica tem sido observada em diversos grupos de orquídeas, com diversos mecanismos envolvidos na formação desses cariótipos, caracterizando gêneros como *Phragmipedium*, *Cyclopogon* e *Sacoila*, entre outros da subfamília Spiranthoideae (Felix & Guerra, 2005), *Cephalanthera* (Moscone *et al.*, 2007) e várias espécies de *Paphiopedilum* (Lan & Albert, 2011). Espécies de *Epidendrum* com números cromossômicos maiores, como *E. fulgens* de São João do Tigre, *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* ( $2n = 64$ ) e *E. secundum* ( $2n = 54, 56$  e  $58$ ), apresentaram índices de assimetria ligeiramente maiores que as demais espécies. A medida da assimetria cariotípica é um caráter amplamente utilizado em citogenética vegetal (Stebbins, 1971) e tem sido uma ferramenta útil para avaliar a evolução cromossômica em vários gêneros da família Liliaceae (Peruzzi *et al.*, 2009) e na tribo Tigrideae de Iridaceae (Alves *et al.*, 2011), entre outras. Contudo, características cromossômicas que apresentam variação contínua, como no caso dos índices de assimetria apresentam limitações quanto ao seu emprego citotaxonômico (Guerra, 2012), especialmente em gêneros, como no presente caso de *Epidendrum*, que apresentam pequenas variações no tamanho e assimetria cariotípica.

A dupla coloração CMA/DAPI revelou a ocorrência de pelo menos três tipos principais de heterocromatina, em relação à composição base-específica: bandas  $CMA^0/DAPI^-$ ,  $CMA^+/DAPI^-$  e  $CMA^-/DAPI^+$  (Figura 4), com número, padrão e localização de bandas espécie específicas. Padrões, localização e distribuição de heterocromatina são bastante variáveis em vegetais, podendo haver para uma mesma espécie polimorfismos para número e tamanho de bandas, sendo, mais frequente a ocorrências de bandas  $CMA^+/DAPI^-$  e  $CMA^-/DAPI^+$  que coram mais fortemente regiões do genoma ricas em pares de base GC, ou AT, respectivamente (Guerra, 2000).

Como observado no presente trabalho, em outros grupos de orquídeas, também ocorrem padrões mais complexos de distribuição de heterocromatina, como no bandeamento C na tribo Neottieae (Giuseppina *et al.*, 2010), em *Maxillaria* (Cabral *et al.*, 2006) e em *Christensonella* (Koehler *et al.*, 2008), em todos os casos, provendo informações importantes para a taxonomia e padrões evolutivos.

Bandas  $CMA^0/DAPI^-$  se caracterizaram por não apresentar brilho diferenciado com o CMA, sendo visualizadas apenas após a sobreposição digital das imagens, quando é possível observar sítios cromossômicos de vários tamanhos ligeiramente mais claros em virtude de uma coloração fracamente negativa para o DAPI. Essa característica torna esse tipo de heterocromatina de difícil detecção, sendo raramente descrita para outros grupos de orquídeas, como em algumas espécies de *Maxillaria* (Cabral *et al.*, 2006) e *Habenaria* que apresentaram regiões discretamente mais brilhantes com o CMA (Felix, 2001).

O segundo tipo de heterocromatina forma blocos terminais  $CMA^-/DAPI^+$ , observados nos braços curtos ou longos de todas as espécies analisadas, com exceção de dois citotipos de *E. secundum* com  $2n = 56$  e  $58$  (populações de Nova Friburgo). O maior número de bandas  $CMA^-/DAPI^+$  foi encontrado em *E. fulgens* ( $2n = 24$ , 50 – Figuras 1c, f) e *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* ( $2n = 64$  – Figura 1j-l). *Epidendrum fulgens* é uma espécie perene que ocorre em uma ampla diversidade de habitats (Pinheiro *et al.*, 2011), possivelmente polinizada por borboletas, sendo capaz de hibridizar com outras espécies de *Epidendrum*, inclusive com diferentes níveis de ploidia (Pinheiro *et al.*, 2010). A poliploidia resulta em uma multiplicação instantânea no conteúdo de DNA, sendo, portanto diretamente responsável pela variação no conteúdo de DNA em angiospermas (Kubis *et al.*, 1998; Leitch & Leitch, 2008), embora rearranjos cromossômicos complexos em poliploides possam ocasionar reestruturações genômicas com aumento ou perda no conteúdo de DNA, especialmente em aloploides (Parisod & Holderegger, 2012). A população de *E. fulgens* de São João do Tigre com  $2n = 50$ , é aparentemente um poliploide relativo à população de Panelas com  $2n = 24$ , com um aumento no número de bandas  $CMA^-/DAPI^+$  possivelmente ocasionada por rearranjos cromossômicos envolvendo regiões ricas em AT.

O terceiro padrão de bandas heterocromáticas se caracterizou pela formação de blocos terminais  $CMA^+/DAPI^-$ , provavelmente associados às RONS heterocromáticas. Esse tipo de heterocromatina é o mais frequentemente visualizado em plantas (Guerra,

2000) e em outras orquídeas, como nos gêneros *Vanilla* (Lepers-Andrzejewski *et al.*, 2011) e *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Cabral *et al.*, 2006).

Entre os materiais analisados, duas espécies constituem prováveis híbridos interespecíficos, ambos ainda sem descrição taxonômica formal. O primeiro, proveniente de Nova Friburgo, com  $2n = 42$  apresentou número cromossômico intermediário aos dois possíveis parentais: *E. xanthinum* ( $2n = 28$ ) e *E. secundum* ( $2n = 56$ ). Esta espécie exibiu um padrão de bandas formado por 4 bandas terminais  $CMA^+/DAPI^-$ , além de duas bandas  $CMA^-/DAPI^+$  e três bandas  $CMA^0/DAPI^-$  na mesma posição, diferindo claramente do padrão observado nos supostos parentais (Tabela 2). *E. xanthinum* apresentou entre outras, pequenas bandas CMA intersticiais em três cromossomos, um dos quais (o cromossomo maior), foi aparentemente herdado pelo híbrido. Em São João do Tigre, Paraíba, foi observada uma pequena população com caracteres morfológicos aparentemente intermediários entre *E. secundum* e *E. fulgens*. A análise de números cromossômicos revelou que esta espécie, *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* ( $2n = 64$ ), apresentou número cromossômico claramente divergente de ambos os parentais, *E. fulgens* ( $2n = 50 + 1B$ ) e *E. secundum* ( $2n = 56$ ). Por outro lado, o padrão de bandas CMA/DAPI observado no suposto híbrido, com grandes blocos  $CMA^-/DAPI^+$  sugere uma clara relação com estas espécies. A análise morfométrica, claramente definiu três grupos morfológicamente distintos, mas, relacionados, sendo o terceiro grupo, formado por *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* morfológicamente intermediário entre *E. fulgens* e *E. secundum*, suportando a suposta origem híbrida sugerida inicialmente pelas observações de campo. Padrões morfológicos e cariológicos intermediários tem revelado a origem híbrida em algumas espécies de orquídeas. No gênero *Vanilla*, por exemplo, a variação no padrão de bandas CMA e na distribuição de sítios de DNAr 45S, suportou a origem híbrida de *V. planifolia* x *V. tahitensis*. Por outro lado, a ocorrência de polissomatia em vários acessos desse híbrido de *Vanilla* (Lepers-Andrzejewski *et al.*, 2011) poderá explicar a ocorrência de números cromossômicos variáveis em várias espécies do subgênero *Amphiglottium* e da discrepância do número cromossômico observado em *Epidendrum* sp. aff. *fulgens* em relação aos seus supostos parentais. A análise de uma amostra mais ampla de tecidos e de acessos poderá cofirmar esta hipótese.

Em resumo, as espécies e populações estudadas de *Epidendrum* subg. *Amphiglottium* apresentam ampla variação de números cromossômicos, dentro e entre diferentes espécies. As bandas heterocromáticas também foram bastante variáveis, com

distintas composições de base, especialmente em relação aos grandes blocos de heterocromatina rica em AT localizados nas regiões terminais ou ocupando grande parte do braço cromossômico em quase todos os acessos estudados. Esse tipo de variação ocorreu entre espécies e entre diferentes populações de uma mesma espécie, fato especialmente notável entre as populações de *E. secundum* das regiões Nordeste e Sudeste. Tanto a variação cromossômica numérica, quanto o padrão de bandas heterocromáticas foram bastante informativos na caracterização de dois híbridos interespecíficos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. Contudo, o híbrido da região Nordeste, resultante do cruzamento entre *E. secundum* e *E. fulgens* de São João do Tigre, apresentou número cromossômico divergente do esperado a partir do cruzamento dos seus supostos parentais, sugerindo a ocorrência de alterações estruturais pós-hibridização. Esta hipótese foi suportada por uma análise morfométrica de caracteres florais, com a formação de um grupo morfológico distinto, porém intermediário entre as duas espécies parentais de ocorrência simpátrica.

## 6. CONCLUSÕES

- O padrão de bandas heterocromáticas no subgênero *Amphyglotium* é bastante conservada, com variação no número e tamanho das bandas;
- A poliploidia e a disploidia apresentam um papel importante na diversificação cariológica do grupo;
- Os híbridos interespecíficos entre *E. secundum* x *E. fulgens* e *E. secundum* x *E. xanthinum* apresentaram características intermediárias entre seus parentais, tanto para dados cariológicos como para os morfométricos, confirmando sua origem híbrida.

## REFERÊNCIAS

Adams, K. L. e Wendel, J. F. (2005) **Polyploidy and genome evolution in plants**. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 135–141.

Almeida, C. C. S., Lemos Carvalho, P. C. e Guerra, M. (2007) **Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (*Anacardiaceae*)**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 541-547.

Alves L.I., Lima S.A., Felix L.P. (2011) **Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil**. Genet Mol Biol. 34: 259-67.  
APG II. (2003) **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II**. Botanical Journal of the Linnean Society 141:399-436.

Assis, F. N. M. (2009) **Variação numérica e evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, Areia.

Baguley, B.C. (1982) **Nonintercalative DNA-Binding Antitumor Compounds**, Mol. Cell. Biochem 43: 167–181.

Barros e Silva, A.E. & Guerra, M. (2009) **The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures**. Biotechnic & Histochemistry.

Bennett, M. D. e Leitch, I. J. (2005) **Plant genome size research: a field in focus**. Ann Bot 95:1–6.

Benzing, D. J. (1987) Major patterns and processes in orchid evolution: a critical synthesis. In: Arditti, J. (Ed.) **Orchid Biology: reviews and perspectives, VI**. Ithaca: Cornell. University Press: 33 – 78.

Berjano, R., Roa, F., Talavera, S. e Guerra, M. (2009) **Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites**. Plant Syst Evol. 280:219-227.

Blumenschein, A. (1960) **Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas**. Publicações Científicas da Universidade de São Paulo 1: 45–50.

Brandham, P. (1999) **Cytogenetics**. In: Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W.; Rasmussen, F. N. **Genera Orchidacearum**. Vol. 1. Oxford Univ. Press.

Brieger, F. G. (1976-1977) **Gattungsreihe Epidendra**. In: Brieger FG, Maatsch R, Senghas K (eds) Schlechter Die Orchideen, 3rd edn. Paul Parey, Berlin: 509-549.

Brown, S. W. (1966). **Heterochromatin**. *Science* 151, 417–425.

Cabral, J. S., Felix, L. P., Guerra, M. (2006) **Heterochromatin diversity and its colocalization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae)**. Genetics and Molecular Biology, 29, 4: 659-664.

Cameron, K. M. & Chase, M. W. (1999) **Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America-eastern Asia phytogeographic disjunction**. Journal of Plant Research. 112: 317-329.

Cameron, K. M., Chase, M. W., Whitten, W.M., Kores, P. J., Jarrell, D. C., Albert, V. A., Yukawa, T., Hills, H. G., and Goldman, D. H. (1999) **A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences**. American Journal of Botany 86: 208-224.

Casperson, T., Zech, L. e Johansson, C. (1970) **Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes**. Exptl. Cell Res. 60: 315-319.

Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L. & Freudenstein, J.V. (2003) **DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification**. In: K.W. Dixon, S.P.Kell, R.L.Barrett & P.J. Cribb (eds). Orchid conservation. Natural History Publications, Sabah: 69-89.

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

Cribb, P. J. e Chase M. W. (2005) *In*: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase, MW, Rasmussen FN, eds. **Genera Orchidacearum**. Oxford: Oxford University Press, 3.

Ehrendorfer, F. (1964) **Cytologie, Taxonomie und Evolution bei Samenpflanzen**. Vistas in Botany 4: 99-186.

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

Dodson, C. H. (1957) **Oncidium pusillum and its allies I**. Am. Orchid Soc. Bull., v. 26:170–172.

Dodson, C. H. (1962) **The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America**. American Orchid Society Bulletin 31: 525–534, 641–649, 731–735.

Dressler, R. L. (1967) **The genera Amblostoma, Lanium and Stenoglossum (Orchidaceae)**. Brittonia, 19: 237 – 243.

Dressler, R. L. (1981) **The orchids: natural history and classification**. Massachusetts: Harvard University Press: 333.

Dressler, R.L. (1993) **Phylogeny and Classification of the Orchid Family** Deoscorides Press: 314.

Dressler, R. L., e Dodson, C. H. (1960) **Classification and phylogeny in the Orchidaceae**. Annals of the Missouri Botanical Garden 47: 25–68.

Feitoza, L. L., Martins, M. I. G., Castro, A. A. J. F., Félix, L. P., Carvalho, R. (2010) **Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites**. Plant Syst Evol 286:199–208.

Felix, L.P. (2001) **Citogenética e citotaxonomia de orquídeas do Brasil, com ênfase no gênero Habenaria Willd**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- Felix, L. P. & Guerra, M. (2000) **Cytogenetics and Cytotaxonomy of Some Brazilian Species of Cymbidioid Orchids**. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4: 957 – 978.
- Felix, L. P. e Guerra, M. (2005) **Basic chromosome numbers of terrestrial orchids**. *Plant Syst Evol* 254: 131–148.
- Felix, L. P. e Guerra, M. (2010) **Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae)**. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163, 234–278.
- Fransz, P., Hoopen, R., Tessadori, F. (2006) **Composition and formation of heterochromatin in Arabidopsis thaliana**. *Chromosome Research* 14: 71-82.
- Freudenstein, J. V. & Rasmussen F. N. (1999) **What does morphology tell us about orchid relationships? A cladistic analysis**. *Am. J. Bot.* 86: 225- 248.
- Friebe, B., Endo, T. R. e Gill, B. S. (1996) **Chromosome-banding methods**. In: Fukui K, Nakayama S. *Plant Chromosomes – Laboratory Methods*: 123-154. CRC Press, Tokyo.
- Grant (1982) **V: Periodicities in the chromosome numbers of the angiosperm**. *Bot Gaz* 143: 379–389.
- Greilhuber, J. (1984) **Chromosomal evidence in taxonomy**. In: Heywood VH, Moore DM, eds. *Current concepts in plant taxonomy*, n<sup>o</sup> 25. London: Academic Press, 157–180.
- Greilhuber, J. (1995) **Chromosomes of the monocotyledons (general aspects)**, in Rudall, P. J., Cribb, P. J., Cutler, D. F., Humphries, C. J. (eds): *Monocotyledons: Systematics and Evolution*: 379–414 (Royal Botanic Gardens, Kew).
- Greilhuber, J. e Ehrendorfer, F. (1988) **Karyological approaches to plant taxonomy**, in Grimwade AM (ed): *Atlas of Science: Animal and Plant Science* 1: 289–297.
- Grewal, S. I. e Jia, S. (2007) **Heterochromatin revisited**. *Nat Rev Genet* 8: 35–46.
- Guerra, M. (1986) **Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.*** *Brazilian Journal of Genetics* 9: 21-40.
- Guerra, M. (1988) **Introdução a citogenética geral**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 142.
- Guerra, M. (1990) **A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil**. *Acta Bot. Bras.* 4: 75-86.
- Guerra, M. (1993) **Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in Citrus species revealed by CMA/DAPI staining**. *Heredity* 71: 234-241.
- Guerra, M. (2000) **Chromosome number variation and evolution in monocots**. In: Wilson, K. L., Morrison, D. A. (eds.). *Monocots – Systematics and Evolution: Second International Conference on the Comparative Biology of Monocots*, Sydney: 127-136.

- Guerra, M. (2000) **Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes.** *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4: 1029-1041.
- Guerra, M. (2008) **Chromosome numbers in plant cytotaxonomy - concepts and implications.** *Cytogenet Genome Res* 120:339–350.
- Guerra, M. (2012) **Cytotaxonomy: the end of childhood.** *Plant Biosystems* 146(3). (In press).
- Guerra, M., Santos, K. G. B., Barros e Silva, A. E., Ehrendorfer, F. (2000) **Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioidae - a case of parallel chromosomal evolution.** *American Journal of Botany* 87(5): 735–747.
- Hall, I. M. & Grewal, S. I. (2003) *RNAi: A Guide To Gene Silencing* (ed. Hannon, G. J.) 205–232 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor).
- Hágsater, E. (1984) **Towards an understanding of the genus *Epidendrum*.** In: Tan KW (ed) *Proceedings of the Eleventh World Orchid Conference. 11st World Orchid Conference, Miami: 195-201.*
- Hágsater E. & Arenas M. A. S. (2005) *Epidendrum L.* – In: Pridgeon, A.M. et al (Eds), *Genera Orchidacearum. Vol. 4.* Oxford Univ. Press: 236-251.
- Heitz, E. (1928) **Das heterochromatin der moose.** *I Jahrb Wiss Botanik.* 69, 762–818.
- Hizume, M., Ohgiku, A. e Tanaka, A. (1989). **Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*.** *Bot Mag Tokyo* 102: 25-36.
- John, B. (1988) **The biology of heterochromatin.** In: *Heterochromatin, Molecular and Structural Aspects* (ed. R.S. Verma): 1–147. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, K. (1998). **Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants.** *Bot Rev* 64: 273–289.
- Kao, Y. Y., Chang, S. B., Lin, T. Y., Hsieh, C. H., Chen, Y. H., Chen, W. H., Chen, C. C. (2001) **Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids.** *Ann. Bot. (Lond.)* 87:387–395.
- Koehler, S., Cabral, J. S., Whitten, W. M., Williams, N. H., Singer, R.B., Neubig, K. M., Guerra, M., Souza, A. P. e Amaral, M. C. E. (2008) **Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): Species Delimitation and Insights into Chromosome Evolution.** *Annals of Botany* 102: 491–507.
- Kovarik, A., Devejova, M., Lim, Y. K., Chase, M. W., Clarkson, J. J., Knapp, S., Leitch, A. R. (2008) **Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics.** *Ann Bot* 101: 815–823.
- Kubis S., Schmidtj T. e Heslop-Harrison J. S. (1988) **Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes.** *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 45-55.

- Lan T. e Albert V. A. (2011) **Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in Paphiopedilum, a lady's slipper orchid.** BMC Plant Biology 11: 126.
- Leitch, I. J. e Bennett, M. D. (1997) **Polyploidy in angiosperms.** Trends Plant Sci. 12: 470-476.
- Leitch, I. J., Kahandawala I., Suda, J. (2009) **Genome size diversity in orchids – consequences and evolution.** Annals of Botany 104: 469–481.
- Leitch, A. R. & Leitch I. J. (2008) **Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants.** Science 25, Vol. 320 n° 5875: 481-483.
- Lepers-Andrzejewski, S., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S. C., Wong, M., Dron, M. (2011) **Diversity and Dynamics of Plant Genome Size: An Example of Polysomaty from a Cytogenetic Study of Tahitian Vanilla (Vanilla × Tahitensis, Orchidaceae).** American Journal of Botany 98(6): 986–997.
- Levy, A. A. & Feldman, M. (2004) **Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization.** Biological Journal of the Linnean Society 82: 607–613.
- Love, A., Love, D., Pichi Sermolli, R. E. G. (1977) **Cytotaxonomical Atlas of the Pteridophyta.** Vaduz, Germany: Cramer.
- Lu, B. Y., Emtage, P. C., Duyf, B. J., Hilliker, A. J. e Eissenberg, J. C. (2000) Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* 155, 699–708.
- Manzini, G., Barselona, M. L., Avitabile, M., Quadrifoglio, F. (1983) **Interaction of Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) with Natural and Synthetic Nucleic Acids.** Nucleic Acids Research 11: 8861–8876.
- Moore, G., Devos, K. M., Wang, Z., Gale, M. D. (1995) **Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle.** *Curr. Biol.* 5:737–39.
- Moraes, A. P. e Guerra, M. (2010) **Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae).** Plant Systematics and Evolution 287: 113-118.
- Moraes, A. P., Lemos, R. R., Brasileiro-vidal, A. C., Santos Soares Filho, W. e Guerra, M. (2007a) **Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid a accessions of mandarin.** Cytogenet Genome Res. 119: 275-281.
- Moraes, A. P., Soares Filho, W. S. e Guerra, M. (2007b) **Karyotype diversity and the origin of grapefruit.** Chromosome Res. 15: 115-121.
- Moscone E.A., Samuel R., Schwarzacher T., Schweizer D. e Pedrosa-Harand A. (2007) **Complex rearrangements are involved in Cephalanthera (Orchidaceae) chromosome evolution.** Chromosome Research 15: 931-943.

- Nagl, W, e Fusenig, H. P. (1979) **Types of chromatin organization in plant cell nuclei.** *Plant Syst Evol Suppl*, 2: 221–233.
- Otto, S. P. e Whitton, J. (2000) **Polyploid incidence and evolution.** *Ann. Rev. Genet.*, 34, 401-437.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. (1975) **Orchidaceae Brasiliensis, Band 1.** Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow.
- Pabst, G. F. J., Dungs, F. (1975) **Orchidaceae Brasiliensis, Band 2.** Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmersow.
- Parisod, C. & Holderegger, R. (2012) **Adaptive landscape genetics: pitfalls and benefits.** *Molecular Ecology* 21, Issue 15: 3644–3646.
- Paula, C. C. & Silva, H. M. P. (2004) **Cultivo Prático de Orquídeas.** 3ª edição, UFV-MG.
- Peruzzi, L., Leitch, I. J., Caparelli, K. F. (2009) **Chromosome diversity and evolution in Liliaceae.** *Annals of Botany* 103: 459–475.
- Pinheiro, F. & Barros, F. (2005) **Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo *Epidendrum secundum* e espécies afins (Orchidaceae) através de AFLP.** Dissertação de Mestrado, São Paulo. Universidade de São Paulo: 182.
- Pinheiro, F. & Barros, F. (2007a) **Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* Orchidaceae) in southeastern Brazil.** *Nordic J Bot* 25: 129-136.
- Pinheiro, F. & Barros, F. (2007b) ***Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação.** *Hoehnea* 34: 563-570.
- Pinheiro, F. & Barros, F. (2009) **Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae).** *Rev. bras. Bot.* [online].32, n.1: 11-21. ISSN 0100-8404.
- Pinheiro, F., Barros, F., Palma-Silva, C., Meyer, D., Fay, M. F., Suzuki, R. M., Lexer, C., Cozzolino, S. (2010) **Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae).** *Molecular Ecology* 19, 3981–3994.
- Pinheiro, F., Barros, F., Palma-Silva, C., Fay, M. F., Lexer, C., Cozzolino, S. (2011) **Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia.** *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 38, 1923–1935.
- Pinheiro, F., Koehler, S., Corrêa, A. M., Salatino, M. L. F., Salatino, A., Barros, F. (2009) **Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae).** *Plant Syst Evol* 283: 165-177.

- Pitrez, S. R., Felix, L. P., Barreto, R. e Guerra, M. (2001) **Números cromossômicos de espécies de Commelinaceae R. BR. ocorrentes no Nordeste do Brasil**. Bol. Bot. Univ. São Paulo 19: 7-14.
- Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W.; Rasmussen, F. N. (1999) **Genera Orchidacearum**. Vol. 1. Oxford Univ. Press.
- Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. e Rasmussen, F. N. (2005) **Genera Orchidacearum**. v 4. Epidendroideae (Part one). Oxford University Press, New York: 672.
- Romero Zarco, C. (1986) **A new method for estimating karyotype asymmetry**. Taxon 35: 526-530.
- Röser, M. (1994) **Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae)**. Plant Systematics and Evolution 189: 83-122.
- Röser, M. (1995) **Trends in the karyo-evolution of palms**. In: Brandham PE, Bennett MD (eds.). Kew Chromosome Conference IV: 249-265. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Salles-de-Melo, M. R. C., Lucena, R. M., Semir, J., Carvalho, R., Pereira, R. C. A. e Benko-Iseppon, A. M. (2010) **Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae)**. Plant Syst Evol 285:189-199.
- Schubert, I. (1992) **Telomeric polymorphism in *Vicia faba***. Biologisches Zentralblatt 111: 164-168.
- Schweizer, D. (1976) **Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI**. Chromosoma 58: 307-324.
- Schweizer, D. (1981) **Counterstains-enhanced chromosome banding**. Hum. Genet. 57, 1-14.
- Schweizer, D. e Ambros, P. F. (1994) **Chromosome banding** In: Gosden, J. R. (ed) Methods in molecular biology, vol. 29, Chromosome analysis protocols, Humana Press, Totowa: 97-113.
- Schwarzacher, T., Ambros, P. F. e Schweizer, D. (1980) **Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis**. Pl. Syst. Evol. 134: 293-297.
- Souza, V. & Lorenzi, H. (2008), **Botânica Sistemática**. 2. Ed: 640.
- Souza, B. C. Q. (2011) **Citogenética da subtribo Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroideae): regiões heterocromáticas e localização do DNA ribossomal**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, Areia.
- Souza, L. G. R., Crosa, O., Guerra, M. (2010) **Karyological circumscription of *Ipheion Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae)**. Plant Systematics and Evolution 287: 119-127.

- Souza, L. G. R., Crosa, O., Speranza, P., Guerra, M. (2012) **Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae)**. *Annals of Botany* 109: 987–999.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. (2008) **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2ª Ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum: 704.
- Stebbins, G. L. (1971) **Chromosomal evolution in higher plants**. Addison-Wesley. London.
- Stuessy, T. F. (1990) **Plant taxonomy – The systematic evolution of comparative data**. Columbia University press, New York.
- Sumner, A. T. (1990) **Chromosome Banding**. Unwin Hyman, London.
- Sumner, A. T. (2003) **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing company, Berlin, 287 pp.
- Szlachetko, D. L. (1995). **Systema orchidarium**. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Supplementum* 3:1-152.
- Tanaka R. and Kamemoto, H. (1984) **Chromosomes in orchids: counting and numbers**. In: J. Arditti, (eds.). *Orchid Biology Reviews and Perspective III*. Ithaca: Coenell University Press: 324-410.
- Tuna, M., Gill, K. S. e Vogel, K. P. (2001) **Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in diploid bromegrass (*Bromus riparius* Rehm)**. *Crop Sci* 41:831-834.
- Uhl CH. (1978) **Chromosomes of Mexican *Sedum*, II Section *Pachysedum***. *Rhodora* 80:491–512.
- Van den Berg C., Higgins W. E., Dressler, R. L., Whitten, W. M., Arenas, A., Culham, A., Chase M. W. (2000) **A Phylogenetic Analysis Of Laeliinae (Orchidaceae) Based On Sequence Data From Internal Transcribed Spacers (Its) Of Nuclear Ribosomal Dna**. *Lindleyana* 15: 96 – 114.
- Vanzela, A. L. L., Guerra, M. e Luceño, M. (1996) ***Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes**. *Cytobios* 88: 219-228.
- Vosa, C. G. (1973) **Heterochromatin recognition and analysis of chromosome variation in *Scilla sibirica***. *Chromosoma* 43: 269–278.
- Weiler, K. S. e Wakimoto, B. T. (1995) **Heterochromatin and gene expression in *Drosophila***. *Annu. Rev. Genet.* 29, 577–605.
- Yasuhara, J. C. e Wakimoto, B. T. (2006) **Oxymoron no more: the expanding world of heterochromatic genes**. *Trends Genet.* 22, 330–338.

Xiong, Z. Y., Pires, J. C. (2011) **Karyotype and identification of all homoeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors.** *Genetics* 187: 37–49.

Weiss, H. e Maluszynska, J. (2000) **Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*.** *Hereditas* 133: 255–261.