

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Shaiany Sabrina Lopes Gomes

**VARIAÇÃO GENÉTICA NO COMPLEXO POLIPLOIDE *Zygopetalum
maculatum* (ORCHIDACEAE)**

Tese
Juiz de Fora,
2017

SHAIANY SABRINA LOPES GOMES

VARIAÇÃO GENÉTICA NO COMPLEXO POLIPLOIDE *Zygopetalum maculatum* (ORCHIDACEAE)

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientadora: Samantha Koehler

Juiz de Fora,

2017

Dedicatória

Aos meus pais José Pinto Gomes (*in memoriam*) e Engracia Maria Lopes, exemplos de perseverança, amor infinito, incentivo e dedicação integral.

Agradecimentos

Minha sincera gratidão,

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro no projeto e eventos científicos.

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida, guiando minhas escolhas para o melhor desfecho possível.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o curso para obtenção do Título de doutora em Ciências Biológicas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos.

Ao professor doutor Lyderson Facio Viccini, pela orientação neste projeto. Por sua inteira disponibilidade traduzida em ajuda, paciência e grandes ensinamentos. Pela confiança em mim depositada e por ser um exemplo de profissional.

À professora doutora Samantha Koehler pela coorientação, além de ceder o material vegetal para o estudo e mostrar-se sempre disposta a colaborações.

Ao professor doutor Luiz Menini pela presença na banca avaliadora, além da colaboração na coleta de campo e prontidão em esclarecer dúvidas taxonômicas.

Aos professores doutores Ana Paula Moraes, Ana Luisa Azevedo e Saulo Marçal por aceitarem compor minha banca avaliadora e dessa forma, colaborarem para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos doutores Elyabe Matos e Cristiane Zorzatto pela colaboração nas análises de citometria de fluxo.

Ao mestre Thiago Campacci pela ajuda indispensável na coleta de campo das orquídeas.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação pelos momentos compartilhados em sala de aula, laboratórios ou fora deles.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF, pelo convívio e troca de saberes. Em especial agradeço às colegas de pós graduação Aryane Reis, Ana Luíza Franco, Juliana Mainenti e Camila Neves pela parceria nos experimentos e discussões teóricas.

Aos alunos de Iniciação Científica pela colaboração na execução dos experimentos e pelas boas risadas compartilhadas.

Às amigas Camila Siqueira Neves e Amanda Lima, presentes em todos os momentos, sejam eles de estudo, trabalho, angústias, ansiedade, vitórias, festejos e conquistas... Momentos únicos vividos durante esses quatro anos que ficarão guardados comigo como prova de amizade.

Ao meu marido Marcus Oliveira, por seu carinho e companheirismo durante esta caminhada!

Aos meus pais, José Pinto Gomes (*in memoriam*) e Engracia Maria Lopes, pela benção da vida e pelo amor incondicional a mim dedicado. Em especial, agradeço à minha MÃE por estar sempre comigo me apoiando a cada passo. Por ser a minha motivação, a minha força e o meu porto seguro!

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o êxito desta pesquisa.

"A história da terra é registrada nas camadas
de sua crosta; A história de todos os
organismos está inscrita nos cromossomos"

Hitoshi Kihara

"O sucesso é a soma de pequenos esforços –
repetidos dia sim, e no outro dia também."

Robert Collier

RESUMO

As orquídeas do complexo "*Zygopetalum maculatum*" (Kunth) Garay são típicas dos campos rupestres e de altitude do leste do Brasil. Atualmente são reconhecidas seis espécies para este grupo que, por compartilharem características morfológicas diagnósticas, são reconhecidas aqui como um complexo de espécies. De forma a contribuir para entender o padrão de variação fenotípica observado entre as populações e com isso tentar esclarecer a formação deste complexo, este trabalho caracterizou do ponto de vista genético ar 22 populações de "*Z. maculatum*", sendo 21 provenientes do Brasil e uma da Bolívia. As análises compreenderam estimativa da quantidade de DNA nuclear, determinação do número cromossômico, comportamento meiótico e diversidade genética identificada por marcadores do tipo ISSR. O conteúdo médio de DNA revelou três níveis de ploidia no complexo, 7,36 pg, 10,52 pg e 14,09 pg de DNA, sendo estes relacionados a números cromossômicos de $2n=48$; $2n=72$; $2n=96$, respectivamente. Tal variação ocorreu entre e dentro das populações. Dados cariotípicos (morfometria, DNAr 5S e 45S) evidenciaram similaridade entre os três níveis de ploidia. A meiose mostrou-se irregular, com ocorrência de atraso e perda cromossômica, pontes, "cromossomos aderentes", micronúcleos e assincronia em todos os níveis de ploidia. O dendrograma baseado em marcadores ISSR revelou tendência de agrupamento de indivíduos com o mesmo nível de ploidia e originados das mesmas regiões geográficas. Os resultados sugerem que as populações possuem baixos índices de diversidade genética entre indivíduos e que a maior diversidade encontra-se entre as populações. De forma geral, os resultados indicam que eventos de poliploidização estejam relacionados à diversificação e especiação de "*Z. maculatum*", sendo um processo importante para explicar as variações morfológicas observadas dentro do complexo.

Palavras-chave: citogenética vegetal; citometria de fluxo; comportamento meiótico; FISH; ISSR; orquídea tropical; poliploidia.

ABSTRACT

The orchids of the "*Zygopetalum maculatum*" (Kunth) Garay complex are typical of the "campos rupestres" of the east side of Brazil. Currently, six species are recognized for this group which, due to their morphological similarity, is recognized here as a species complex. In order to understand the phenotypic pattern observed among the populations and contribute to clarify the formation of this complex, this study characterized 22 populations of "*Z. maculatum*", being 21 populations from Brazil and one population from Bolivia. The study included DNA amount estimation, determination of the chromosome number, meiotic behavior and genetic diversity estimation. The average of DNA content revealed three 2C values, 7.36 pg, 10.52 pg and 14.09 pg of DNA, which were associated to $2n = 48$; $2n = 72$ and $2n = 96$ chromosomes, respectively. The variation was observed within and among populations. Karyotypic data (morphometry, 5S and 45S rDNA) showed similarity among all ploidy levels. Meiosis behavior was not regular being observed chromosome delay and loss, bridges, micronuclei, chromosomal stickiness and asynchrony. The dendrogram based on ISSR revealed similarity regarding the ploidy level and the geographical distribution of the individuals. The data also suggested low genetic diversity within populations being most of the diversity observed among populations. In general, the results indicate that polyploidization events are probably related to the *Zygopetalum* diversification and speciation, being an important process to explain the morphological variations observed within the complex.

Keywords: cytogenetics; flow cytometry; meiotic behavior; FISH; ISSR; tropical orchid; polyploidy.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** “*Zygopetalum maculatum*” em campo. A e B: representantes da variação fenotípica em flores simpátricas (Parque Estadual do Ibitipoca - MG) de “*Zygopetalum maculatum*”; C: população em campo na serra do Piquete, SP. Fotos: A e B: Luiz Menini Neto; C: Thiago Campacci..... 36
- Figura 2.** Histogramas representativos da quantidade de DNA de “*Zygopetalum maculatum*” (Orchidaceae) obtidos a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo (IP). O padrão interno de referência utilizado foi *Vicia faba* - $2C=26,90\text{pg}$ – (DOLEŽEL et al., 1992). A: Histograma de indivíduo de “*Zygopetalum maculatum*” com $2C=7,36\text{pg}$. B: Histograma de indivíduo de “*Zygopetalum maculatum*” com $2C=10,52\text{pg}$. C: Histograma de indivíduo de “*Zygopetalum maculatum*” com $2C=14,09\text{pg}$ de DNA. G1=núcleos com genoma não duplicado; G2=núcleos com genoma duplicado..... 42
- Figura 3.** Distribuição percentual das diferentes quantidades de DNA observadas em 22 populações (580 indivíduos) em “*Zygopetalum maculatum*”. Três grupos de indivíduos foram formados conforme o valor $2C$. Grupo I com $2C=7,36\text{ pg}$; Grupo II com $10,52\text{ pg}$; Grupo III com $14,09\text{pg}$ 44
- Figura 4.** Percentagem de ocorrência de cada uma das três quantidades de DNA observadas no complexo “*Zygopetalum maculatum*” em 22 populações. Há populações em que ocorre apenas um dos três grupos relacionados ao conteúdo $2C$ de DNA e populações que abrigam indivíduos de dois e até dos três grupos..... 45
- Figura 5.** Distribuição geográfica das populações do complexo “*Zygopetalum maculatum*” coletadas no Brasil com os respectivos tamanhos de genoma. As populações com maior quantidade de DNA ocorrem mais ao sul do país. A cor azul identifica $2C=7,36$; vermelho $2C=7,52$; amarelo $2C=14,09\text{ pg}$ de DNA..... 47
- Figura 6.** Metáfases mitóticas representando populações do complexo “*Zygopetalum maculatum*” onde foi identificado apenas um número cromossômico (A) indivíduo Bol 2 da população Coroico, com $2n=48$ cromossomos; (B) indivíduo ZM250 da população Andorinhas, com $2n=96$; (C) indivíduo ZM016 da

| | | |
|-------------------|---|----|
| | população Finas, com $2n=96$; (D) indivíduo ZM215 da população São Thomé das Letras, com $2n=96$; (E) indivíduo S20 da população P. E. do Ibitipoca, com $2n=96$; (F) indivíduo ZM059 da população Bocaina, com $2n=96$; (G) indivíduo ZM085 da população Pico dos Marins, com $2n=96$; (H) indivíduo ZM128 da população Pico do Paraná, com $2n=96$. Barra= $10\mu\text{m}$ | 49 |
| Figura 7. | Metáfases mitóticas representando populações do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> " onde foram identificados dois ou três números cromossômico. (A, B e C) indivíduos da população Pico do Itambé; (A) ZM172 com $2n=48$ cromossomos; (B) ZM201 com $2n=72$; (C) ZM186 com $2n=96$. (D e E) indivíduos da população Serra do Cipó; (D) ZM115 com $2n=72$; (E) ZM086 com $2n=96$. (F e G) indivíduos da população Pico do Garrafão; (F) ZM025 com $2n=48$; (G) ZM130 com $2n=96$. (H e I) indivíduos da população Cotia; (H) ZM008 com $2n=48$; (I) ZM002 com $2n=72$ cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$ | 50 |
| Figura 8. | Metáfase mitótica e cariograma representativos do citótipo com $2n=48$ cromossomos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> ". Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$, sendo $2n=2x=48$ cromossomos. Barra= $5\mu\text{m}$ | 51 |
| Figura 9. | Metáfase mitótica e cariograma representativos do citótipo com $2n=72$ cromossomos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> ". Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$, sendo $2n=3x=72$ cromossomos. Barra= $5\mu\text{m}$ | 53 |
| Figura 10. | Metáfase mitótica e cariograma representativos do citótipo com $2n=96$ cromossomos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> ". Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$, sendo $2n=4x=96$ cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$ | 54 |
| Figura 11. | Hibridização <i>in situ</i> fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A, C, E, G) e 45S (B, D, F, H) em cariótipo com $2n=48$ de ' <i>Zygopetalum maculatum</i> '. (A e B) Indivíduo Bol 3 da população Corico; (C e D) Indivíduo ZM172 da população Pico do Itambé; (E e F) Indivíduo ZM025 da população Pico do Garrafão; (G e H) Indivíduo ZM018 da população Cotia. Um par de genes ribossomais 5S ocorre em posição subterminal (setas) e outro par em posição terminal nos cromossomos. Os sítios de DNAr 45S são terminais. Barra= $10\mu\text{m}$ | 56 |

- Figura 12.** Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A e C) e 45S (B e D) em cariótipo com $2n=72$ de '*Zygopetalum maculatum*'. (A e B) Indivíduo ZM198 da população Pico do Itambé; (C e D) Indivíduo ZM113 da população Serra do Cipó. Três das seis marcas de genes ribossomais 5s ocorrem em posição subterminal (setas) e as outras três marcas em posição terminal nos cromossomos. Os seis sítios de DNAr 45s são terminais. Barra=10 μ m..... 57
- Figura 13.** Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A, C e E) e 45S (B, D e F) em cariótipo com $2n=96$ de '*Zygopetalum maculatum*'. (A e B) Indivíduo ZM012 da população Finas; (C e D) Indivíduo S27 da população Parque Estadual do Ibitipoca; (E e F) Indivíduo ZM040 da população Bocaina. Quatro das oito marcas de genes ribossomais 5S ocorrem em posição subterminal (setas) e as outras quatro marcas em posição terminal nos cromossomos. Os oito sítios de DNAr 45S são terminais. Barra = 10 μ m..... 58
- Figura 14.** Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A, C e E) e 45S (B, D e F) em cariótipo com $2n=96$ de '*Zygopetalum maculatum*'. (A e B) Indivíduo ZM186 da população Pico do Itambé; (C e D) Indivíduo ZM078 da população Serra do Cipó; (E e F) Indivíduo ZM144 da população Pico do Garrafão. Quatro das oito marcas de genes ribossomais 5S ocorrem em posição subterminal (setas) e as outras quatro marcas em posição terminal nos cromossomos. Os oito sítios de DNAr 45S são terminais. Barra = 10 μ m..... 59
- Figura 15.** Idiogramas representativos do cariótipo de três citótipos de "*Zygopetalum maculatum*". (A) $2n=48$ cromossomos, onde cada cromossomo representa um par de cromossomos. (B) $2n=72$ cromossomos, onde cada cromossomo representa um trio de cromossomos. (C) $2n=96$ cromossomos, onde cada cromossomo representa um quarteto de cromossomos. Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$ 60
- Figura 16.** Síntese das estimativas de quantidade de DNA (2C) e dados cromossômicos para três citótipos de "*Zygopetalum maculatum*". (A) quantidade 2C de DNA nuclear (B) Número de sítios positivos para DNAr 5S. (C) Número de sítios positivos para DNAr 45S. Círculo preto = dados esperados, quadrado branco = dados observados..... 61

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Variação observada nas porcentagens de anormalidades detectadas em meiócitos dos citótipos $2n=48$, $2n=72$ e $2n=96$ do complexo "*Zygopetalum maculatum*"..... 82
- Figura 2.** Anormalidades na primeira divisão meiótica de "*Zygopetalum maculatum*". As imagens foram obtidas por suspensão celular. (A) Diacinese com cromossomos "aderentes", as pontas de setas branca e vermelha indicam univalentes e multivalentes respectivamente ($2n=96$); (B) Metáfase I com cromossomo atrasado ($2n=48$); (C) Metáfase I com cromossomo "aderentes" ($2n=96$); (D) Anáfase I com cromossomos atrasados ($2n=48$); (E) Anáfase I com cromossomos atrasados e ponte cromossômica ($2n=96$); (F) Anáfase I com cromossomos "aderentes" ($2n=96$); (G) Telófase I com cromossomos atrasados ($2n=72$); (H e I) Telófase I com ponte cromossômica. Setas pretas indicam cromossomos atrasados e setas vermelhas indicam ponte cromossômica, H ($2n=72$) e I ($2n=96$). Barra= $10\mu\text{m}$ 83
- Figura 3.** Anormalidades na segunda divisão meiótica de "*Zygopetalum maculatum*". As imagens foram obtidas por suspensão celular. (A) Metáfase II em T ($2n=96$); (B, C e D); Anáfase II com cromossomos atrasados, B ($2n=96$), C ($2n=48$) e D ($2n=96$); (E) Telófase II com cromossomos atrasados ($2n=48$); (F) Tétrade com micronúcleo ($2n=72$). Setas pretas indicam cromossomos atrasados, seta amarela indica micronúcleo. Barra= $10\mu\text{m}$ 84
- Figura 4.** Anormalidades em células meióticas de "*Zygopetalum maculatum*". As lâminas foram obtidas pela técnica de esmagamento celular. (A e B) Metáfase I com cromossomo atrasado, A ($2n=72$) e B ($2n=96$); (C e D) Anáfase I com cromossomo atrasado, C ($2n=48$) e D ($2n=96$); (E) Assincronia celular com um grupo de cromossomos ainda em prófase II e outro grupo já em metáfase II, ($2n=96$); (F) Metáfase II em T ($2n=48$); (G) Anáfase II com cromossomo atrasado ($2n=72$); (H) Assincronia celular com parte dos cromossomos em prófase II e outra parte em Anáfase II ($2n=96$) e (I) Tríade com 2 núcleos de tamanho similar e um terceiro maior ($2n=48$). As setas indicam cromossomos atrasados. Barra= $10\mu\text{m}$ 85

CAPÍTULO IV

Figura 1.

Perfil representativo de amplificação de marcadores ISSR (*primer* UBC-835) de um conjunto de indivíduos pertencentes a 22 populações de *Zygopetalum*, uma de *Neogardneria murrayana*, uma de *Pabstia sp.* E um indivíduo de *Zygopetalum maxillare* do Orquidário Colibri. M = marcador de 1Kb *plus*; B = branco; S. Bocaina=Serra da Bocaina; P. Garrafão=Pico do garrafão; P. Itambé=Pico do Itambé; P. Marins=Pico dos Marins; S. Cipó=Serra do Cipó; S. Pitengo=Serra do Pitengo; P. Andorinhas=Parque das Andorinhas; S. Thomé=São Thomé das Letras; Desbaranc=Serra do Desbarancado; Alferes=Paty de Alferes; Db=Pedra Dubois; P. Gado=Pedra do Gado; P. D'Água=Pedra D'Água; P. Ângelo; P. Pinhão; MC = Monte Crista; OQ=Orquidário Colibri; Curvas=Serra das Sete Curvas; SL = Serra das Lontras; Coroico=Coroico Bolívia; Garrafão=Pico do Garrafão; Neo= *Neogardneria murrayana*; P. Ibitipoca=Parque Estadual do Ibitipoca..... 103

Figura 2.

Dendrograma de similaridade genética entre 91 indivíduos (89 do gênero *Zygopetalum*, 1 de *Pabstia* e 1 da espécie *Neogardneria murrayana*), obtido a partir de dez marcadores ISSR, pelo método de agrupamento UPGMA e coeficiente de Jaccard. As cores indicam os níveis de ploidia: azul = 7,36 pg; vermelho = 10,52pg e amarelo = 14,09pg cromossomos. Nomes destacados pela cor laranja representam grupos externos ao complexo "*Zygopetalum maculatum*" e em roxo indicam a população da Bolívia, possível centro de origem de *Zygopetalum*. As ploidias dos grupos externos foram obtidas por citometria de fluxo. *representa valores de *bootstrap* acima de 50 e **valores de *bootstrap* acima de 90..... 105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1. | Origem das 22 populações estudadas do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> ", com respectivas amostragens e coordenadas geográficas..... | 37 |
| Tabela 2. | Tamanho médio do genoma (2C) observado em 22 populações de indivíduos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> "..... | 43 |
| Tabela 3. | Conteúdo médio 2C de DNA (pg) e tamanho médio do genoma (Mpb) de representantes de " <i>Zygopetalum maculatum</i> " oriundos de 22 populações (580 indivíduos)... | 44 |
| Tabela 4. | Números cromossômicos representativos de 12 populações do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> " avaliadas por análise mitótica..... | 48 |
| Tabela 5. | Dados morfométricos médios representativos do citótipo com 2n=48 cromossomos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> "..... | 51 |
| Tabela 6. | Dados morfométricos médios representativos do citótipo com 2n=72 cromossomos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> "..... | 52 |
| Tabela 7. | Dados morfométricos médios representativos do citótipo com 2n=96 cromossomos do complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> "..... | 54 |

CAPÍTULO III

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1. | Origem das populações envolvidas no estudo de comportamento meiótico em " <i>Zygopetalum maculatum</i> ".... | 77 |
| Tabela 2. | Percentual de anormalidades (AN) em diferentes fases da meiose em três citótipos de " <i>Zygopetalum maculatum</i> "..... | 81 |

CAPÍTULO IV

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabela 1. | Localidades de coleta e identificação do material de <i>Zygopetalum</i> em estudo..... | 98 |
| Tabela 2. | <i>Primers</i> de ISSR avaliados para o estudo de diversidade genética no gênero <i>Zygopetalum</i> | 101 |
| Tabela 3. | Sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento e número de bandas polimórficas para um conjunto de dez | |

| | |
|--|-----|
| iniciadores utilizados no estudo da diversidade genética no complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> " | 103 |
|--|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|---|
| A | Grau de assimetria do cariótipo |
| Ai | Assimetria de cada cromossomo |
| AFLP | " <i>Amplified Fragment Length Polymorfism</i> " - polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado |
| ANOVA | Análise de Variância |
| AT | Adenina e Timina |
| BA | Bahia |
| bc | Braço curto |
| bl | Braço longo |
| CG | Citosina e Guanina |
| CMA ₃ | Cromomicina A ₃ |
| CV | Coeficiente de Variação |
| ddH ₂ O | Água Destilada e Deionizada |
| DA | Distamicina |
| DAPI | 4`6-diamino-2-phenylindole |
| DNA | "Deoxyribonucleic Acid" - Ácido Desoxirribonucléico |
| DNAr | DNA Ribossomal |
| Dr. ^a | Doutora |
| Dr. | Doutor |
| FC | Fórmula cariotípica |
| FISH | " <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> " - Hibridização fluorescente <i>in situ</i> |
| G | Gramma |
| G ₀ /G ₁ | Valor 2C de DNA |
| G ₂ | Valor 4C de DNA |
| H | Hora |
| ic | Índice centromérico |
| ISSR | " <i>Inter Simple Sequence Repeteas</i> " - Repetição entre sequências simples |
| ITS | " <i>Internal transcribed spacer</i> " - Espaçador transcrito interno |
| IP | Iodeto de Propídeo |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| H ₂ O | Água |
| ddH ₂ O | Água deionizada |
| M | Molar |
| M | Metro |
| m | Metacêntrico |
| MG | Miligrama |
| MG | Minas Gerais |
| MN | Micronúcleo |
| Mpb | Mega Pares de Bases de Nucleotídeos |
| mL | Mililitros |
| N | Número Haploide de Cromossomas |
| L | Litro |
| OFCH | Instituto de Botânica de São Paulo |
| PA | Paraná |
| PCR | " <i>Polimerase Chain Reaction</i> " - Reação em cadeia da polimerase |
| pg | Picogramas |
| Prof ^a | Professora |
| r | Razão entre braços |

| | |
|----------------|---|
| R | Razão de intensidade de fluorescência |
| p/v | Partes por volume |
| RAPD | " <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> " |
| RFLP | " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> " - Polimorfismo de comprimento de fragmentos |
| RNA | "Ribonucleic acid" - Ácido Ribonucléico |
| RJ | Rio de Janeiro |
| RNAse | Ribonuclease |
| RON | Região organizadora de nucléolo |
| RS | Rio Grande do Sul |
| sm | Submetacêntrico |
| SSC | NaCl 3M/Citrato Trissódico.2H ₂ O 0,3M |
| SSR | " <i>Simple Sequence Repeats</i> " - Repetições simples de sequências |
| st | Subtelocêntrico |
| SP | São Paulo |
| TRITC | "Rhodamine isothiocyanate Tetramil" - Tetramil rodamina isotiocianato |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |
| UEC | Herbário da Universidade Estadual de Campinas |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas |
| USA | Estados Unidos da América |
| Z. | <i>Zygopetalum</i> |
| ZM | Complexo " <i>Zygopetalum maculatum</i> " |
| x | Número cromossômico básico |
| X ₂ | Número cromossômico básico secundário |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |
| 2C | Quantidade de DNA no núcleo somático |
| 8-HQ | 8-Hidroxiquinoleína |
| °C | Graus Celsius |
| % | Pocentagem |
| Σ | Somatório |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL..... | 20 |
| CAP. I | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 22 |
| 1 | POLIPLOIDIA: UMA FONTE DE DIVERSIDADE VEGETAL..... | 22 |
| 2 | ORCHIDACEAE A. JUSS.: BOTÂNICA, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA..... | 23 |
| 3 | O COMPLEXO DE ORQUÍDEAS TROPICAIS “ <i>Zygopetalum maculatum</i> ” | 26 |
| CAP. II | ESTUDO CITOGEOGRÁFICO NO COMPLEXO DE ORQUÍDEAS TROPICAIS “ <i>Zygopetalum maculatum</i> ” (ORCHIDACEAE)..... | 28 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 28 |
| | 1.1 Orchidaceae como modelo biológico em estudos de diversidade e evolução: uma abordagem citotaxonômica..... | 28 |
| | 1.2 Estimativa da quantidade de DNA como ferramenta auxiliar à taxonomia..... | 30 |
| | 1.3 Estudos cromossômicos na família Orchidaceae..... | 31 |
| | 1.4 Citogenética do complexo de orquídeas “ <i>Zygopetalum maculatum</i> ” | 33 |
| 2 | OBJETIVOS | 34 |
| | 2.1 Objetivos específicos | 34 |
| 3 | MATERIAL e MÉTODOS | 35 |
| | 3.1 Material biológico..... | 35 |
| | 3.2 Análise da quantidade de DNA por citometria de fluxo | 37 |
| | 3.3 Análise citogenética..... | 38 |
| | 3.3.1 Determinação do número cromossômico..... | 38 |
| | 3.3.2 Morfometria cromossômica..... | 38 |
| | 3.3.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)..... | 39 |
| 4 | RESULTADOS..... | 40 |

| | | |
|-----------------|--|-----------|
| | 4.1 Tamanho do genoma e nível de ploidia em " <i>Zygopetalum maculatum</i> "..... | 40 |
| | 4.2 Número cromossômico e morfometria cromossômica..... | 47 |
| | 4.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)..... | 55 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 62 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 71 |
| CAP. III | COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE TRÊS CITÓTIPOS DE "<i>Zygopetalum maculatum</i>" (ORCHIDACEAE)..... | 72 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 72 |
| | 1.1 Origem natural de poliploides..... | 72 |
| | 1.2 Comportamento meiótico em poliploides..... | 74 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 76 |
| | 2.1 Objetivos específicos..... | 76 |
| 3 | MATERIAL e MÉTODOS..... | 77 |
| | 3.1 Material biológico..... | 77 |
| | 3.2 Análise meiótica..... | 78 |
| 4 | RESULTADOS..... | 79 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 85 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 90 |
| CAP. IV | VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DO COMPLEXO "<i>Zygopetalum maculatum</i>" (ORCHIDACEAE) ESTIMADA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR..... | 91 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 91 |
| | 1.1 Marcadores moleculares..... | 91 |
| | 1.2 Marcadores ISSR..... | 93 |
| | 1.3 Orquídeas como modelo de estudo..... | 94 |
| 2 | OBJETIVO..... | 96 |
| | 2.1 Objetivos específicos..... | 96 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| 3 | MATERIAL e MÉTODOS..... | 97 |
| | 3.1 Material Biológico..... | 97 |
| | 3.2 Extração de DNA..... | 100 |
| | 3.3 PCR e seleção dos iniciadores ISSR..... | 101 |
| | 3.4 Análise de dados..... | 102 |
| 4 | RESULTADOS..... | 102 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 107 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 111 |
| CAP. V | CONCLUSÃO GERAL..... | 113 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 114 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região tropical do globo terrestre é bastante citada como sendo biologicamente mais diversa que as outras zonas climáticas. Tal hipótese ganha suporte quando estudos indicam que aproximadamente 37% da diversidade do planeta encontra-se na região neotropical (GOVAERTS, 2001; ANTONELLI e SANMARTÍN, 2011).

Muitos mecanismos têm sido sugeridos como envolvidos na história e evolução da biodiversidade dos trópicos, incluindo aspectos bióticos e abióticos. Provavelmente, a mais antiga explicação evolutiva para a considerável diversidade neotropical seja a "hipótese do tempo", a qual sugere que a riqueza de espécies está relacionada com a quantidade de tempo disponível para especiação dentro de uma determinada região (MITTELBACH et al., 2007). Dessa forma, o isolamento geológico e a estabilidade climática, em longo prazo, teriam favorecido o acúmulo gradual e/ou preservação de linhagens nos trópicos no decorrer do tempo (ANTONELLI e SANMARTÍN, 2011). Outro fator que poderia justificar a riqueza de espécies em baixas latitudes é a ocorrência de temperaturas mais altas, que pode representar menores tempos de geração, acelerando assim, a especiação (ROHDE, 1992).

Embora seja praticamente um consenso que a riqueza de espécies tropicais deriva da interação de numerosos processos e eventos evolutivos (HOORN et al., 2010), sob o ponto de vista biótico, parece claro que a poliploidia, associada ou não a eventos de hibridação, figura como fator importante neste processo (STEBBINS, 1971; MASTERSON, 1994; SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003; SOLTIS e SOLTIS, 2009; JIAO et al., 2011). No entanto, estudos que abordem o tema evolução vegetal e poliploidia nos trópicos são, ainda, bastante escassos, contribuindo para que a relação entre a ampla diversidade nesta região e a ocorrência de poliploides seja, até o momento, muito mais especulativa do que propriamente estabelecida.

Entre as famílias mais diversas do planeta está Orchidaceae A. Juss., considerada cosmopolita, pois só não ocorre em regiões polares ou desertos extremos (DRESSLER, 1981; JUDD et al., 2009). Entretanto, ainda que sua distribuição global seja ampla, as orquídeas são mais abundantes e apresentam maior variabilidade justamente nos trópicos (DRESSLER, 1981, 1993; PRIDGEON, 2003). Dentro da região neotropical, a Floresta Atlântica brasileira é ranqueada como a segunda área da América do Sul mais rica em espécies de orquídeas e com elevada taxa de endemidade (BARROS, 1999).

Os primeiros conhecimentos taxonômicos para o grupo são fruto da análise de estruturas florais. No entanto, a família apresenta muitas formas intermediárias, além da presença de caracteres basais e derivados em uma mesma espécie. Tudo isso, faz com que dados apenas fenotípicos sejam pouco informativos e geralmente inconclusivos. Nesse panorama, técnicas citogenéticas e moleculares surgem como aliadas em estudos taxonômicos e filogenéticos da família, uma vez que estes são traços pouco vulneráveis à influência ambiental (DRESSLER, 1993; GUERRA, 2008). Portanto, a caracterização genética de espécies é de suma relevância para estudos de cunho evolutivo (GUERRA, 1988).

Orchidaceae apresenta o gênero *Zygopetalum* Hook cuja taxonomia é considerada complicada e compreende 14 espécies aceitas atualmente para o Brasil (FLORA DO BRASIL, 2017). Dessas, seis compõe o complexo "*Zygopetalum maculatum*" (*Z. brachypetalum* Lindl., *Z. ghillanyi* Pabst., *Z. intermedium* Lood., *Z. maculatum* (Kunth), *Z. reginae* Pabst, Garay, *Z. sincoranum* V. P. Castro & Campacci, *Z. triste* Barb. Rodr.), um complexo de espécies com delimitação taxonômica comprometida devido a caracteres ecológicos e morfológicos sobrepostos (HOEHNE, 1953). Com o presente trabalho, buscou-se caracterizar, por meio de ferramentas citogenéticas e moleculares, espécies de orquídeas tropicais de "*Z. maculatum*", a fim de contribuir para o conhecimento da variabilidade e da evolução dessas plantas, além de gerar resultados que possam colaborar para a delimitação de táxons dentro do gênero.

CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

1 POLIPLÓIDIA: UMA FONTE DE DIVERSIDADE VEGETAL

A evolução dos seres vivos baseia-se na associação de variabilidade genética, seleção natural (FREITAS e BERED, 2003) e deriva (COYNE e ORR, 2004). Dessa forma, por representar um tipo de alteração do conteúdo genético, a poliploidia é inevitavelmente atrelada a processos evolutivos em plantas (SOLTIS et al., 2009; PARISOD, HOLDEREGGER e BROCHMANN, 2010; FAWCETT e VAN DE PEER, 2010; WENDEL et al., 2016) atuando com destaque em gimnospermas e angiospermas (SOLTIS et al., 2009; WOOD et al., 2009; JIAO et al., 2011). Estima-se que a maior parcela das plantas atuais tenha passado por algum evento de poliploidização em sua história evolutiva (JIAO et al., 2011), com estimativas da frequência de ancestrais poliploides variando de 35% a 70% (WENDEL et al., 2016). Dentre os casos de especiação nas angiospermas pelo menos 15% teriam sido desencadeados por eventos de duplicação do genoma (WOOD et al., 2009).

A poliploidia segmenta-se em duas vias principais: alopoliploidização e autopoliploidização. Ambos os tipos de incremento do genoma já foram relatados para Orchidaceae, embora a maior parcela das espécies analisadas até o momento tenha sido documentada como alopoliploide (HEDRÉN, NORDSTRO e STÅHLBERG, 2008; STÅHLBERG, 2009). Provavelmente, isso deve-se à dificuldade de identificação dos autopoliploides em ambiente natural (REIS et al., 2014) e não tanto à diferença real na ocorrência dos dois tipos de poliploidia.

Enquanto autopoliploides surgem por duplicação do genoma dentro de uma única espécie, os eventos de alopoliploidização originam linhagens poliploides a partir da fusão de conjuntos cromossômicos de espécies distintas e são particularmente comuns em plantas (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998). Vale ressaltar ainda a ocorrência dos poliploides segmentares, oriundos do cruzamento de genomas de espécies próximas o suficiente para apresentarem uma certa homeologia cromossômica (STEBBINS, 1971; RAMSEY e RAMSEY, 2014).

O fenômeno da poliploidização pode trazer vantagens adaptativas iniciais para os indivíduos. Benefícios ecológicos são gerados pela heterose e redundância gênica na alo e autopoliploidia, podendo tornar os poliploides mais vigorosos que seus progenitores, aumentando sua capacidade de colonizar novos *habitats* e de adaptar-

se a novos desafios ecológicos (RAMSEY, 2011; SCHRANZ et al., 2012; TE BEEST et al., 2012; FAWCETT et al., 2013). Outra novidade positiva que a redundância gênica proporciona é a proteção aos poliploides dos efeitos deletérios de certas mutações. Além dessas vantagens, em alguns casos, a reprodução vegetativa e a apomixia ocorrem em genomas duplicados (KOLTUNOW e GOSSNIKLAUS, 2003), o que permite aos poliploides reproduzirem-se sem a necessidade de outro indivíduo (COMAI, 2005). Somadas a todos esses fatores, a abundância comparativa de material genético e as alterações epigenéticas comumente associadas aos poliploides, são fatores adicionais que poderiam explicar a sua maior tolerância ecológica e seu sucesso adaptativo (MALLET, 2007; PAUN et al., 2010; PAUN et al., 2011).

Orchidaceae é uma família especialmente propensa a eventos de hibridação e duplicação do genoma. Isso provavelmente decorre do substancial número de casos em que espécies e citótipos convivem em simpatria com barreiras reprodutivas pouco consistentes, além disso, há fatores, como propagação vegetativa e a própria poliploidização, que favorecem o estabelecimento de híbridos (MALLET, 2005). Em regiões mediterrâneas muitos estudos já confirmaram a influência de hibridação e poliploidia na diversidade de orquídeas (SCOPECE et al., 2008; GÖGLER et al., 2009; XU et al., 2012). Nos trópicos, o gênero mais estudado sob esse aspecto é *Epidendrum*, (MARQUES et al., 2014), maior gênero neotropical de Orchidaceae (MORAES et al., 2013; PINHEIRO e COZZOLINO, 2013).

2 ORCHIDACEAE A. JUSS.: BOTÂNICA, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A família Orchidaceae A. Juss. está entre as duas maiores de angiospermas, com aproximadamente, 25.000 espécies distribuídas em cerca de 736 gêneros (DRESSLER, 2005; CHASE et al., 2015; GOVAERTS, 2016), além dos numerosos híbridos naturais e artificiais (FARIA et al., 2001; MOREIRA e ISAIAS, 2008), estes, produzidos, geralmente, com finalidade comercial. A descoberta recorrente de espécies altera constantemente os números e a taxonomia da família, e com isso demanda-se cada vez mais estudos neste grupo (BARROS, 1996; NOGUEIRA, 2005).

Pesquisas baseadas em informações morfológicas e moleculares posicionam Orchidaceae em Asparagales, como grupo irmão das demais famílias da ordem (CHASE et al., 1995, 1996 e 2000; SOLTIS et al., 2005; APG IV, 2016). A datação baseada em marcadores moleculares permitiu inferir que Orchidaceae separou-se das demais Asparagales há cerca de 67 milhões de anos, e que o principal período de sua irradiação em subfamílias, tribos e subtribos teria ocorrido entre 54 e 40 milhões de anos atrás (VAN DEN BERG, 2003). Dressler (1993) propôs uma classificação para as orquídeas que considera o número e posição das anteras. Atualmente, com base em estudos filogenéticos, Orchidaceae é dividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, e Epidendroideae (CHASE et al., 2015), sendo esta última, a maior subfamília (cerca de 19000 espécies) e também a mais problemática em termos taxonômicos (CHASE et al., 2003).

As orquídeas são consideradas ervas perenes morfológicamente reconhecidas por suas raízes fasciculadas com velame, responsável pela rápida absorção de água e nutrientes, permitindo que muitas espécies habitem locais desprovidos de solo, como ocorre com as epífitas. Em geral, o caule compreende o rizoma, que forma novos brotos, e pseudobulbos, servindo como reservatório de água. As folhas geralmente são coriáceas ou carnosas, com nervação paralelinérvea ou reticulada, e lâmina conduplicada ou plicada, com origem no pseudobulbo, com raros casos de folhas reduzidas ou ausentes (DAHLGREN et al., 1985; DRESSLER, 1993; CRIBB, 1999). As inflorescências são indeterminadas, mas também podem ocorrer flores solitárias. As flores trímeras variam amplamente em tamanho, apresentam simetria zigomorfa e na grande maioria são hermafroditas. O fruto, com três carpelos, é uma cápsula carnosa com milhares de sementes, sem endosperma, extremamente pequenas, e com um tegumento fino e solto em torno de um embrião rudimentar (DRESSLER, 1981; CRIBB, 1999; PRIDGEON et al., 1999). Na falta de tecido nutritivo nas sementes, a energia para o desenvolvimento do embrião é fornecida por fungos associados às raízes das orquídeas (RASMUSSEN, 2002; PEREIRA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2005).

Espécies podem ser encontradas em todas as regiões do planeta, com exceção das regiões polares e de desertos extremamente secos, sendo que a maior diversidade está nos trópicos, com predominância de formas epífitas e rupícolas (JOLY, 2002; PINHEIRO, BARROS e LOURENÇO, 2004). Como país neotropical, o

Brasil destaca-se pela grande variedade de espécies e gêneros (PINHEIRO, BARROS e LOURENÇO, 2004).

Quando o tema é diversidade, este é o maior grupo de monocotiledôneas do Brasil e figura como o segundo mais diverso entre as angiospermas brasileiras, ficando atrás apenas de Fabaceae (FLORA DO BRASIL, 2017). O território brasileiro detém uma das maiores diversidades de orquídeas do continente americano e do mundo, com aproximadamente 235 gêneros e 2.419 espécies, das quais pelo menos 1.620 são endêmicas (BARROS et al., 2010). Todos os domínios fitogeográficos brasileiros abrigam espécies da família, mas a maior riqueza está nas florestas úmidas, principalmente na Floresta Atlântica, com cerca de 1.257 espécies em 176 gêneros, dentre estas, 791 espécies são exclusivas deste domínio (BARROS, RODRIGUES e BATISTA, 2009).

Alguns autores especulam que a polinização por engano ou engodo seja uma das chaves para a notada diversificação ecológica do grupo (COZZOLINO e WIDMER, 2005). Outros, alegam que a diversidade das orquídeas pode também ser consequência da especificidade da relação ecológica com fungos formadores de micorrizas ou ainda da deriva genética de populações isoladas (OTERO e FLANAGAN, 2006). O fato é que toda essa riqueza não é fruto de um só aspecto.

Além da espantosa diversidade, a família destaca-se também pela importância ecológica, comercial/ornamental, culinária e até medicinal, como é o caso de *Coelogyne cristata* Lindley, indicada para tratamento de osteoporose (SHARMA et al., 2014). No âmbito ecológico, as orquídeas assumem importante papel fornecendo alimento e abrigo para formigas e outros insetos, como pulgões e cochonilhas. Apresentam uma relação de parasitismo com fungos (LEAKE, 2005) e de inquilinismo com árvores, nas quais buscam apoio para captar maior luminosidade. Além disso, ainda são espécies indicadoras da qualidade ambiental (WESTON et al., 2005). No campo econômico, essas fanerógamas têm sido utilizadas na ornamentação e paisagismo, devido à beleza e durabilidade das suas flores, e em menor escala na culinária e perfumaria, como é o caso da baunilha (SOUZA e LORENZI, 2008).

Todo esse destaque faz com que as espécies nativas de orquídeas sofram com a fragmentação e devastação de *habitats*, além da retirada ilegal de indivíduos dos seus ambientes naturais para fins comerciais (VAZ e KERBAUY, 2005). A vulnerabilidade aumenta ainda mais se considerarmos o ciclo de vida altamente

especializado - com longo período vegetativo até a idade reprodutiva – associado a sementes com pouca ou nenhuma reserva e germinação dependente da associação com fungos micorrízicos (RASMUSSEN, 2002; PEREIRA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2005).

Devido ao grande número de espécies, ao alto nível de convergência dos caracteres morfológicos e à ampla variação fenotípica - sobretudo em flores -, existe hoje uma gama de problemas taxonômicos envolvendo a família (VAN DEN BERG, 2003). Portanto, tendo em vista a dificuldade de classificação baseada apenas em caracteres morfológicos, a descrição de espécies de Orchidaceae deve ser auxiliada por parâmetros genéticos (CHASE et al., 2015). A principal vantagem da análise genética em comparação à fenotípica é a objetividade da interpretação dos dados, além de não haver influência ambiental direta nos caracteres observados (DRESSLER, 1993).

Conclusivamente, a combinação de grande variedade, ampla área de ocorrência e questões taxonômicas até então não esclarecidas, além do histórico de hibridação e poliploidia no grupo, torna a família um excelente modelo para o estudo de processos evolutivos e de especiação nos trópicos.

3 O COMPLEXO DE ORQUÍDEAS TROPICAIS “*Zygopetalum maculatum*”

Zygopetalum Hook. é um pequeno gênero de Orchidaceae que compreende 14 espécies reconhecidas no Brasil (*Z. brachypetalum* Lindl., *Z. ghillanyi* Pabst, *Z. graminifolium* Rolfe., *Z. intermedium* Lood., *Z. maculatum* (Kunth) Garay, *Z. maxillare* Lodd., *Z. microphytum* Barb. Rodr., *Z. pabstii* Toscano, *Z. pedicellatum* (Thunb.) Garay, *Z. reginae* Pabst, *Z. sellowii* Rchb. F., *Z. sincoranum* V. P. Castro & Campacci, *Z. triste* Barb. Rodr.) (FLORA DO BRASIL, 2017), país considerado o seu centro de diversidade (CHASE et al., 2003). Estas plantas ocorrem em locais saturados de umidade (SHEEHAN e SHEEHAN, 1994), em meio a gramíneas, sobre diversas espécies de samambaias, em frestas de rochas onde há detritos vegetais acumulados e, eventualmente, sobre troncos de árvores e em barrancos em beira de estradas (HOEHNE, 1953; CAMPACCI, 2013).

Esse gênero neotropical está inserido em Epidendroideae e foi descrito por Hooker em 1827, sendo *Zygopetalum mackayi* Hooker a espécie tipo. Seu nome faz referência ao formato de suas flores zigomorfas (com apenas duas pétalas iguais) que se caracterizam ainda por serem grandes, perfumadas e verdes com máculas castanho-vinosas nas pétalas e sépalas (SHEEHAN e SHEEHAN, 1994).

As espécies são descritas como plantas geralmente cespitosas; rizoma quase sempre curto; caule secundário espessado em pseudobulbo; folhas apicais com várias nervuras longitudinais proeminentes, articuladas com bainhas. A inflorescência ocorre em racemo lateral; brácteas florais cimbiformes, com flores vistosas, sépalas e pétalas semelhantes entre si; labelo branco, variavelmente venulado em roxo; polínias do tipo cartilaginosas em número de 4, dotadas de estipe e viscido (ROMANINI, 2006).

Apesar de ter poucas espécies, *Zygopetalum*, ainda apresenta problemas internos de delimitação. Os táxons que ocorrem em campos de altitude e rupestre como *Z. maculatum* (Kunth) Garay (*Zygopetalum mackayi* Hooker), *Z. brachypetalum* Lindl., *Z. intermedium* Lood., *Z. triste* Barb. Rodr., *Z. reginae* Pabst, *Z. ghillanyi* Pabst., *Z. sincoranum* V. P. Castro & Campacci, têm sua taxonomia duvidosa graças à sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos, sobretudo em folha e flor (HOEHNE, 1953). Esse grupo de táxons será denominado neste trabalho como complexo "*Zygopetalum maculatum*".

O complexo "*Z. maculatum*", sob vários aspectos, permanece pouco conhecido. Neste trabalho será apresentado um estudo que abrangerá a ocorrência do grupo no Brasil, além da localidade tipo na Bolívia. A presente proposta tem por objetivo ajudar a clarificar as relações entre os táxons deste grupo, e também utilizá-lo como modelo biológico para o estudo e tentativa de entendimento de processos evolutivos em plantas neotropicais.

CAPÍTULO II – ESTUDO CITOGEOGRÁFICO NO COMPLEXO DE ORQUÍDEAS TROPICAIS “*Zygopetalum maculatum*” (ORCHIDACEAE)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Orchidaceae como modelo biológico em estudos de diversidade e evolução: uma abordagem citotaxonômica

A família Orchidaceae teve seu potencial como modelo para pesquisa e compreensão de processos evolutivos reconhecido, pela primeira vez, em um livro de Charles Darwin que trata da capacidade de diversificação de linhagens, coevolução, especiação e convergência evolutiva neste grupo (DARWIN, 1877). Segundo Peakall (2007), as orquídeas são excelentes modelos para estudos evolutivos, existindo ainda muitas lacunas no conhecimento de seus táxons, principalmente nas regiões tropicais, local onde são mais diversas. Tal carência de informações pode ser atribuída, em parte, ao grande tamanho da família, o que dificulta a definição de relações de parentesco nos variados níveis taxonômicos (FAY e CHASE, 2009).

Abordagens evolutivas e documentação de hibridação natural e poliploidia em Orchidaceae já contam com um número significativo de estudos para espécies europeias (COZZOLINO et al., 2006; MOCCIA, WIDMER e COZZOLINO, 2007), com destaque para o gênero *Ophrys*, com vários casos relatados de hibridação e introgressão (SOLIVA e WIDMER, 2003; CORTIS et al., 2009). Entretanto, poucos relatos são conhecidos para espécies de região tropical. Dentre os escassos exemplos está o trabalho de Moraes et al. (2013) que descreve a ocorrência de uma zona híbrida na costa brasileira, onde populações simpátricas de *Epidendrum fulgens* ($2n=2x=24$) e *E. puniceoluteum* ($2n=4x=56$) formam híbridos triploides ($2n=3x=38$ e 40). Em outro estudo com o mesmo gênero, análise citogenética e citometria de fluxo foram ferramentas importantes para caracterizar populações híbridas de *E. fulgens* x *E. denticulatum* no Sudeste do Brasil (PINHEIRO et al., 2015). Marques et al. (2014), através da estimativa de quantidade de DNA e do emprego de marcadores moleculares, investigaram sob o ponto de vista evolutivo três zonas híbridas equatoriais de *Epidendrum*, onde confirmaram hibridação recorrente e registraram a ocorrência de poliploidia em alguns casos.

É incontestável que estudos citogenéticos têm auxiliado em inferências taxonômicas desde o início do século XX (GUERRA, 1990), sendo que a maior abundância de pesquisas desse tipo está concentrada em grupos vegetais de regiões temperadas, principalmente da Europa e dos Estados Unidos. Entretanto, é importante ressaltar que é nos trópicos, devido à maior diversidade de organismos, onde esforços devem ser concentrados para averiguação dos mecanismos evolutivos, visto que estes podem nos trazer novos rumos no entendimento da ampla diversidade característica de regiões de clima quente. Relações genéticas entre espécies e inclusive dentro de uma população podem ser avaliadas com o emprego de técnicas citogenéticas, levando à melhor compreensão de como os grupos divergiram entre si. Tal inferência é possível graças ao fato de que o cariótipo mantém-se razoavelmente estável mesmo sob variações ambientais (GUERRA, 2008).

Apenas o conhecimento do número cromossômico já é um parâmetro útil na diferenciação de espécies morfologicamente semelhantes (GUERRA, 2008), mas estudos citotaxonômicos complementados com outros dados cromossômicos tais como padrão de bandas, quantidade e posição de satélites no genoma (GUERRA, 2008), número e localização de sítios de DNA ribossômico e estimativa da quantidade de DNA nuclear, ganham robustez e maior suporte para inferências evolutivas em grupos vegetais. Não por acaso, grande quantidade de estudos já empregaram a citogenética como ferramenta de auxílio à taxonomia para caracterizar táxons e até mesmo diferenciar híbridos de possíveis parentais (ARTELARI e GEORGIU, 2003; SANZO, 2003; WINDHAM, 2003; SMARDA et al., 2003 e 2005; CONTERATO e WITTMANN, 2006; KISSLING et al., 2008; SOUZA, CROSA e GUERRA, 2010, MCINTYRE, 2012; MORAES et al., 2013; PAVARESE et al., 2013; BENAMARA-BELLAGHA et al., 2014; HIDALGO et al., 2017; ROMERO-DA-CRUZ et al., 2017).

Assim, informações citogenéticas são consideradas boas ferramentas no intuito de traçar hipóteses para a evolução cariotípica de um táxon, pois permitem inferências sobre o número cromossômico básico ancestral do grupo, as possíveis linhas evolutivas ocorridas e ainda a correlação de linhagens com grupos taxonômicos já estabelecidos. Diante do exposto, acredita-se que uma abordagem integrada é muito bem vinda ao estudo de grupos com taxonomia complexa, como é o caso de Orchidaceae, em especial o complexo "*Zygopetalum maculatum*".

1.2 Estimativa da quantidade de DNA como ferramenta auxiliar à taxonomia

O tamanho do genoma é reconhecidamente um parâmetro relevante na caracterização de plantas (SUDA et al., 2006). Em estudos atuais, o conteúdo de DNA nuclear é principalmente estimado a partir da técnica de citometria de fluxo, que avalia a intensidade de fluorescência relativa de núcleos em suspensão obtidos a partir de tecido vegetal de duas espécies, onde uma delas é a planta de interesse e a outra, que, apresenta quantidade de DNA nuclear conhecida, é chamada de padrão de referência (DOLEŽEL e BARTOS, 2005).

Dentro de projetos que visam o conhecimento da biodiversidade vegetal, as estimativas da quantidade de DNA e nível de ploidia, por meio da técnica de citometria de fluxo, têm sido úteis na elucidação de numerosos problemas taxonômicos e evolutivos (MOSCONE et al., 2003; DOLEŽEL, GREILHUBER e SUDA, 2007; KRON et al., 2007; KOLAR et al., 2009; CAROVIC-STANKO et al., 2010; LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011; FAVORETO et al., 2012; WOLF et al., 2014; BANIAGA, ARRIGO e BARKER, 2016; WANG, MENG e YANG, 2017). Atualmente a quantidade de DNA já é conhecida para um amplo número de plantas, sendo que os valores de 2C variam em até 2500 vezes no grupo das angiospermas (ver GREILHUBER et al., 2006; PELLICER et al., 2010). Entre os processos mais importantes no incremento do tamanho do genoma dos organismos está a poliploidização (BENNETT e LEITCH, 2005). Pelo mecanismo de duplicação do DNA o nível de ploidia pode ser aumentado várias vezes dentro de uma mesma espécie (WENDEL, 2000; GUERRA, 2008).

Dados sobre conteúdo de DNA nuclear em Orchidaceae são ainda bastante escassos, tendo-se em vista o tamanho da família. Até o momento, há descrição de que o valor 2C varia de 1,20 pg em *Oncidium leucochilum* Lindley até 77,65 pg em *Cypripedium henryi* Rolfe (BENNETT e LEITCH, 2012). Além de serem poucos os gêneros espécies com o valor 2C já determinado (LEITCH et al., 2009), inúmeros gêneros sequer têm uma espécie com quantidade de DNA nuclear descrita (BENNETT e LEITCH, 2012). É possível que a carência de dados sobre quantidade de DNA na família decorra da associação de complicadores como o grande número de espécies, ampla abrangência geográfica, dificuldade de acesso às plantas nativas e elevada taxa de endoreduplicação observada em diversos táxons (ver, FUKAI et al.,

2002; LIM e LOH 2002; YANG e LOH, 2004; RUPP et al., 2010; LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011; TRÁVNÍČEK et al., 2015).

Apesar da dificuldade descrita, nas últimas décadas o número de trabalhos com o intuito de estimar a quantidade de DNA nos núcleos de espécies de orquídeas vem aumentando de forma considerável (JONES et al., 1998; LIN et al., 2001; YANG e LOH, 2004; RUPP et al., 2010; LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011; ZONNEVELD e POLLOCK, 2012; CHEN et al., 2013; NEMORIN et al., 2013; PAVARESE et al., 2013; MARQUES et al., 2014; SILVA et al., 2014; MORAES et al., 2017), mas ainda há muito o que ser feito. Para o gênero *Zygopetalum* a literatura atual não mostra qualquer estimativa de tamanho do genoma.

1.3 Estudos cromossômicos na família Orchidaceae

A identificação, caracterização e organização dos vários táxons apenas com base em caracteres morfológicos é muitas vezes difícil para os taxonomistas. Portanto, o uso de ferramentas auxiliares no estudo da biodiversidade pode contribuir para a delimitação de grupos taxonômicos. Sob esse ponto de vista, investigações sobre o cariótipo são valiosas na solução de problemas envolvendo relações entre famílias, gêneros, espécies e variedades, principalmente porque este é considerado um carácter menos vulnerável a variações decorrentes de alterações ambientais, quando comparado à maioria dos parâmetros morfológicos ou bioquímicos (GUERRA, 1988).

O número cromossômico pode manter-se estável dentro de um gênero, mas também variar entre espécies e até mesmo entre populações de uma mesma espécie (ASSIS et al., 2013). Números cromossômicos distintos permitem confirmar a identidade de espécies com morfologia muito similar. Adicionalmente, variações na quantidade e posição de sítios de DNA ribossômico (DNAr) 5S e 45S também colaboram com a taxonomia, pois podem diferenciar espécies com números coincidentes de cromossomos. Trabalhos com esta abordagem para orquídeas já podem ser vistos, por exemplo, no estudo de Moraes et al. (2017), no qual foi investigada a evolução do cariótipo em Maxillariinae. Dados combinados de tamanho de genoma, número cromossômico, localização de sítios DNA ribossômico (5S e 45S), além de análise filogenética, permitiram indicar que poliploidia e disploidia estão

diretamente relacionadas à variedade de genótipos na subtribo. Outras pesquisas também valeram-se de dados citogenéticos para abordar a evolução e a taxonomia em Orchidaceae (ver OLIVEIRA, BARROS e FORNI-MARTINS 2013; OLIVEIRA et al., 2015; MORAES et al., 2016)

Ainda que a citogenética seja uma ferramenta valiosa na caracterização de plantas, a família Orchidaceae é muito numerosa e portanto, relativamente pouco conhecida no que diz respeito ao cariótipo. Até o ano 2000, somente 15% das espécies de orquídeas tinham o número cromossômico conhecido (FÉLIX e GUERRA, 2000), variando de $2n=10$ em *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressler (DODSON, 1957) a $2n=240$ em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (FÉLIX e GUERRA, 2010), sendo $2n=40$ o número cromossômico mais relatado para a família (FÉLIX e GUERRA, 1999; GUERRA, 2000; CONCEIÇÃO et al., 2006; FÉLIX e GUERRA, 2010). A grande variabilidade cromossômica pode ser observada também dentro de gêneros. Na subfamília Epidendroideae, por exemplo, apenas cinco dos 128 gêneros, que contêm mais de cinco espécies estudadas, possuem número cromossômico não variável (FÉLIX e GUERRA, 2010). Na tribo Cymbidieae, à qual pertence o gênero *Zygopetalum*, a variação vai desde $2n=10$ em *Psychmorchis pusilla* até $2n=168$ em *Oncidium varicosum* (FÉLIX e GUERRA, 2010).

Em consequência da pequena amostragem, o número cromossômico básico das orquídeas ainda não está bem definido, sendo $x=7$ o número básico mais provável, embora para alguns gêneros admita-se $x=6$ (FÉLIX e GUERRA 2000; 2005), derivado de um evento de dispolidia descendente. A incerteza quanto ao número básico torna difícil estimar o nível de ploidia e a elaboração de teorias acerca da evolução cariotípica em Orchidaceae (FÉLIX e GUERRA, 2000). Contudo, alterações cromossômicas como aneuploidia e processos de dispolidia - que resultam em aumento/diminuição do número de cromossomos, acompanhada ou não de alteração no conteúdo de DNA durante a reestruturação genômica - são consideradas os eventos evolutivos mais importantes na família (FÉLIX e GUERRA, 2010).

O elevado número de cromossomos encontrado na maioria das orquídeas estudadas até agora, sugere que boa parte das espécies teve sua origem em eventos que geraram poliploides ou ainda em hibridações seguidas ou não de poliploidização. A poliploidia é com propriedade o processo evolutivo mais importante em plantas (SOLTIS et al., 2009) e de forma corroborativa tem sido observada em muitos gêneros

de orquídeas (FÉLIX e GUERRA, 2000; 2005), inclusive na subfamília Epidendroideae, na qual está inserido o gênero *Zygopetalum* (FÉLIX e GUERRA, 2000).

Estudos mais detalhados envolvendo técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) são relativamente recentes e foram empregados em poucos gêneros (KAO et al., 2001; D'EMERICO et al., 2005; CABRAL, FÉLIX e GUERRA, 2006; KOEHLER et al., 2008; MORAES et al., 2012; MORAES et al., 2013; PAVARESE et al., 2013; MORAES et al., 2016 e 2017), não havendo qualquer relato para espécies de *Zygopetalum*.

1.4 Citogenética do complexo de orquídeas “*Zygopetalum maculatum*”

Zygopetalum Hook. pertence à subfamília Epidendroideae, a maior dentro de Orchidaceae com nove tribos e mais de 19.000 espécies distribuídas em 650 gêneros (PRIDGEON et al., 2005; CHASE et al., 2015). O gênero compreende espécies distribuídas na América do Sul, passando pela Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, com a maior parte dos representantes encontrados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, bem como nos estados da Bahia e Mato Grosso (CHASE et al., 2003; TOSCANO-DE-BRITO e CRIBB, 2005; PUPULIN 2009, FLORA DO BRASIL, 2017). Apesar da relevante distribuição geográfica e presença de flores perfumadas, chamativas e com potencial ornamental, são raros os estudos sobre os cromossomos deste grupo. Félix e Guerra (2000) citam referências para número cromossômico de cinco espécies de *Zygopetalum*: *Z. maxillare*, $2n=48$ cromossomos (TANAKA e KAMEMOTO, 1984; DAVIÑA et al., 2009) e *Z. citrinum*, $2n=96$; *Z. discolor* $2n=48$; *Z. mackayi* [= *Z. maculatum*] $2n=48$; *Z. odoratissimum* $2n=48-50$ cromossomos (DRESSLER, 1993). No entanto, de acordo com o banco de dados da Flora do Brasil (2017), *Z. citrinum* e *Z. discolor* são atualmente atribuídas a outro gênero, enquanto *Z. odoratissimum* já não é aceita como espécie.

Os táxons incluídos no complexo “*Zygopetalum maculatum*” são de difícil delimitação taxonômica com sobreposição de caracteres morfológicos, principalmente os relacionados a folhas e flores (HOEHNE, 1953). Com intuito de contribuir para ampliar do conhecimento acerca do complexo citado acima e, adicionalmente, gerar informações sobre a evolução cromossômica e cariotípica dentro de Orchidaceae,

este capítulo teve como propósito a realização de uma análise citogenética de espécies circunscritas em "*Zygopetalum maculatum*", empregando técnicas de citogenética convencional/molecular, além de citometria de fluxo. O emprego de ferramentas para o estudo cromossômico, atrelado à estimativa da quantidade de DNA nuclear, é de grande importância para a compreensão das relações taxonômicas dentro do complexo e do próprio gênero, reforçando a possibilidade de aplicação do grupo como potencial modelo de estudo para processos evolutivos nos trópicos.

2 OBJETIVOS

O foco do presente estudo foi investigar a origem e a diversificação de espécies dentro do complexo de orquídeas tropicais "*Zygopetalum maculatum*". Para tanto, foram caracterizados, sob o ponto de vista citológico, representantes de "*Z. maculatum*" ocorrentes na América do Sul. Foi estimada a quantidade de DNA nuclear e de maneira complementar, foram empregadas análises de citogenética clássica/molecular. Pretendeu-se assim, contribuir para o conhecimento genético deste grupo de orquídeas. Por um aspecto mais amplo, buscou-se também auxiliar no entendimento da origem de variações naturais no genoma de vegetais e sua contribuição para o processo de especiação em plantas tropicais.

2.1 Objetivos específicos

O presente estudo pretende traçar um perfil de distribuição geográfica do complexo "*Zygopetalum maculatum*", ocorrente em 21 populações no Brasil e uma na Bolívia. Mais especificamente, os objetivos concentraram-se nos seguintes pontos:

- 1) Verificar se há variação de nível de ploidia em "*Z. maculatum*".
- 2) Se identificados diferentes níveis de ploidia de "*Z. maculatum*", determinar sua distribuição ao longo do território nacional, verificando se ocupam áreas distintas ou podem ser observados em simpatria.
- 4) Caracterizar o perfil cariotípico no complexo "*Z. maculatum*".

3 MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Material biológico

O material para estudo (Figura 1) foi coletado em parceria com a Prof^a Dr^a. Samantha Koehler do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Conforme recomendado por Arnaud-Haond (2007), as amostras foram coletadas espaçadamente de modo a evitar a coleta de clones, foi preconizado o mínimo de dez metros entre os indivíduos coletados.

Para as estimativas da quantidade de DNA via citometria de fluxo, foram realizadas coletas de folhas de indivíduos em condições de campo. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo algodão úmido até o processamento do material no laboratório. Para o estudo citogenético, exemplares das populações, em que foi possível coletar indivíduos inteiros, encontram-se em cultivo no Orquidário Frederico Carlos Hoehne (OFCH, Instituto de Botânica de São Paulo, SP) em colaboração com o Dr. Eduardo Catharino e na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O estudo conta com exemplares do complexo "*Zygopetalum maculatum*" coletados em 21 localidades no Brasil e uma na Bolívia (Tabela 1). As análises citogenéticas e estimativa de quantidade DNA foram realizadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF.



Figura 1 - "*Zygotropis maculatum*" em campo. A e B: representantes da variação fenotípica em flores simpátricas (Parque Estadual do Ibitipoca - MG) de "*Zygotropis maculatum*"; C: população em campo na serra do Piquete, SP. Fotos: A e B: Luiz Menini Neto; C: Thiago Campacci.

Tabela 1 - Origem das 22 populações estudadas do complexo “*Zygopetalum maculatum*”, com respectivas amostragens e coordenadas geográficas

| População | Estado/País | N. Indivíduos | Citometria | 2n | FISH | Latitude (Sul) | Longitude (Oeste) |
|------------------------------|-------------|---------------|------------|----|------|----------------|-------------------|
| Andorinhas | MG/Brasil | 5 | x | x | | 20°21.996' | 43°29.678' |
| Bocaina | SP/Brasil | 34 | x | x | | 22°42.29' | 44°34.46' |
| Cânion Fortaleza | RS/Brasil | 11 | x | | | 29°03.531' | 49°57.417' |
| Serra do Cipó | MG/Brasil | 11 | x | x | x | 19°15.879' | 43°33.184' |
| Coroico/Bolívia | NOR/Bolívia | 23 | x | x | x | 16°16.124' | 67°41.231' |
| Serra Fina | MG//Brasil | 13 | x | x | | 22°27.12' | 44°54.06' |
| Monte Crista | SC/Brasil | 6 | x | | | 26°04.519' | 48°55.116' |
| Padre Ângelo | MG/Brasil | 23 | x | | | 19°20'171' | 41°34'235' |
| São Thomé das Letras | MG/Brasil | 5 | x | x | | 21°43.500' | 44°58.936' |
| Paty de Alferes | RJ/Brasil | 15 | x | | | 22°26.437' | 43°23.107' |
| Pedra D'Água | MG/Brasil | 32 | x | | | 17°29.233' | 41°37.001' |
| Pedra do Gado | MG/Brasil | 23 | x | | | 17°22'143' | 41°44'209' |
| Pedra Dubois | RJ/Brasil | 7 | x | | | 21°56.354' | 41°59'175' |
| Pico do Garrafão | SP/Brasil | 20 | x | x | x | 23°39.29' | 46°02.05' |
| Pico do Itambé | MG/Brasil | 47 | x | x | x | 18°23.917' | 43°20.436' |
| Pico do Pinhão | MG/Brasil | 47 | x | | | 19°15.542' | 41°35.099' |
| Pico dos Marins | SP/Brasil | 32 | x | x | | 22°29'46" | 45°07'39" |
| Pico Paraná | PR/Brasil | 25 | x | x | | 25°14.120' | 48°50.183' |
| Serra do Desbarrancado | BA/Brasil | 20 | x | | | 12°45.196' | 41°30.344' |
| Serra do Pitengo | MG/Brasil | 59 | x | | | 18°31.332' | 41°08.422' |
| Parque Estadual do Ibitipoca | MG/Brasil | 101 | x | x | | 21° 43' 30" | 43° 54' 15" |
| Ciotia | MG/Brasil | 21 | x | x | x | 23° 36' 14" | 46° 55' 09" |
| Total de indivíduos | | 580 | | | | | |

*A amostragem ocorreu de acordo com o número de indivíduos presentes em cada população.

3.2 Análise da quantidade de DNA por citometria de fluxo

Para determinar a quantidade de DNA no complexo “*Z. maculatum*”, aproximadamente 25mg de tecido foliar de cada indivíduo e o mesmo peso de tecido foliar do padrão interno de referência *Vicia faba* ssp. *faba* var *equina* cultivar Inovec [26.90pg de DNA] (DOLEŽEL et al., 1992) foram macerados em 1mL do tampão LB01 gelado, a fim de liberar os núcleos em suspensão (DOLEŽEL et al., 1989). O tecido macerado foi filtrado em uma malha de 50µm, sendo coletado em um tubo de poliestireno. A coloração dos núcleos deu-se pela adição à suspensão de 25µL de uma solução a 1mg/mL de iodeto de propídio (IP) para mensurar a quantidade total

de DNA nuclear. Adicionalmente 5 μ L de RNase (200 μ g/mL) foram adicionados a cada amostra.

As análises foram realizadas em triplicata no citômetro BD FACSCanto™II (Becton, Dickinson and Company, USA) e os histogramas foram obtidos pelo software Cell Quest. A análise estatística foi realizada por meio do software Flowing Software 2.5.1 (<http://www.flowingsoftware.com>). O conteúdo de DNA foi obtido em picogramas (pg) como mostrado a seguir:

Amostra (2C) = (valor observado para intensidade de fluorescência no canal do pico da espécie/valor observado para intensidade de fluorescência no canal do pico do padrão) x quantidade de DNA do padrão interno de referência.

3.3 Análise citogenética

3.3.1 Determinação do número cromossômico

Para determinar o número somático (2n) de cromossomos, meristemas radiculares coletados de plantas cultivadas em vasos foram tratados com 8-hidroxiquinoleína a 0,002M (8-HQ Sigma®), fixados em solução Carnoy (etanol:ácido acético, 3:1) e armazenados em refrigerador, por no mínimo 24h.

O material foi então lavado em água destilada e submetido à uma digestão enzimática [2% (p/v) celulase Onozuka R-10 (Serva®)/20% (v/v) pectinase (Sigma®)] à 37°C por 7h. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação e secagem ao ar após maceração enzimática (CARVALHO, 1995). Por fim, as células foram coradas com Giemsa 5% (Merck®) em tampão fosfato pH 6,8 durante 4 minutos. Pelo menos 20 células de cada indivíduo foram avaliadas em microscópio de luz Olympus BX51 acoplado a um sistema de digitalização e análise de imagens (Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics™).

3.3.2 Morfometria cromossômica

Cariogramas representativos de cada número cromossômico foram montados a partir da média de cinco metáfases mitóticas. A ordenação dos pares de

cromossomos respeitou a ordem decrescente do braço curto. As imagens das metáfases foram capturadas por meio de uma câmera Olympus DP72 em microscópio Olympus BX51 e as medidas cromossômicas realizadas com o auxílio do software Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

Foram mensurados o braço curto (bc), o braço longo (bl), o comprimento total (ct), a razão entre os braços ($r = bl/bc$) e o índice centromérico (ic). Os homólogos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t) (LEVAN, FREDGA e SANDERBERG, 1964).

Também, foram calculados a assimetria de cada cromossomo (A_i) e o grau de assimetria do cariótipo (A), de acordo com Watanabe et al. (1999), onde A varia de 0 (completamente simétrico) a 1 (completamente assimétrico).

$$A_i = (bl - bc) / (bc + bl)$$

$$A = (1 / n) \sum A_i$$

Idiogramas foram obtidos no programa Microsoft Excel 2013, as medidas consideradas foram as médias observadas nas mesmas cinco metáfases mitóticas utilizadas na elaboração dos cariogramas.

3.3.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para o estudo com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram investigados indivíduos com 48 cromossomos das populações Corico, Pico do Itambé, Pico do Garrafão e Cotia. Os indivíduos com 72 cromossomos foram oriundos das populações de Pico do Itambé e Serra do Cipó. No caso de indivíduos que apresentaram 96 cromossomos, as populações de Finas, Parque Estadual do Ibitipoca e Bocaina foram avaliadas. Esta amostragem ocorreu de forma a cobrir todos os números cromossômicos encontrados no complexo, respeitando-se a disponibilidade de material vegetal e a obtenção de lâminas adequadas para análise.

As sondas para a localização de regiões de DNA ribossômico (DNAr) no genoma de "*Zygopetalum maculatum*" foram periodicamente obtidas a partir de cepas de *Escherichia coli* transformadas para este fim. Foram utilizadas sondas contendo a região de DNA ribossomal 18S de *Triticum aestivum* e DNA ribossomal 5S de *Zea*

mays gentilmente cedidas pelo Dr. Jimmy Jiang, University of Wisconsin, USA. As regiões de DNAr foram extraídas com o kit GE Heathtare Ilustra™ PlasmidPrep MiniSpin e então marcadas com digoxigenina por meio da reação de nick translation com o kit DigNick (Roche®).

O processo de hibridização foi adaptado de Jiang et al. (1995). Cada lâmina recebeu 100µL de formamida 70%/2x SSC e foi desnaturada em estufa (80-85°C) por 30 segundos a 1 minuto (este tempo variou de acordo com cada indivíduo) sendo em seguida submetida a uma série alcoólica crescente em banhos de etanol (70%, 90% e 100%, por 5 min cada). A mistura de hibridização foi composta de 10µL de formamida deionizada 100%, 4µL de dextran sulfato 50%, 2µL de 20x SSC, 1µL de sonda para DNAr 5s ou 45s e 2µL de ddH₂O.

Cada lâmina recebeu 19µL da mistura de hibridização após desnaturação a 90°C por 10min. Para completar o processo de hibridização, as lâminas foram mantidas em uma câmara úmida e protegida de luz em estufa a 37°C por, no mínimo, 48h. Passado o período de incubação, o material passou por banhos em soluções salinas (2xSSC e 1xPBS) para remoção do excesso de sonda.

A mistura de detecção continha 20µL do reagente de bloqueio 5xTNB Buffer, 80µL de ddH₂O, 1µL de anti-DIG conjugada com Rhodamina (Sigma®). As lâminas foram novamente incubadas em uma câmara úmida e escura à 37°C por 1h. Em seguida, passaram por novos banhos em soluções salinas (1xTNT e 1xPBS) e finalmente foi utilizado o meio de montagem 20µL de VECTASHIELD®/DAPI, contendo fluorocromo DAPI para contracorar os cromossomos.

As lâminas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) e as figuras digitalizadas por meio da câmera Olympus U-TVO-63XC (SN1A48982 – T7 TOKYO, JAPAN) acoplada a um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) para posterior análise no *software* Imagepro-plus (Media Cybernetics).

4 RESULTADOS

4.1 Tamanho do genoma e nível de ploidia em “*Zygopetalum maculatum*”

As suspensões nucleares forneceram histogramas de boa qualidade com quatro ou três picos (Figura 2). Os gráficos com quatro picos representam em sequência o pico G_0/G_1 e o pico G_2 da amostra (orquídea) e os picos G_0/G_1 e o pico G_2 do padrão interno de referência *Vicia faba*. Já os histogramas com apenas três picos mostram respectivamente o pico G_0/G_1 da amostra (orquídea), o pico G_2 da amostra (orquídea) e G_0/G_1 de *V. faba* sobrepostos e, por último o pico de G_2 de *V. faba*. A partir das análises desses dados foi possível calcular o valor médio para o conteúdo 2C de DNA nuclear das 580 plantas de “*Z. maculatum*” (Tabela 2).

A partir do pico G_0/G_1 de fluorescência do padrão *Vicia faba* ($2C=26,90\text{pg}$; DOLEŽEL et al., 1992), calculou-se o valor médio de conteúdo de DNA dos indivíduos do complexo “*Z. maculatum*”. A tabela 3 mostra os valores obtidos para a quantidade de DNA nuclear e o tamanho do genoma (Mpb) correspondentes a cada grupo de ploidia encontrado, enquanto a figura 3 ilustra a distribuição desses três grupos, considerando todos os indivíduos avaliados. A figura 4 apresenta, detalhadamente a composição das populações quando observado o nível de ploidia dos indivíduos, foram identificados três grupos I, II e III relacionados à quantidade de DNA. Com os resultados de quantidade de DNA, foi possível traçar a distribuição geográfica dos três grupos observados para “*Z. maculatum*” ao longo do território brasileiro (Figura 5).

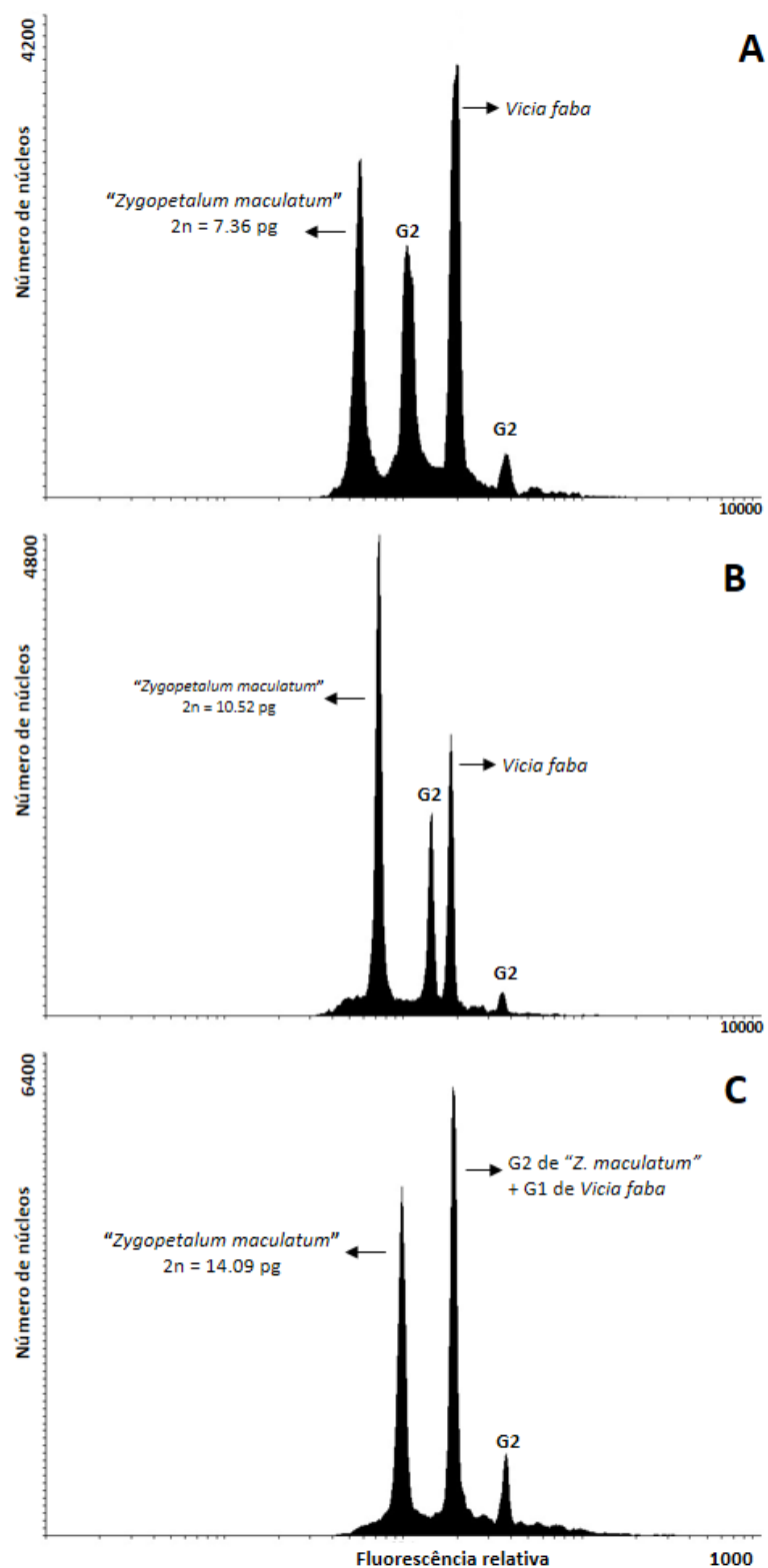


Figura 2 - Histogramas representativos da quantidade de DNA de "*Zygotetulum maculatum*" (Orchidaceae) obtidos a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo (IP). O padrão interno de referência utilizado foi *Vicia faba* - $2C=26,90\text{pg}$ – (DOLEŽEL et al., 1992). A: Histograma de indivíduo de "*Zygotetulum maculatum*" com $2C=7,36\text{pg}$. B: Histograma de indivíduo de "*Zygotetulum maculatum*" com $2C=10,52\text{pg}$. C: Histograma de indivíduo de "*Zygotetulum maculatum*" com $2C=14,09\text{pg}$ de DNA. G1=núcleos com genoma não duplicado; G2=núcleos com genoma duplicado.

Tabela 2 - Tamanho médio do genoma (2C) observado em 22 populações de indivíduos do complexo “*Zygopetalum maculatum*”

| População | Origem | Número de indivíduos* | Valor médio de 2C (pg) ± s.e. | CV** (%) | Tamanho do genoma (Mpb***) |
|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 1 | Andorinhas/MG | 5 | 14,13 ± 0,047 | 2,9 | 13821,10 |
| 2 | Bocaina/SP | 34 | 14,08 ± 0,126 | 2,6 | 13774,15 |
| 3 | Cânion Fortaleza/RS | 11 | 14,15 ± 0,163 | 3,0 | 13838,70 |
| 4 | Serra do Cipó/MG | 5 | 10,55 ± 0,025 | 2,6 | 10317,90 |
| | | 6 | 14,05 ± 0,127 | 2,6 | 13742,86 |
| 5 | Coroico/Bolívia/NOR | 23 | 7,40 ± 0,055 | 3,55 | 7238,18 |
| 6 | Serra Finas/MG | 13 | 14,05 ± 0,122 | 2,62 | 13744,81 |
| 7 | Monte Crista/SC | 6 | 13,98 ± 0,028 | 2,88 | 13672,44 |
| 8 | Padre Ângelo/MG | 3 | 7,32 ± 0,090 | 2,54 | 7161,89 |
| | | 17 | 10,45 ± 0,062 | 2,41 | 10218,14 |
| | | 3 | 14,32 ± 0,205 | 2,54 | 14001,96 |
| 9 | São Thomé das Letras/MG | 5 | 13,98 ± 0,057 | 2,87 | 13674,10 |
| 10 | Paty de Alferes/RJ | 15 | 14,12 ± 0,157 | 2,81 | 13810,34 |
| 11 | Pedra D'Água/MG | 32 | 7,39 ± 0,075 | 2,57 | 7223,51 |
| 12 | Pedra do Gado/MG | 23 | 7,43 ± 0,063 | 2,53 | 7265,56 |
| 13 | Pedra Dubois/RJ | 7 | 14,18 ± 0,124 | 2,71 | 13864,11 |
| 14 | Pico do Garrafão/SP | 1 | 7,24 ± 0,000 | 2,00 | 7080,72 |
| | | 19 | 14,02 ± 0,096 | 2,53 | 13710,58 |
| | | 12 | 7,38 ± 0,060 | 2,80 | 7216,66 |
| 15 | Pico do Itambé/MG | 7 | 10,50 ± 0,087 | 2,39 | 10268,02 |
| | | 28 | 14,10 ± 0,130 | 2,30 | 13787,84 |
| | | 36 | 7,37 ± 0,529 | 2,52 | 7204,93 |
| 16 | Pico do Pinhão/MG | 1 | 10,60 ± 0,000 | 2,76 | 10366,80 |
| | | 10 | 14,05 ± 0,126 | 2,51 | 13739,92 |
| | | 32 | 14,02 ± 0,109 | 2,77 | 13708,63 |
| 17 | Pico dos Marins/SP | 32 | 14,02 ± 0,109 | 2,77 | 13708,63 |
| 18 | Pico do Paraná/PR | 1 | 10,57 ± 0,000 | 2,94 | 10337,46 |
| | | 24 | 14,05 ± 0,132 | 2,98 | 13740,90 |
| 19 | Serra do Desbarrancado/BA | 20 | 7,35 ± 0,077 | 2,70 | 7189,28 |
| 20 | Serra do Pitengo/MG | 57 | 7,39 ± 0,089 | 2,63 | 7226,44 |
| | | 1 | 10,45 ± 0,000 | 2,03 | 10220,10 |
| | | 1 | 14,08 ± 0,000 | 2,87 | 13770,24 |
| 21 | P. E. do Ibitipoca/MG | 101 | 14,05 ± 0,295 | 2,91 | 13740,90 |
| 22 | Cotia/MG | 20 | 7,32 ± 0,098 | 2,98 | 7158,96 |
| | | 1 | 10,46 ± 0,000 | 2,45 | 10229,88 |
| Total de indivíduos | | 580 | | | |

*A amostragem ocorreu de acordo com o número de indivíduos presente em cada população;

**Coeficiente de variação;

***Mega pares de bases, 1pg de DNA=978Mpb (BENNETT, BHANDOL e LEITCH, 2000).

Tabela 3 - Conteúdo médio 2C de DNA (pg) e tamanho médio do genoma (Mpb) de representantes de "*Zygopetalum maculatum*" oriundos de 22 populações (580 indivíduos)

| Grupo | 2C(pg) | Tamanho do Genoma (Mpb*) |
|-------|---------------|--------------------------|
| I | 7,36 ± 0,093 | 7197,102 |
| II | 10,52 ± 0,082 | 10280,177 |
| III | 14,09 ± 0,136 | 13771,391 |

*1pg de DNA equivale a 978Mpb (BENNETT, BHANDOL e LEITCH, 2000).

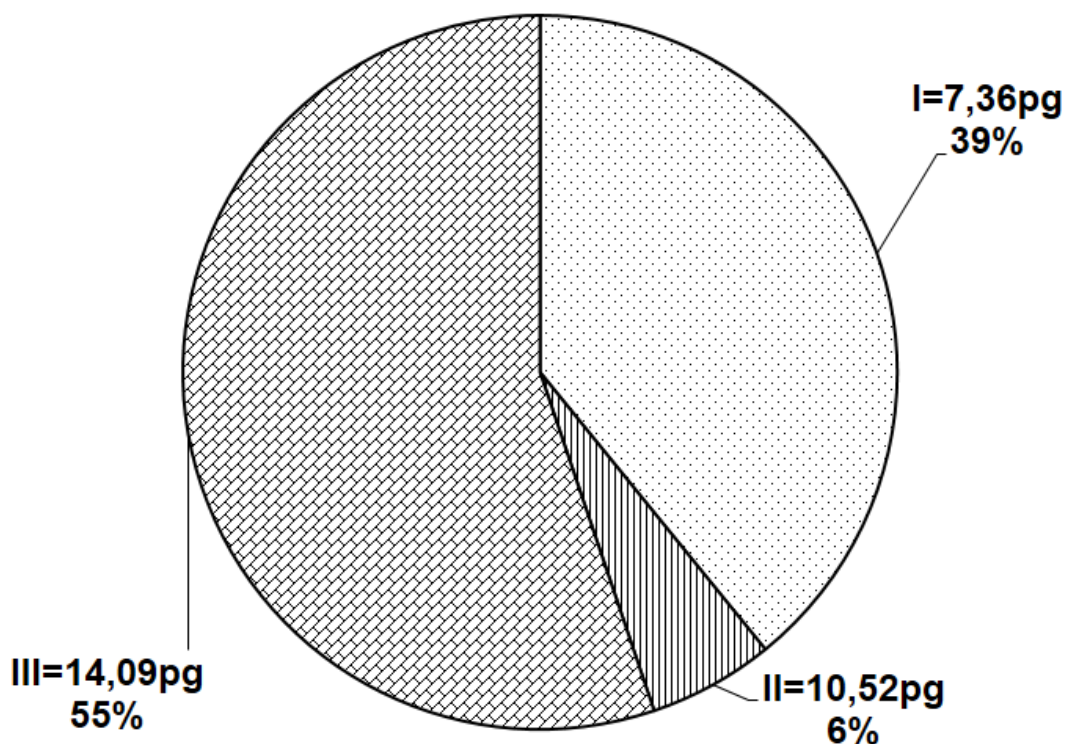
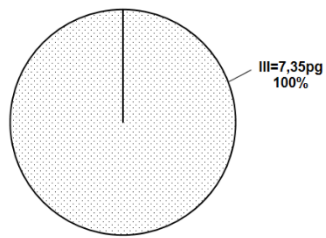
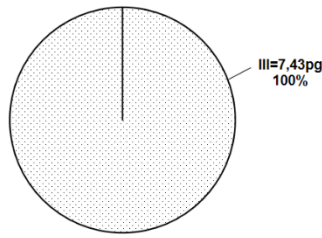


Figura 3 - Distribuição percentual das diferentes quantidades de DNA observadas em 22 populações (580 indivíduos) em "*Zygopetalum maculatum*". Três grupos de indivíduos foram formados conforme o valor 2C. Grupo I com 2C=7,36 pg; Grupo II com 10,52 pg; Grupo III com 14,09pg.

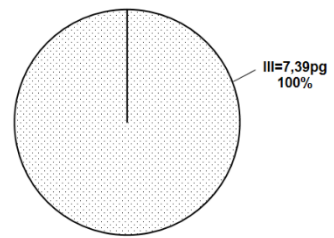
SERRA DO DESBARRANCADO - BA



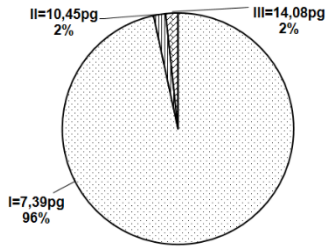
PEDRA DO GADO - MG



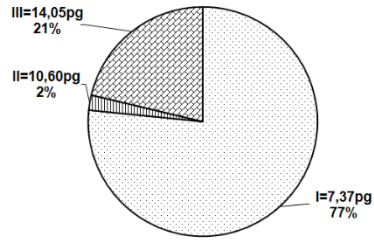
PEDRA D'ÁGUA MG



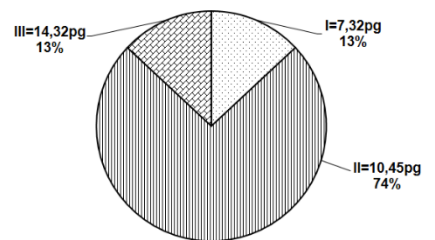
SERRA DO PITENGO - MG



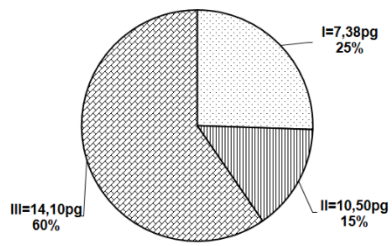
PICO DO PINHÃO - MG



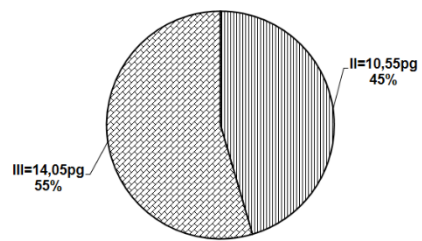
PADRE ÂNGELO - MG



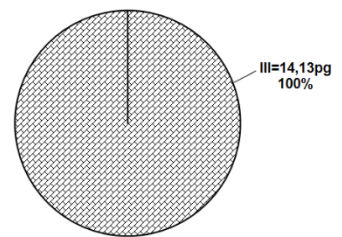
PICO DO ITAMBÉ - MG



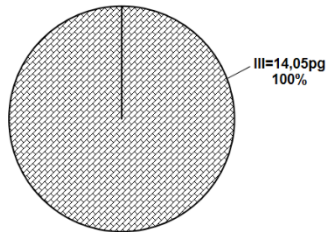
SERRA DO CIPÓ - MG



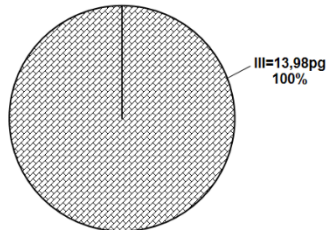
ANDORINHAS - MG



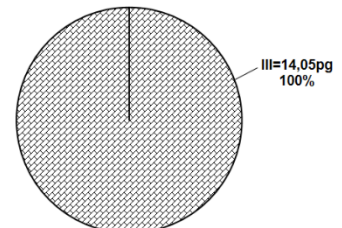
P. E. DO IBITIPOCA - MG



SÃO THOMÉ DAS LETRAS - MG



SERRA FINA - MG



*Continua na próxima página.

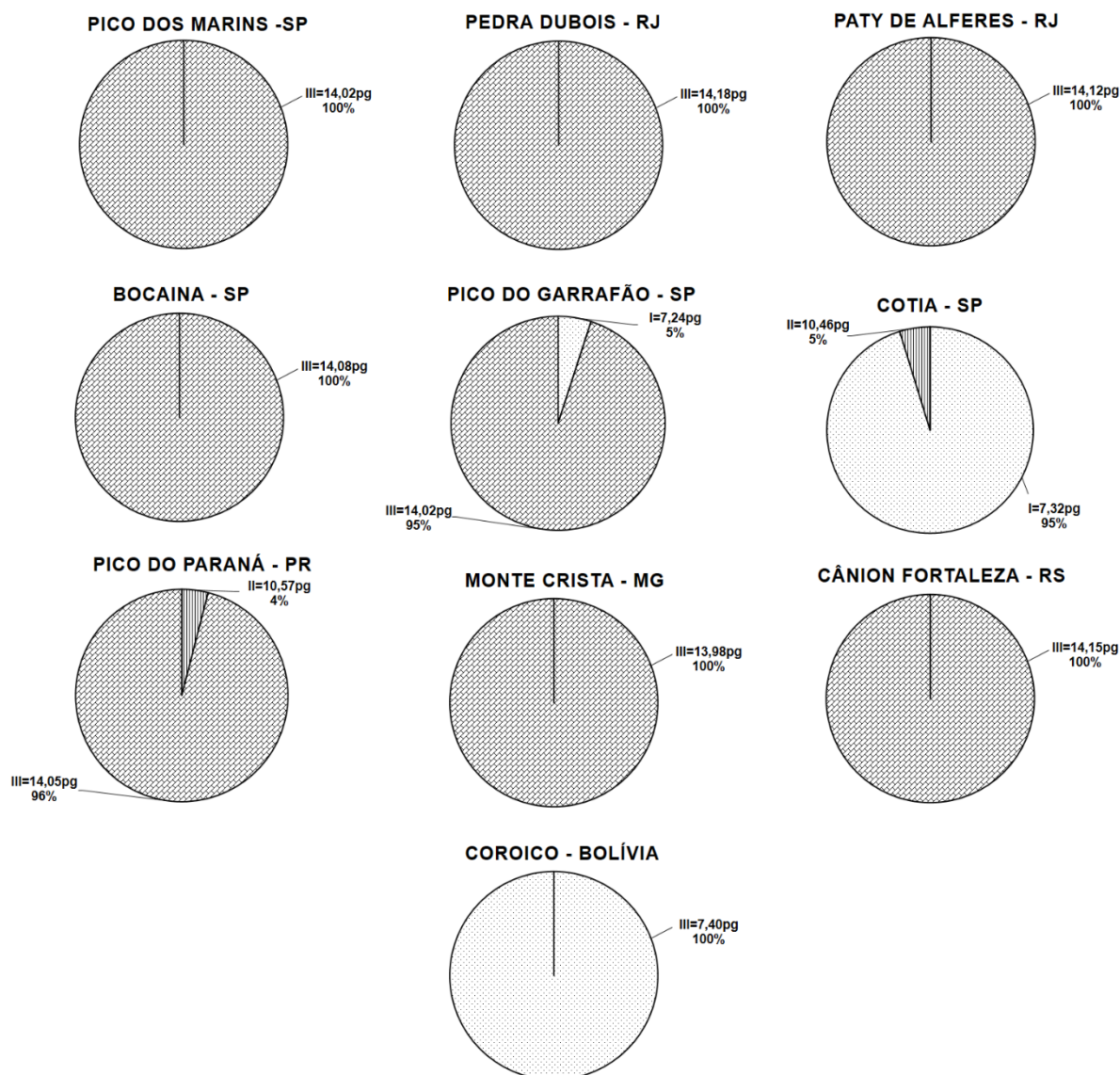


Figura 4 - Percentagem de ocorrência de cada uma das três quantidades de DNA observadas no complexo "*Zygopetalum maculatum*" em 22 populações. Há populações em que ocorre apenas um dos três grupos relacionados ao conteúdo 2C de DNA e populações que abrigam indivíduos de dois e até dos três grupos.

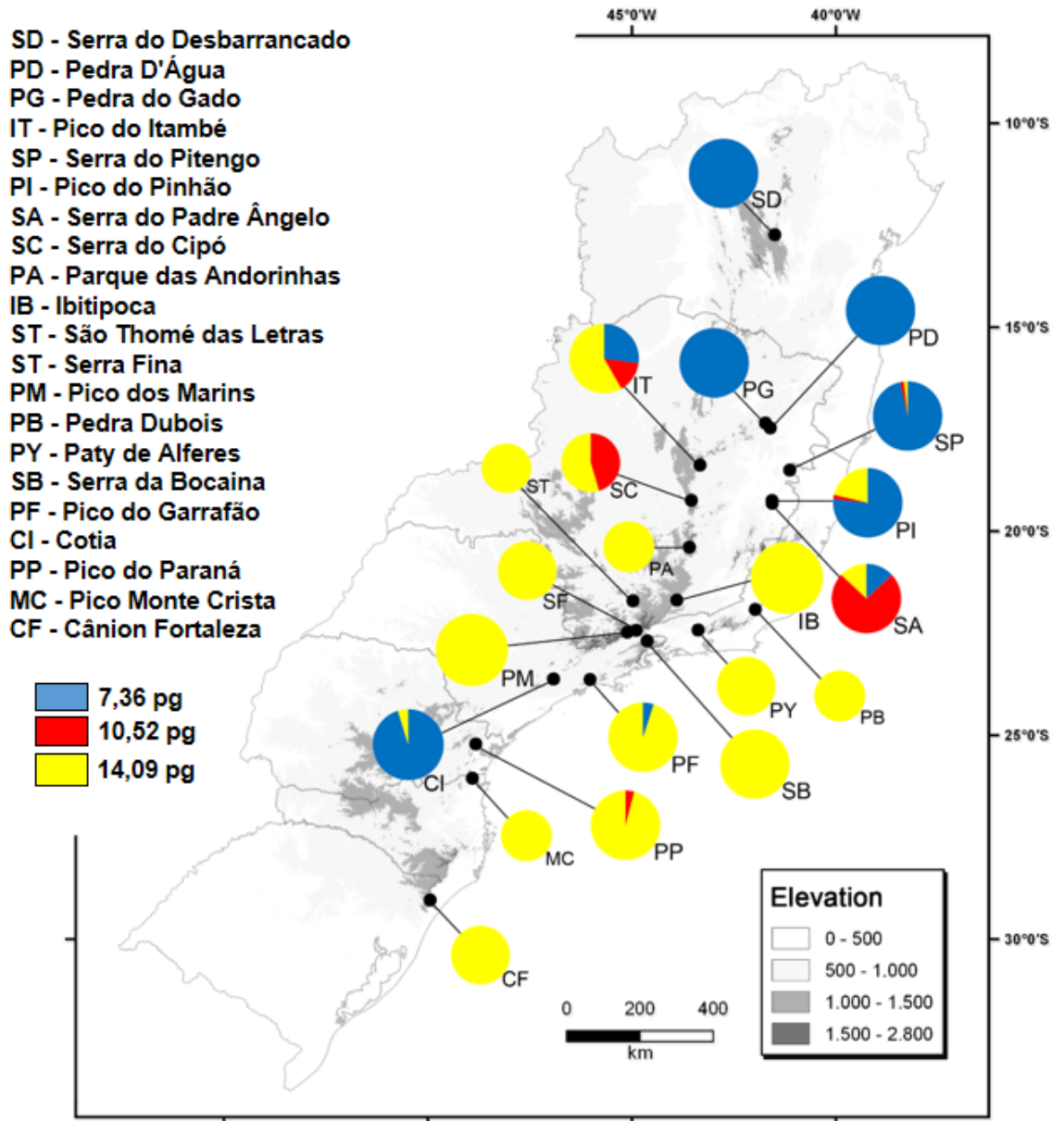


Figura 5 - Distribuição geográfica das populações do complexo "*Zygopetalum maculatum*" coletadas no Brasil com os respectivos tamanhos de genoma. As populações com maior quantidade de DNA ocorrem mais ao sul do país. A cor azul identifica $2C=7,36$; vermelho $2C=7,52$; amarelo $2C=14,09$ pg de DNA.

4.2 Número cromossômico e morfometria cromossômica

As técnicas empregadas para a caracterização do número cromossômico em "*Zygopetalum maculatum*" permitiram corroborar os três grupos indicados pela análise da quantidade de DNA: $2n=48$ (grupo I), $2n=72$ (grupo II) e $2n=96$ cromossomos (grupo III) (Tabela 4; Figuras 6 e 7).

Tabela 4 - Números cromossômicos representativos de 12 populações do complexo "*Zygopetalum maculatum*" avaliadas por análise mitótica

| Origem | Número de Indivíduos | 2n |
|---------------------------------|----------------------|----|
| Andorinhas/MG | 3 | 96 |
| Bocaina/SP | 7 | 96 |
| Serra do Cipó/MG | 3 | 72 |
| | 3 | 96 |
| Coroico/Bolívia/NOR | 2 | 48 |
| Finas/MG | 10 | 96 |
| São Thomé das Letras/MG | 3 | 96 |
| Pico do Garrafão/SP | 1 | 48 |
| | 7 | 96 |
| Pico do Itambé/MG | 6 | 48 |
| | 2 | 72 |
| | 1 | 96 |
| Pico dos Marins/SP | 11 | 96 |
| Pico Paraná/PR | 3 | 96 |
| Parque Estadual do Ibitipoca/MG | 6 | 96 |
| Cotia/MG | 8 | 48 |
| | 1 | 72 |
| Total de indivíduos | 77 | |

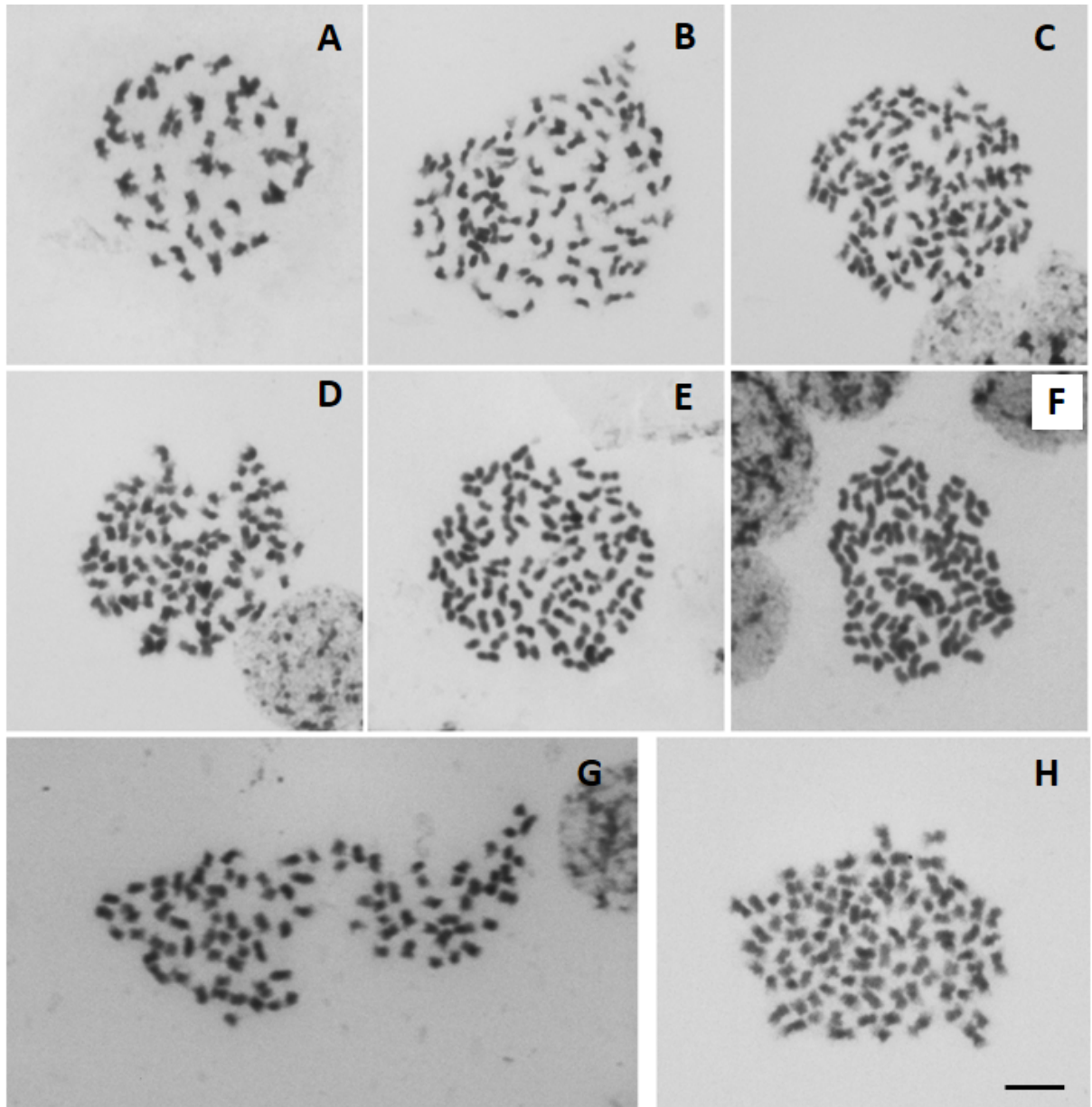


Figura 6 - Metáfases mitóticas representando populações do complexo "*Zygotetrum maculatum*" onde foi identificado apenas um número cromossômico (A) indivíduo Bol 2 da população Coroico, com $2n=48$ cromossomos; (B) indivíduo ZM250 da população Andorinhas, com $2n=96$; (C) indivíduo ZM016 da população Finas, com $2n=96$; (D) indivíduo ZM215 da população São Thomé das Letras, com $2n=96$; (E) indivíduo S20 da população P. E. do Ibitipoca, com $2n=96$; (F) indivíduo ZM059 da população Bocaina, com $2n=96$; (G) indivíduo ZM085 da população Pico dos Marins, com $2n=96$; (H) indivíduo ZM128 da população Pico do Paraná, com $2n=96$. Barra= $10\mu\text{m}$.

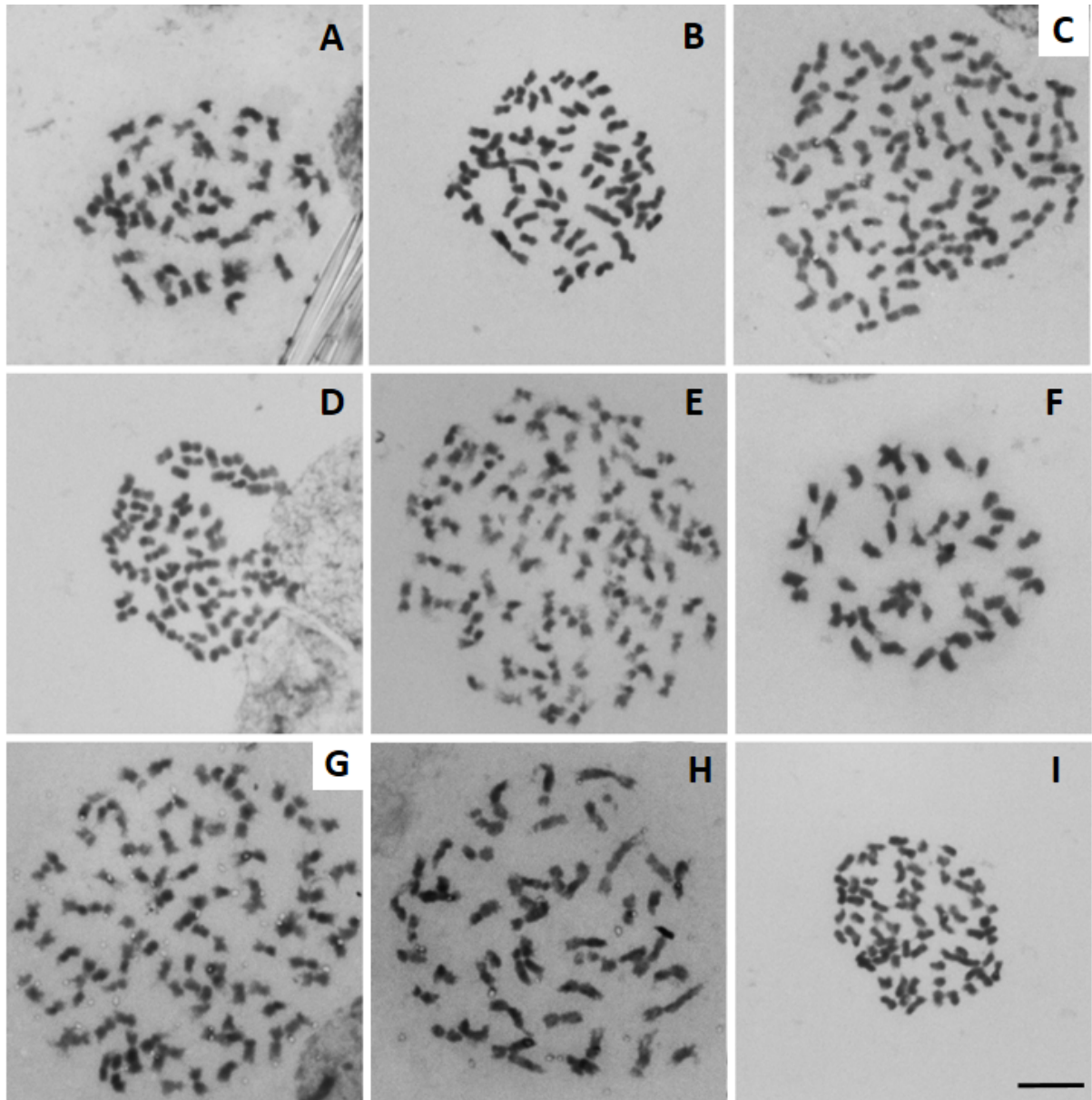


Figura 7 - Metáfases mitóticas representando populações do complexo "*Zygotetrum maculatum*" onde foram identificados dois ou três números cromossômico. (A, B e C) indivíduos da população Pico do Itambé; (A) ZM172 com $2n=48$ cromossomos; (B) ZM201 com $2n=72$; (C) ZM186 com $2n=96$. (D e E) indivíduos da população Serra do Cipó; (D) ZM115 com $2n=72$; (E) ZM086 com $2n=96$. (F e G) indivíduos da população Pico do Garrafão; (F) ZM025 com $2n=48$; (G) ZM130 com $2n=96$. (H e I) indivíduos da população Cotia; (H) ZM008 com 48; (I) ZM002 com $2n=72$ cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$.

A morfometria cromossômica realizada para os três diferentes citótipos mostrou cariótipos simétricos com a maioria dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

O cariótipo com $2n=48$ cromossomos, apresentou 20 cromossomos metacêntricos e 4 submetacêntricos (Tabela 5, Figura 8), com fórmula cariotípica $FC=20m+4sm$. O cariótipo mostrou-se bastante simétrico: $A=0,16$ e heterogeneidade cromossômica $A_i=3,89$.

Tabela 5 - Dados morfométricos médios representativos do citótipo com $2n=48$ cromossomos do complexo "*Zygopetalum maculatum*"

| Crom. | bc | bl | Comp. total | r | ic | Classificação |
|-------|------|------|-------------|------|-------|---------------|
| 1 | 2,94 | 3,81 | 6,75 | 1,30 | 43,56 | m |
| 2 | 2,81 | 3,02 | 5,83 | 1,07 | 48,20 | m |
| 3 | 2,68 | 3,03 | 5,71 | 1,13 | 46,94 | m |
| 4 | 2,65 | 2,77 | 5,42 | 1,05 | 48,89 | m |
| 5 | 2,62 | 3,40 | 6,02 | 1,30 | 43,52 | m |
| 6 | 2,56 | 2,73 | 5,29 | 1,07 | 48,39 | m |
| 7 | 2,46 | 3,20 | 5,66 | 1,30 | 43,46 | m |
| 8 | 2,45 | 2,92 | 5,37 | 1,19 | 45,62 | m |
| 9 | 2,39 | 2,76 | 5,15 | 1,15 | 46,41 | m |
| 10 | 2,34 | 3,95 | 6,29 | 1,69 | 37,20 | m |
| 11 | 2,22 | 3,07 | 5,29 | 1,38 | 41,97 | m |
| 12 | 2,01 | 2,32 | 4,33 | 1,15 | 46,42 | m |
| 13 | 2,00 | 3,26 | 5,26 | 1,63 | 38,02 | m |
| 14 | 1,98 | 3,56 | 5,54 | 1,80 | 35,74 | sm |
| 15 | 1,95 | 2,21 | 4,16 | 1,13 | 46,88 | m |
| 16 | 1,79 | 3,23 | 5,02 | 1,80 | 35,66 | sm |
| 17 | 1,73 | 2,24 | 3,97 | 1,13 | 43,58 | m |
| 18 | 1,67 | 1,74 | 3,41 | 1,04 | 48,97 | m |
| 19 | 1,67 | 2,39 | 4,06 | 1,43 | 41,13 | m |
| 20 | 1,63 | 2,60 | 4,23 | 1,60 | 38,53 | m |
| 21 | 1,62 | 2,59 | 4,21 | 1,60 | 38,48 | m |
| 22 | 1,43 | 2,24 | 3,67 | 1,57 | 38,96 | m |
| 23 | 1,42 | 4,01 | 5,43 | 2,82 | 26,15 | sm |
| 24 | 0,80 | 2,13 | 2,93 | 2,66 | 27,30 | sm |

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico.

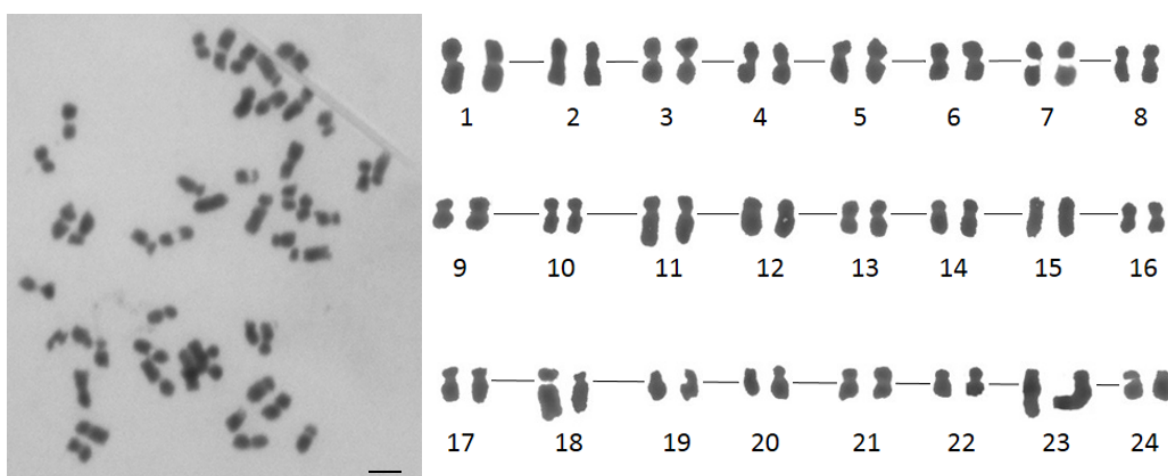


Figura 8 - Metáfase mitótica e cariograma representativos do citótipo com $2n=48$ cromossomos do complexo "*Zygopetalum maculatum*". Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$, sendo $2n=2x=48$ cromossomos. Barra=5 μ m.

O cariótipo com $2n=72$ cromossomos apresentou 20 cromossomos metacêntricos, 3 submetacêntricos e 1 telocêntrico (Tabela 6, Figura 9), $FC=20m+3sm+1t$. De maneira semelhante ao conjunto com $2n=48$ cromossomos, o cariótipo também foi considerado simétrico: $A=0,17$ e $A_i=4,02$.

Tabela 6 - Dados morfométricos médios representativos do citótipo com $2n=72$ cromossomos do complexo "*Zygopetalum maculatum*"

| Crom. | bc | bl | Comp. total | r | ic | Classificação |
|-------|------|------|-------------|-------|-------|---------------|
| 1 | 2,32 | 2,67 | 4,99 | 1,15 | 46,49 | m |
| 2 | 2,29 | 2,52 | 4,81 | 1,10 | 47,61 | m |
| 3 | 2,06 | 2,95 | 5,01 | 1,43 | 41,12 | m |
| 4 | 1,91 | 2,52 | 4,43 | 1,32 | 43,12 | m |
| 5 | 1,88 | 2,16 | 4,04 | 1,15 | 46,53 | m |
| 6 | 1,85 | 2,36 | 4,21 | 1,28 | 43,94 | m |
| 7 | 1,83 | 1,92 | 3,75 | 1,05 | 48,80 | m |
| 8 | 1,82 | 2,86 | 4,68 | 1,57 | 38,89 | m |
| 9 | 1,80 | 2,06 | 3,86 | 1,14 | 46,63 | m |
| 10 | 1,79 | 3,06 | 4,85 | 1,71 | 36,91 | sm |
| 11 | 1,73 | 2,34 | 4,07 | 1,35 | 42,51 | m |
| 12 | 1,69 | 2,43 | 4,12 | 1,44 | 41,02 | m |
| 13 | 1,68 | 2,17 | 3,85 | 1,29 | 43,64 | m |
| 14 | 1,64 | 1,82 | 3,46 | 1,11 | 47,40 | m |
| 15 | 1,62 | 1,74 | 3,36 | 1,07 | 48,21 | m |
| 16 | 1,57 | 1,82 | 3,39 | 1,16 | 46,31 | m |
| 17 | 1,49 | 1,79 | 3,28 | 1,20 | 45,43 | m |
| 18 | 1,34 | 1,83 | 3,17 | 1,37 | 42,27 | m |
| 19 | 1,31 | 1,80 | 3,11 | 1,37 | 42,12 | m |
| 20 | 1,26 | 1,81 | 3,07 | 1,44 | 41,04 | m |
| 21 | 1,22 | 2,09 | 3,31 | 1,71 | 36,86 | sm |
| 22 | 1,21 | 1,47 | 2,68 | 1,21 | 45,15 | m |
| 23 | 1,11 | 2,00 | 3,11 | 1,80 | 35,69 | sm |
| 24 | 0,03 | 2,75 | 2,78 | 91,67 | 1,08 | t |

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; t=telocêntrico.

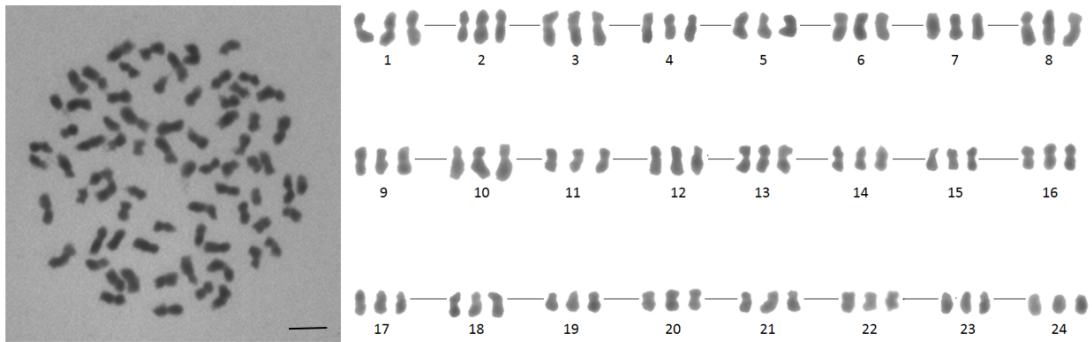


Figura 9 - Metáfase mitótica e cariograma representativos do citótipo com $2n=72$ cromossomos do complexo "*Zygopetalum maculatum*". Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$, sendo $2n=3x=72$ cromossomos. Barra=5 μm .

O indivíduo com $2n=96$ cromossomos, apresentou 18 cromossomos metacêntricos, 5 submetacêntricos e 1 telocêntrico (Tabela 7, Figura 10). De maneira semelhante ao demais ($2n=48$ e 72), o cariótipo deste também foi considerado simétrico: $A=0,19$ e $A_i=4,05$.

Tabela 7 - Dados morfométricos médios representativos do citótipo com $2n=96$ cromossomos do complexo "*Zygopetalum maculatum*"

| Crom. | bc | bl | Comp. total | r | ic | Classificação |
|-------|------|------|-------------|--------|-------|---------------|
| 1 | 2,99 | 3,81 | 6,80 | 1,27 | 43,97 | m |
| 2 | 2,96 | 3,37 | 6,33 | 1,14 | 46,76 | m |
| 3 | 2,59 | 2,66 | 5,25 | 1,03 | 49,33 | m |
| 4 | 2,44 | 3,88 | 6,32 | 1,59 | 38,61 | m |
| 5 | 2,41 | 2,61 | 5,02 | 1,08 | 48,01 | m |
| 6 | 2,32 | 2,75 | 5,07 | 1,19 | 45,76 | m |
| 7 | 2,31 | 3,31 | 5,62 | 1,43 | 41,10 | m |
| 8 | 2,23 | 2,80 | 5,03 | 1,26 | 44,33 | m |
| 9 | 2,26 | 2,55 | 4,81 | 1,13 | 46,99 | m |
| 10 | 2,17 | 2,96 | 5,13 | 1,36 | 42,30 | m |
| 11 | 1,95 | 2,53 | 4,48 | 1,30 | 43,53 | m |
| 12 | 1,94 | 2,19 | 4,13 | 1,13 | 46,97 | m |
| 13 | 1,81 | 1,92 | 3,73 | 1,06 | 48,53 | m |
| 14 | 1,75 | 4,47 | 6,22 | 2,55 | 28,14 | sm |
| 15 | 1,74 | 2,23 | 3,97 | 1,28 | 43,83 | m |
| 16 | 1,68 | 2,83 | 4,51 | 1,68 | 37,25 | m |
| 17 | 1,54 | 2,55 | 4,09 | 1,66 | 37,65 | m |
| 18 | 1,37 | 1,71 | 3,08 | 1,25 | 44,48 | m |
| 19 | 1,22 | 1,61 | 2,83 | 1,32 | 43,11 | m |
| 20 | 0,97 | 1,87 | 2,84 | 1,93 | 34,15 | sm |
| 21 | 0,96 | 2,15 | 3,11 | 2,24 | 30,87 | sm |
| 22 | 0,95 | 1,64 | 2,59 | 1,73 | 36,68 | sm |
| 23 | 0,90 | 2,66 | 3,56 | 2,96 | 25,28 | sm |
| 24 | 0,01 | 2,92 | 2,93 | 292,00 | 0,34 | t |

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; t=telocêntrico.

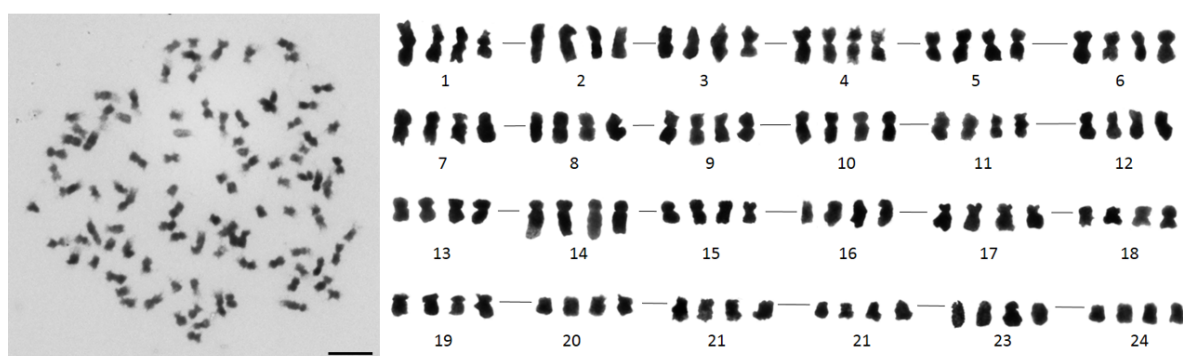


Figura 10 - Metáfase mitótica e cariograma representativos do citótipo com $2n=96$ cromossomos do complexo "*Zygopetalum maculatum*". Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$, sendo $2n=4x=96$ cromossomos. Barra=10 μ m.

4.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para os indivíduos de 48 cromossomos a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda para genes ribossomais 5S permitiu a identificação de dois sítios subterminais próximos à região centromérica e dois sítios terminais localizados no braço curto dos cromossomos. Para a região ribossomal 45S também foram identificados quatro sítios positivos localizados em dois pares de homólogos, todos em posição terminal dos braços curtos (Figura 11).

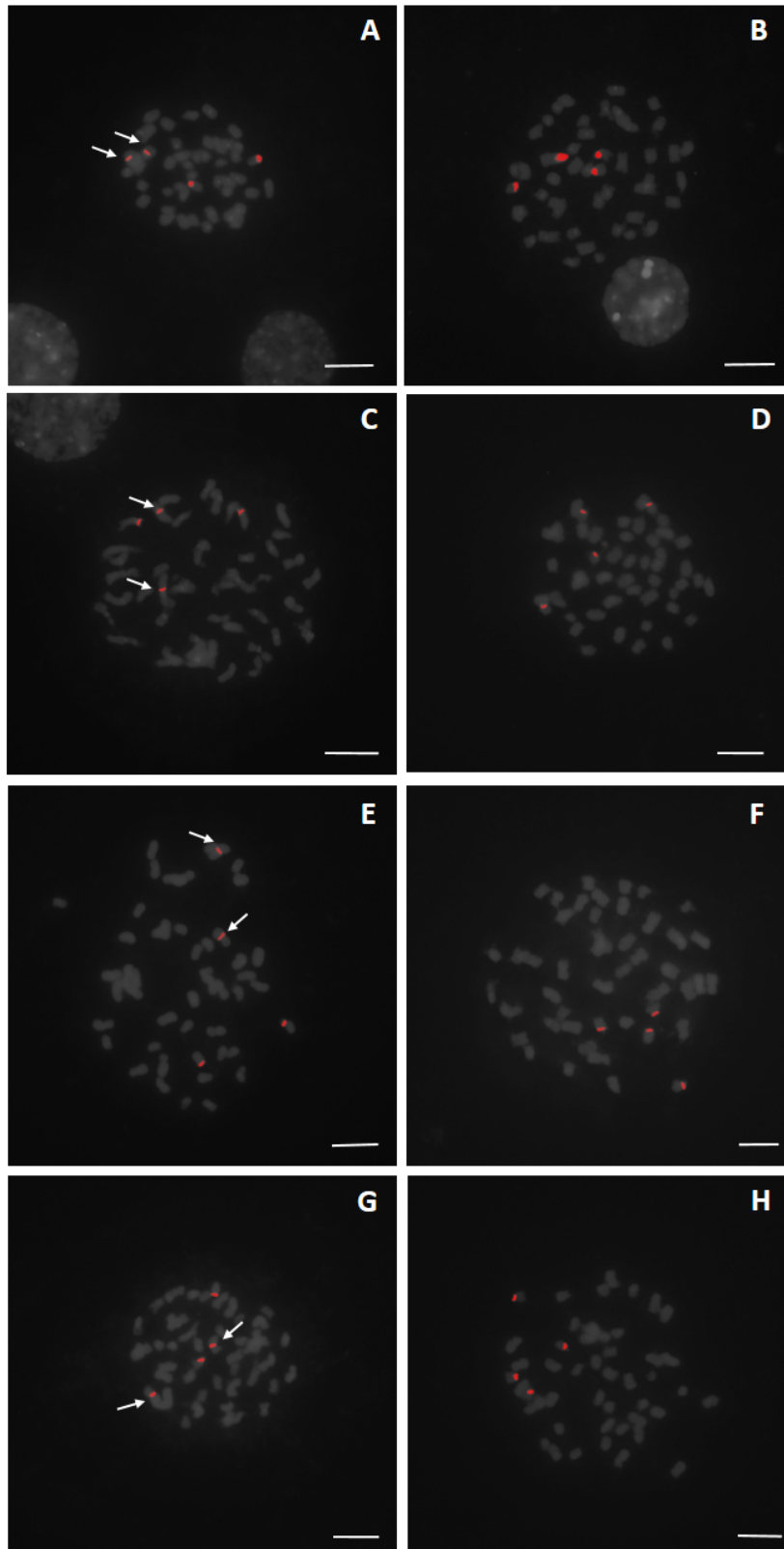


Figura 11 – Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A, C, E, G) e 45S (B, D, F, H) em cariótipo com $2n=48$ de *Zygotetium maculatum*. (A e B) Indivíduo Bol 3 da população Corico; (C e D) Indivíduo ZM172 da população Pico do Itambé; (E e F) Indivíduo ZM025 da população Pico do Garrafão; (G e H) Indivíduo ZM018 da população Cotia. Um par de genes ribossomais 5S ocorre em posição subterminal (setas) e outro par em posição terminal nos cromossomos. Os sítios de DNAr 45S são terminais. Barra=10 μ m.

Os indivíduos com $2n=72$ cromossomos apresentaram seis sítios de DNAr 5S, sendo três subterminais e três terminais. Observou-se também seis marcas de DNAr 45S (Figura 12).

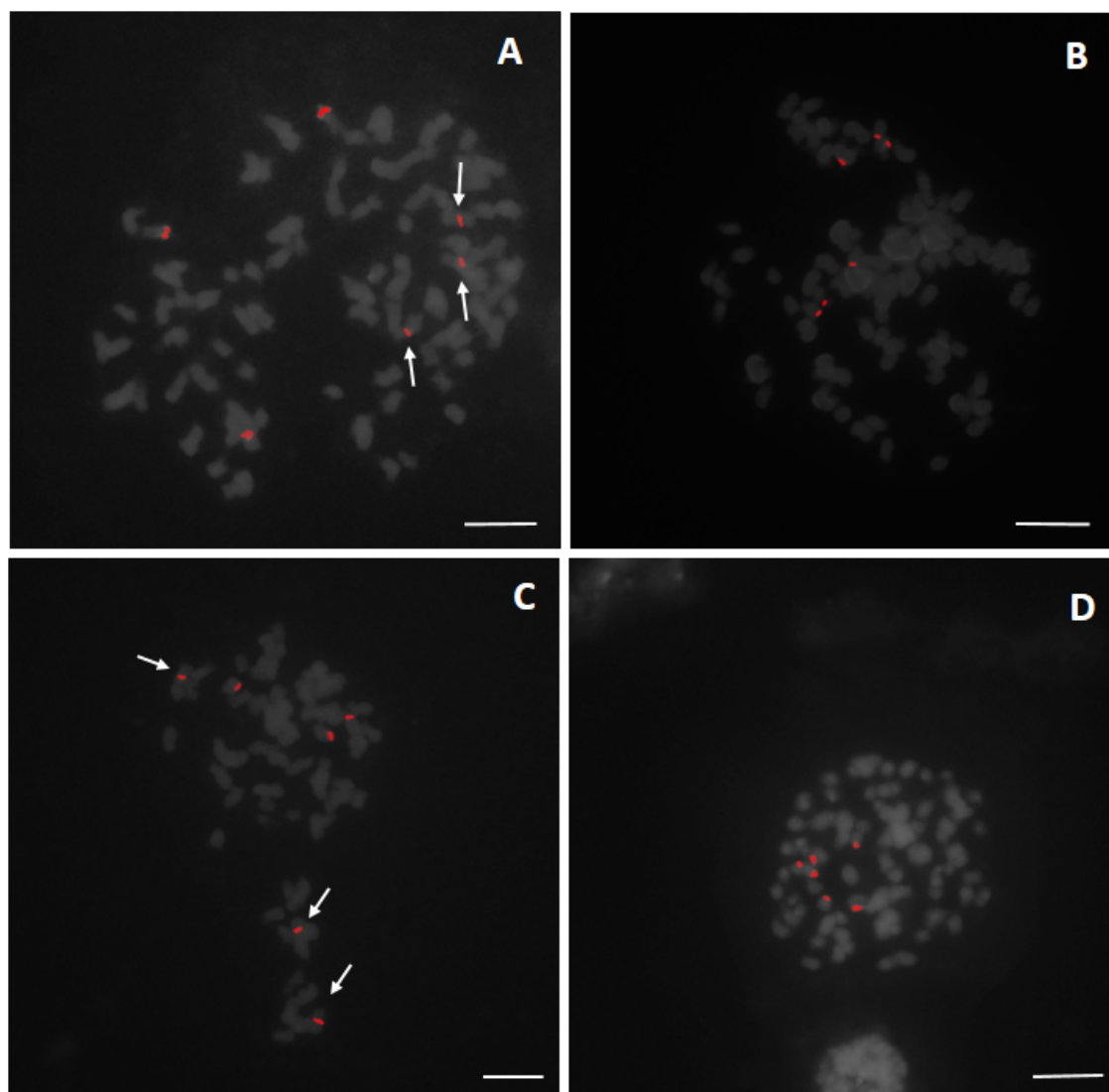


Figura 12 – Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A e C) e 45S (B e D) em cariótipo com $2n=72$ de '*Zygotetium maculatum*'. (A e B) Indivíduo ZM198 da população Pico do Itambé; (C e D) Indivíduo ZM113 da população Serra do Cipó. Três das seis marcas de genes ribossomais 5s ocorrem em posição subterminal (setas) e as outras três marcas em posição terminal nos cromossomos. Os seis sítios de DNAr 45s são terminais. Barra= $10\mu\text{m}$.

Nos indivíduos com $2n=96$ cromossomos foram encontrados oito cromossomos com regiões de genes ribossomais 5S, quatro sítios em posição subterminal e outros quatro em região terminal. Com relação aos genes ribossomais 45S, este citótipo mostrou oito marcas positivas e em posição terminal no braço curto dos cromossomos (Figuras 13 e 14).

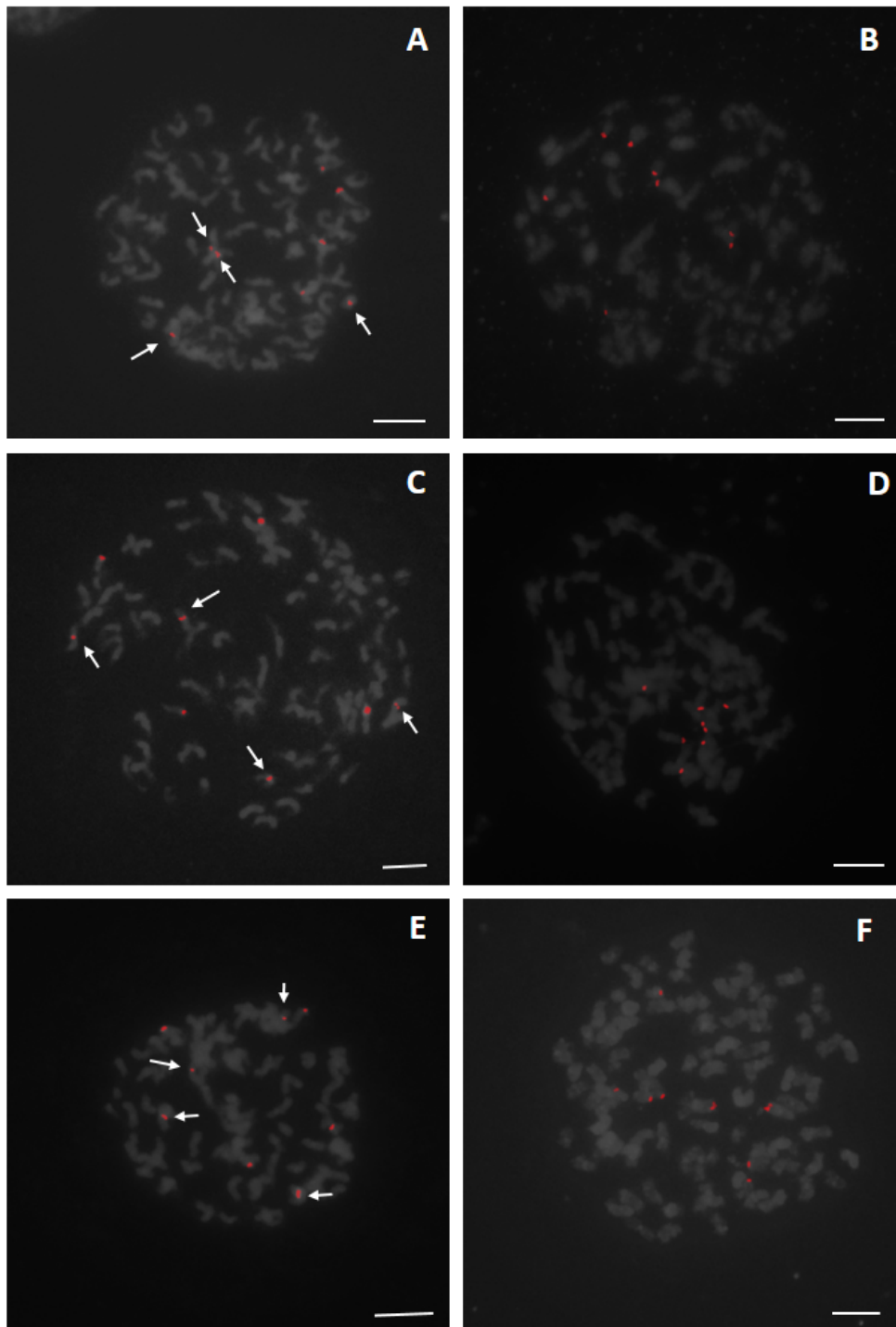


Figura 13 – Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A, C e E) e 45S (B, D e F) em cariótipo com $2n=96$ de '*Zygopetalum maculatum*'. (A e B) Indivíduo ZM012 da população Finas; (C e D) Indivíduo S27 da população Parque Estadual do Ibitipoca; (E e F) Indivíduo ZM040 da população Bocaina. Quatro das oito marcas de genes ribossomais 5S ocorrem em posição subterminal (setas) e as outras quatro marcas em posição terminal nos cromossomos. Os oito sítios de DNAr 45S são terminais. Barra = $10\mu\text{m}$.

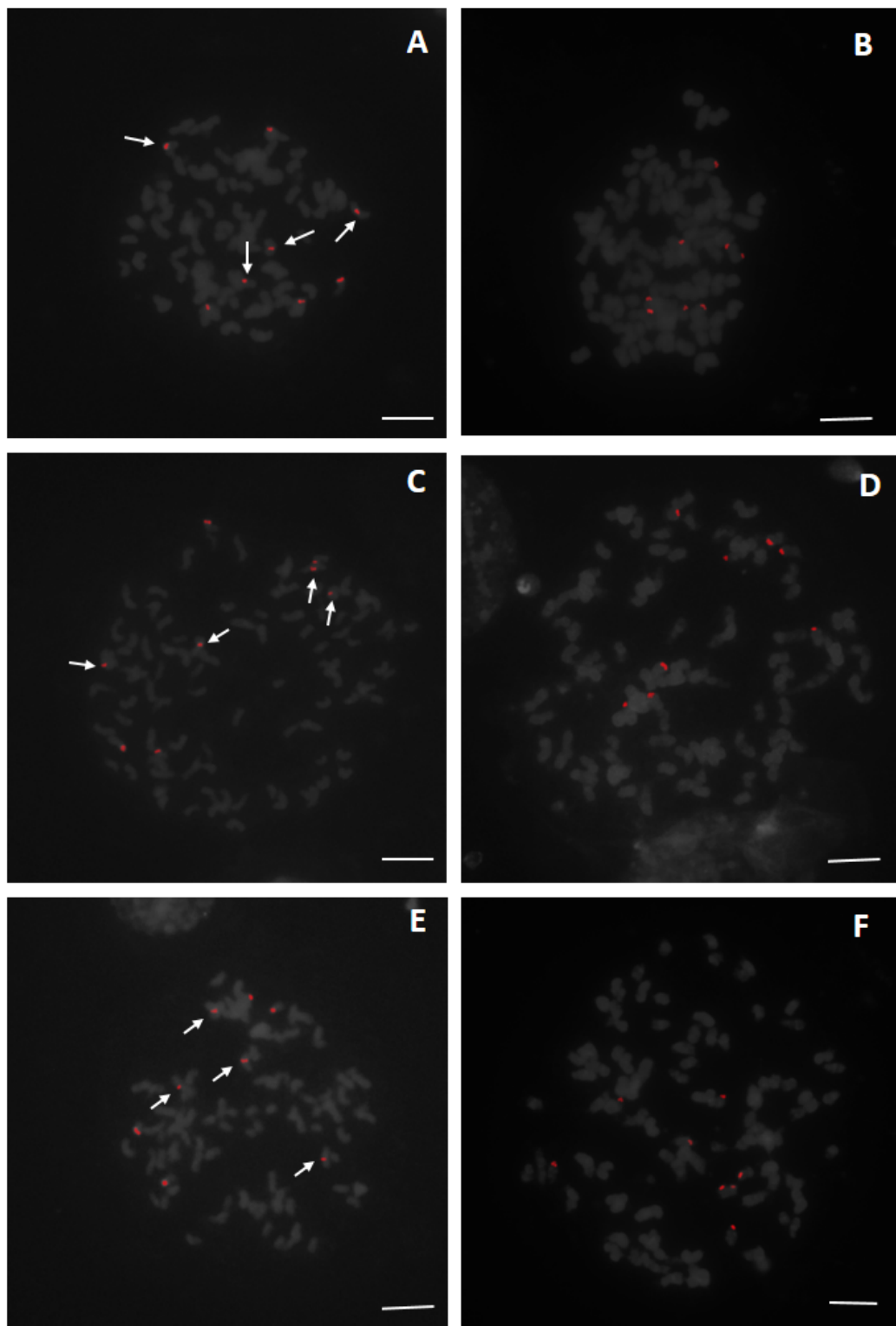


Figura 14 – Hibridização *in situ* fluorescente com marcadores ribossomais 5S (A, C e E) e 45S (B, D e F) em cariótipo com $2n=96$ de '*Zygotetium maculatum*'. (A e B) Indivíduo ZM186 da população Pico do Itambê; (C e D) Indivíduo ZM078 da população Serra do Cipó; (E e F) Indivíduo ZM144 da população Pico do Garrafão. Quatro das oito marcas de genes ribossomais 5S ocorrem em posição subterminal (setas) e as outras quatro marcas em posição terminal nos cromossomos. Os oito sítios de DNAr 45S são terminais. Barra = $10\mu\text{m}$.

Os sítios de DNAr e a morfologia dos cromossomos para os três citótipos foram representados em idiogramas (Figura 15).

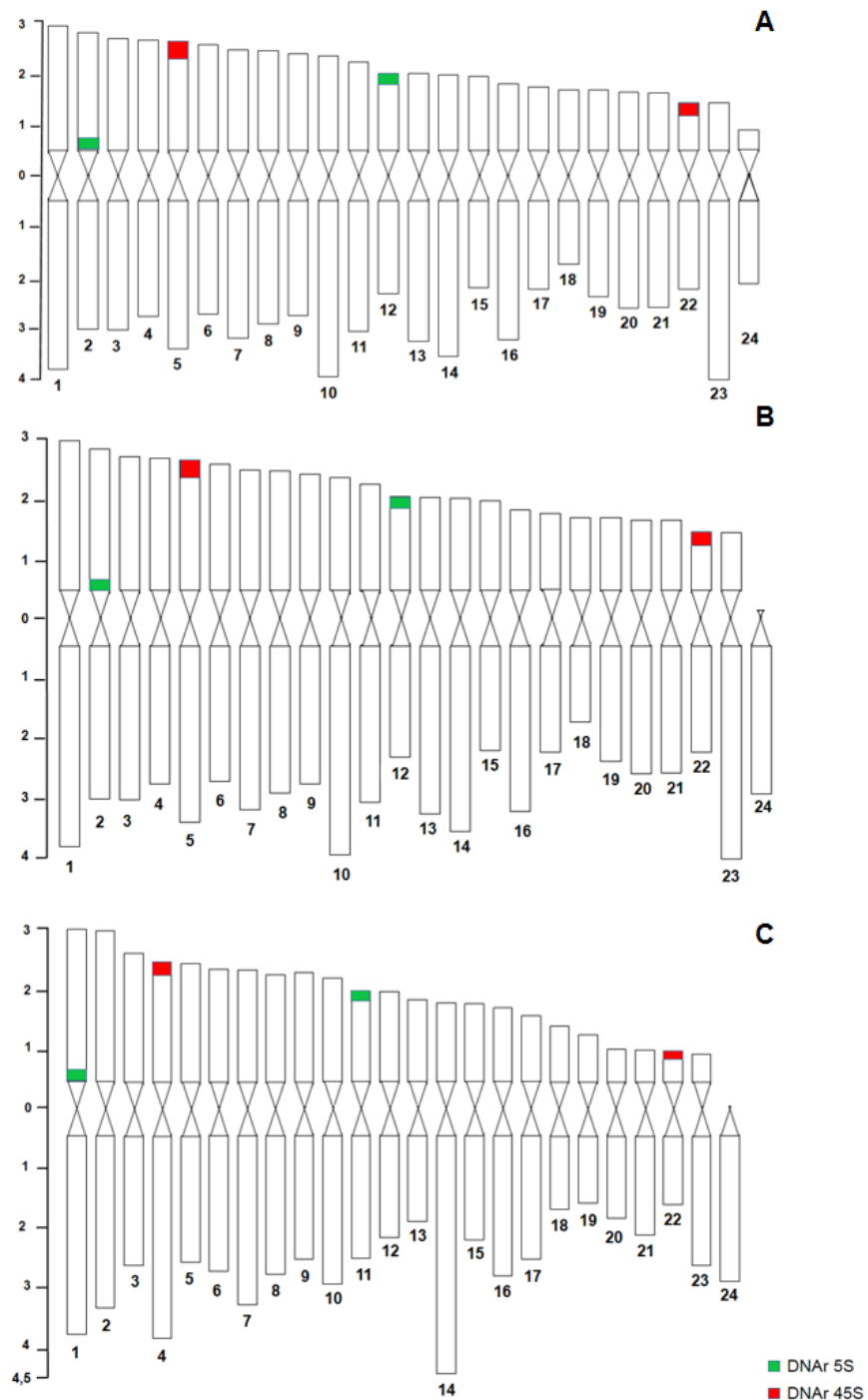


Figura 15 – Idiogramas representativos do cariótipo de três citótipos de “*Zygopetalum maculatum*”. (A) $2n=48$ cromossomos, onde cada cromossomo representa um par de cromossomos. (B) $2n=72$ cromossomos, onde cada cromossomo representa um trio de cromossomos. (C) $2n=96$ cromossomos, onde cada cromossomo representa um quarteto de cromossomos. Para pareamento dos cromossomos foi considerado $x_2=24$.

Tomadas em conjunto, as quantidades de DNA e os dados cromossômicos (Figura 16), nota-se que os valores 2C aumentam proporcionalmente ao número cromossômico, observando-se uma pequena redução nestes valores em relação às quantidades esperadas tomando-se como referência indivíduos com $2n=48$ cromossomos. Além disso, para os sítios cromossômicos 5S e 45S, o número de marcas esperado é exatamente igual ao observado, tendo como base os indivíduos com $2n=48$ cromossomos.

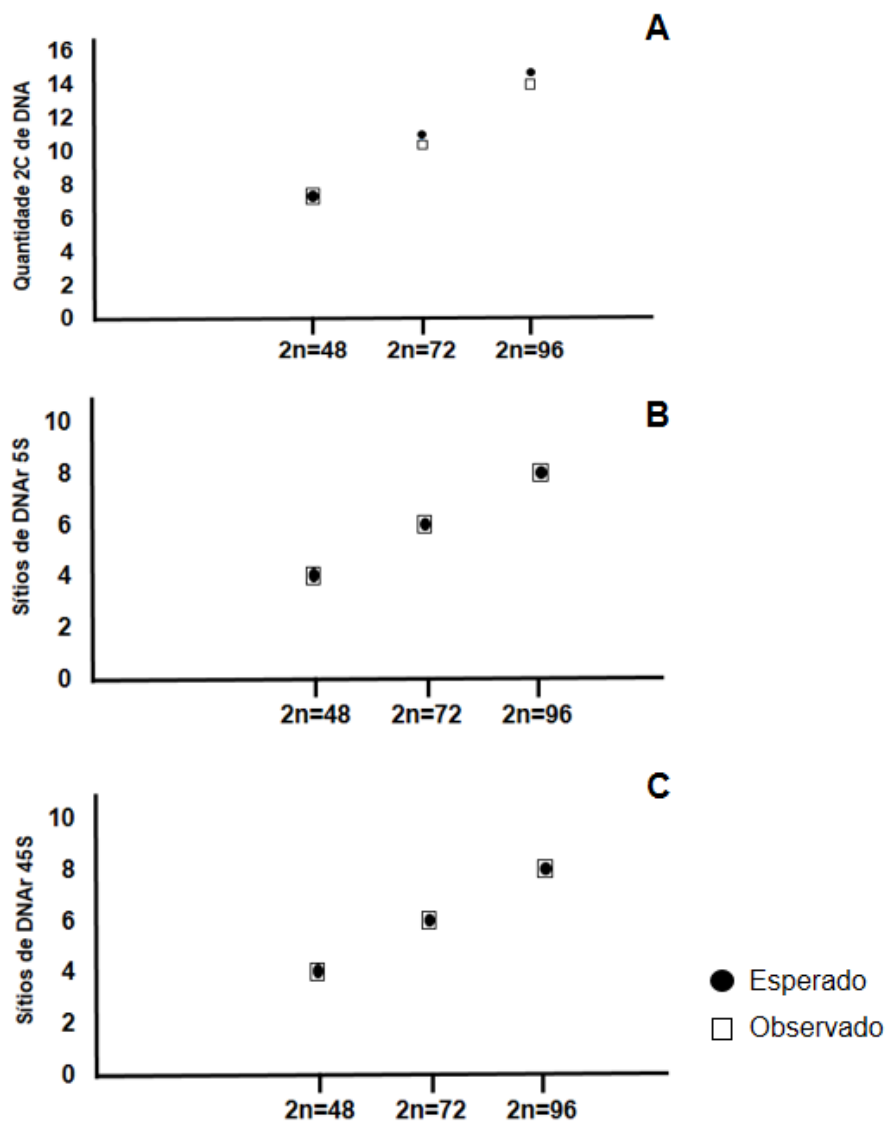


Figura 16 - Síntese das estimativas de quantidade de DNA (2C) e dados cromossômicos para três citótipos de "*Zygopetalum maculatum*". (A) quantidade 2C de DNA nuclear (B) Número de sítios positivos para DNAr 5S. (C) Número de sítios positivos para DNAr 45S. Círculo preto = dados esperados, quadrado branco = dados observados.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram variação genômica entre os indivíduos do complexo "*Zygopetalum maculatum*".

A investigação de quantidade de DNA em orquídeas ainda não possui um protocolo padrão para análise por citometria de fluxo, sendo que o tipo de órgão/tecido analisado é bastante variável, dependendo principalmente da disponibilidade de material. Existem trabalhos com os mais diversos tipos de tecido tais como folha (JONES et al., 1998; RUPP et al., 2010; LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011; ZONNEVELD e POLLOCK, 2012; NEMORIN et al., 2013; MARQUES et al., 2014; SILVA et al., 2014), flor (LEE et al., 2007; CHEN et al., 2013; SILVA et al., 2014), botão floral (LEE et al., 2007), meristema radicular (RUPP et al., 2010; ZONNEVELD e POLLOCK, 2012) e endosperma (NEMORIN et al., 2013). Em muitos casos, a variação no tipo de tecido utilizado permite detectar ocorrência de endopoliploidia na família. Lin et al., (2001) analisaram tecidos de folha, raiz e flor por citometria de fluxo em plantas de *Doritis* e *Phalaenopsis* e encontraram núcleos com até 16C. Yang e Loh (2004) observaram que o nível de ploidia em órgãos como flor, folha e raiz de *Spathoglottis plicata* Blume varia conforme o tipo de tecido e o estágio de desenvolvimento de plantas mantidas em campo e *in vitro*. O trabalho sugere que quando a endopoliploidia está presente em plantas, o seu padrão normalmente está relacionado com as características fisiológicas e de desenvolvimento do tecido avaliado. Chen et al. (2011) em um estudo sobre variação de endopoliploidia em diversos tecidos de *Phalaenopsis aphrodite* Rchb.f, concluíram que a taxa de endoreduplicação tende a ser mais elevada em tecidos maduros e em plantas cultivadas em estufa. Neste trabalho, utilizou-se a folha, por ser o tecido de mais fácil acesso e conservação, além de ser o tipo mais utilizado em estudos sobre o tamanho de genoma em plantas. Foram analisadas amostras de folhas jovens e adultas, da região basal, mediana e apical das folhas e os histogramas de um mesmo indivíduo não mostraram diferença na posição dos picos obtidos pela citometria de fluxo em nenhum dos indivíduos, sugerindo que no tecido foliar destes *Zygopetalum* não ocorre endoreduplicação.

Para as estimativas da quantidade de DNA, o coeficiente de variação (CV=desvio padrão dividido pela média) dos picos G₀/G₁ foi em média 2,70%. Esse

parâmetro é considerado importante para a validação da metodologia por muitos autores, que consideram satisfatórios valores de CV menores que 5% (GALBRAITH et al., 2002; DOLEŽEL e BARTOS, 2005; PRAÇA-FONTES et al., 2011). De maneira mais tolerante, Doležel (1991) afirma que valores de CV de até 10% são adequados para análises citométricas em células vegetais. Logo, pode-se concluir que a coleta e o preparo das amostras neste trabalho foram apropriados, uma vez que não causaram danos significativos ao DNA nuclear das orquídeas.

Consensualmente o valor C de DNA é um caráter de significado biológico fundamental e o conhecimento da quantidade de DNA nuclear em um determinado grupo de organismos incrementa estudos em vários campos da ciência, como Biologia Molecular e Celular, Ecologia, Sistemática e Filogenia (BENNETT e LEITCH, 1995; KRON et al., 2007; ZOLDOS et al., 1998; LYSÁK et al., 1999; TORRELL e VALLES, 2001; MOSCONE et al., 2003). De fato, os padrões de variação do nível de ploidia entre e dentro de populações podem fornecer informações valiosas sobre os seus mecanismos evolutivos.

Apesar de haver comumente algum grau de variação cromossômica dentro de uma população, que pode, naturalmente, provocar alguns desvios no conteúdo de DNA entre os indivíduos (GREILHUBER, 1998) em algumas das populações aqui investigadas, as variações foram nitidamente causadas por diferenças que vão além de oscilações metodológicas ou fisiológicas em uma espécie. Enquanto algumas populações são uniformes quanto à quantidade de DNA de seus indivíduos, outras populações brasileiras de "*Zygopetalum maculatum*" são definitivamente mistas sob o ponto de vista da quantidade de DNA, com ocorrência em simpatria de indivíduos com diferentes níveis de ploidia. É o caso das localidades de Serra do Cipó – MG, Padre Ângelo – MG, Pico do Garrafão – SP, Pico do Itambé – MG, Pico do Pinhão – MG, Pico do Paraná – PR e Serra do Pitengo, MG (Figura 5), nas quais foi possível observar populações com dois e até três níveis de ploidia.

A análise dos dados obtidos por citometria de fluxo indicou a formação de três grupos de quantidade de DNA (7,36pg; 10,52pg e 14,09pg). O valor médio 2C do grupo I foi 29,97% menor do que o do grupo II e 48,73% menor do que o grupo III. Com base nestes valores, é possível notar uma relação no conteúdo de DNA nuclear desses grupos de orquídeas. Ao estudar a evolução dos genomas a partir de uma

revisão na quantidade de DNA (1C) das angiospermas, Soltis et al. (2003) identificaram uma nítida tendência de aumento no tamanho do genoma das angiospermas incluindo as monocotiledôneas, isso porque o tamanho do genoma ancestral das angiospermas é considerado “muito pequeno” ($1C \leq 1,4$ pg). Adicionalmente, Soltis et al. (2003) observaram que genomas “muito grandes” ocorrem em clados que ocupam posições derivadas dentro das monocotiledôneas e na ordem Santalales. Sabendo que em plantas é comum o aumento do genoma a partir de eventos de duplicação do genoma (SOLTIS et al., 2009; JIAO et al., 2011; WENDEL et al., 2016), o padrão de aumento da quantidade de DNA registrado neste estudo, sugere a ocorrência de eventos de poliploidização, podendo ser os indivíduos pertencentes aos grupos II e III mais derivados quando comparados com aqueles do grupo I, uma vez que eles possuem maior quantidade de DNA em seus núcleos e portanto, podem ter surgido a partir da poliploidização de genomas com quantidade inferior de DNA (como aqueles do grupo I). É conhecido que variações múltiplas na quantidade de DNA nuclear podem refletir diferentes níveis de ploidia dentro de uma espécie ou de populações (GALBRAITH et al., 2002; YANG e LOH, 2004, ver REIS et al., 2014), caracterizando dessa forma o que se chama de um complexo poliploide.

Por ser bastante informativa, de baixo custo e rápida, a técnica de citometria de fluxo tem sido empregada com sucesso no diagnóstico de variações genéticas intra e interespecíficas, possibilitando melhor entendimento dos mecanismos de plasticidade do DNA e auxiliando no esclarecimento do processo evolutivo de várias espécies, como, por exemplo, nos gêneros *Lippia* (Verbenaceae) (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014), *Pfaffia* (Amaranthaceae) (GOMES et al., 2014) e *Miscanthus* (Poaceae) (SHENG et al., 2016). No primeiro caso, os autores detectaram diferentes níveis de ploidia e indivíduos mixoploides relacionados aos variados citótipos ocorrentes em *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014). Já no segundo caso, foi possível inferir que as variações morfológicas observadas em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen não decorrem de variação no seu conteúdo de DNA, uma vez que todos os acessos, de diversas procedências do território brasileiro, mostraram-se iguais quanto a este parâmetro (GOMES et al., 2014). Por último, o trabalho de Sheng et al. (2016) mostrou que a quantidade de DNA de uma mesma espécie (*Miscanthus lutarioriparius* L.Liu ex S.L.Chen & Renvoize) variou conforme a

região de ocorrência, sendo as maiores quantidades de DNA associadas a zonas à montante do rio Yangtze, maior rio da Ásia.

Um ponto que merece destaque nos resultados é o fato de que, os valores médios de 2C obtidos através da citometria de fluxo não são precisamente múltiplos do valor 1C. Ao considerarmos os indivíduos com $2n=48$ (7,36pg), as quantidades de DNA múltiplas deveriam ser, respectivamente 11,04 e 14,72pg de DNA se eles fossem múltiplos exatos do citótipo com menor número cromossômico observado no presente trabalho. Em média eles são 5% menores do que o esperado. Naturalmente espera-se que haja uma relação de proporcionalidade entre nível de ploidia e tamanho do genoma nuclear e que, por consequência, um autopoliploide tenha uma quantidade de DNA que seja múltipla do seu diploide de origem. No caso de um aloploiploide, em geral, a expectativa é de que ele apresente um conteúdo de DNA equivalente à metade da soma da quantidade de DNA dos seus parentais. Todavia, não é esse o modelo observado na maioria dos casos de poliploidização em vegetais (FELDMAN e LEVY, 2002; LEITCH e BENNETT, 2004), uma vez que frequentemente observa-se uma redução nesse somatório nos indivíduos poliploides. Um possível motivo para a redução do valor total do genoma em poliploides quando comparado à soma dos valores 2C dos seus parentais - mesmo nos poliploides recém-formados, chamados neopoliploides - é a eliminação parcial de DNA repetitivo (SOLTIS e SOLTIS, 1995; LEITCH e BENNETT, 2004; CHEN, HÁ e SOLTIS, 2007; CHESTER, et al., 2010). Isso porque, a duplicação do genoma gera cópias extras dos genes e se ocorrer expressão excessiva de um produto gênico de uma ou mais dessas cópias, esta pode tornar-se inativa ou ser perdida (FREELING et al., 2012) após a formação do poliploide. O fenômeno descrito como “*genome downsizing*” (LEITCH e BENNETT, 2004) já foi reportado para vários gêneros: *Vigna* (PARIDA et al., 1990), *Orobancha* (WEISS-SCHNEEWEISS, GREILHUBER e SCHNEEWEISS, 2006), *Nicotiana* (RENNY-BYFIELD et al., 2011), *Hippeastrum*, (POGGIO et al., 2014), *Veronica* (MEUDT et al., 2015), *Mercadonia* (SOSA et al., 2016).

Alguns dos números cromossômicos observados aqui já haviam sido relatados para algumas espécies de *Zygopetalum*, contudo não há relatos para a maioria das espécies investigadas no presente trabalho. O número $2n=48$ foi descrito para *Z. maxillare*, *Z. discolor*, *Z. mackayi* e *Z. odoratissimum* (TANAKA e KAMEMOTO, 1984; DRESSLER, 1993; FÉLIX e GUERRA, 2000; DAVIÑA et al., 2009), enquanto $2n=96$

registrada em *Z. citrinum* (DRESSLER, 1993; FÉLIX e GUERRA, 2000). É importante ressaltar que de acordo com a Flora do Brasil (2017), *Z. discolor*, *Z. odoratissimum* e *Z. citrinum* não são espécies aceitas para o gênero *Zygopetalum*. Por outro lado, os dados de quantidade de DNA nuclear e as marcações para genes ribossomais 5S e 45S foram aqui descritos de maneira inédita para *Zygopetalum*. Também, pela primeira vez no gênero, foi observado o cariótipo $2n=72$ cromossomos.

Os dados cromossômicos encontrados no presente trabalho corroboraram a delimitação de três grupos evidenciados pelas estimativas de quantidade de DNA, pois foram identificados três números cromossômicos. Em vegetais, a ocorrência de citótipos diferentes, não necessariamente está relacionada a espécies distintas. A variação cromossômica pode surgir casualmente em populações naturais e ser preservada em um determinado grupo taxonômico ou espécie graças a vantagens adaptativas que o novo genoma oferece. Na família Rutaceae, por exemplo, descrições cariotípicas dentro do gênero *Boronia* reuniu dados sobre o tamanho e a morfologia dos cromossomos, destacando o número e a posição de genes ribossomais 5S e 45S. A associação de todas as informações sugeriram a ocorrência de rearranjos cromossômicos que influenciaram na evolução do gênero (SHAN, YAN e PLUMMER, 2003).

Diferentes vias podem ser responsáveis por gerar alterações ou rearranjos no genoma ou cariótipo em vegetais. No entanto, duas são de enorme relevância na evolução de inúmeras famílias de angiospermas, pois afetam o número de cromossomos: a poliploidia - multiplicação de um complemento cromossômico inteiro - e a disploidia - aumento ou redução do número de cromossomos em consequência de eventos de fusão e fissão cromossômica (GUERRA, 2008). Diante de tal premissa e no contexto deste trabalho, vale lembrar que a poliploidia, assim como a própria disploidia, são mecanismos anteriormente descritos para outros gêneros de orquídeas (FÉLIX, GUERRA 2000, 2005). Moraes et al. (2016) mostraram que rearranjos cromossômicos e disploidia estão envolvidos na evolução carotípica de orquídeas do gênero *Heterotaxis*. Em um estudo mais recente com Maxillariinae, reforçou-se o papel da disploidia, poliploidia e reestruturação cromossômica na diversificação de Orchidaceae (MORAES et al., 2017).

A poliploidização é com propriedade fator crucial na evolução das plantas vasculares (LEITCH e BENNETT, 1997; SOLTIS e SOLTIS 1999; SOLTIS E SOLTIS,

2009), estima-se que 100% das angiospermas derivem de ancestrais poliploides (CUI et al., 2006; SOLTIS et al., 2009; JIAO et al., 2011), e que boa parte delas tenham passado por vários ciclos de duplicação do genoma seguidos por diploidização e estabilização da microsporogênese ao longo de sua trajetória evolutiva, sendo portanto consideradas hoje como paleopoliploides (MA e GUSTAFSON, 2005). Dessa forma, é consenso que o surgimento de poliploides naturais incrementa a variabilidade genética e acelera processos de especiação vegetal (SOLTIS et al., 2007).

Uma consequência da poliploidização é a possibilidade de conflito entre os genomas dos parentais, podendo ocorrer mesmo em autopoliploides, nesse caso graças ao aumento do número de cópias e não pela incompatibilidade de genomas. Para superar tal adversidade, os poliploides buscam reorganizar seu material genético de modo a adequem-se às novas condições celulares (SOLTIS e SOLTIS, 2009). Rearranjos cromossômicos (deleções, inserções, duplicações e translocações) estão entre as alterações que buscam contornar tais alterações genômicas, sendo uma resposta rápida e altamente variável nas diferentes espécies (LEITCH e LEITCH, 2008). A longo prazo, a reestruturação cromossômica pode favorecer o isolamento reprodutivo contribuindo, portanto, para a especiação (RIESEBERG, 2001). Além de contribuir funcionando como barreira reprodutiva, a poliploidia ainda influencia no processo evolutivo de angiospermas ao agir sobre vias metabólicas e caracteres morfológicos podendo agregar vantagens adaptativas aos poliploides em relação aos parentais diploides (SOLTIS e SOLTIS, 1995; ADAMS e WENDEL, 2005; PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010).

O que torna a poliploidia um processo central e impulsionador da evolução de vegetais é o fato de plantas poliploides poderem apresentar alterações na sua composição genética que refletem em incremento da plasticidade fenotípica e/ou amplitude ecológica (LEVIN, 2002). Ao longo do processo evolutivo, vegetais poliploides destacam-se pela habilidade de colonizar ambientes inéditos ou inóspitos para a espécie, podendo ser pioneiros na ocupação de *habitats* nos quais seus antepassados diploides não obtiveram sucesso. Nesse contexto, destaca-se a família Orchidaceae que parece apresentar uma correlação positiva entre o conteúdo de DNA e o *habitat* ocupado. Geralmente maiores níveis de ploidia caracterizam espécies terrícolas ou rupícolas (LEITCH et al., 1994), como ilustrado por Félix e Guerra (2000) ao descreverem uma associação positiva entre ocorrência de poliploidia e a

exploração de *habitat* terrícola e rupícola no gênero *Oncidium*. No presente estudo, a maioria dos indivíduos apresentou $2C=14,09pg$ de DNA (Figuras 3 e 4), sendo que os valores mais baixos ($2C=7,36pg$ e $2C=10,52pg$) foram observados mais ao norte da área de ocorrência ou em áreas de floresta (Figura 5).

A extensa variabilidade observada no número de cromossomos das orquídeas e a pequena amostragem de espécies e gêneros estudados até o momento, tornam difícil determinar o número cromossômico básico (x) da família. Com o conhecimento disponível até agora, especula-se que $n=7$ represente o complemento haploide original de Orchidaceae. Nesse caso, os diferentes números cromossômicos observados na família, seriam portanto, consequência de aneuploidias naturais tanto ascendentes quanto descendentes (FÉLIX e GUERRA 2000) e múltiplos eventos de duplicação do genoma.

Considerando que o número $n=7$, originado de $x_1=7$, é pouco frequente na família nos dias atuais, supõe-se que sucessivos ciclos de poliploidia teriam gerado linhagens tetraploides ($n=14$), hexaploides ($n=21$) e octaploides ($n=28$), dando origem a gêneros exclusivamente poliploides de orquídeas (FÉLIX e GUERRA 2000). Diante desta premissa, e dos elevados valores $2n$ observados para *Zygopetalum* (48, 72 e 96), a hipótese de que este seja um gênero poliploide ganha sustentação, bem como a possibilidade de "*Z. maculatum*" ser um complexo poliploide. Para a subtribo Zygopetalinae, Félix e Guerra (2000), indicaram um número básico secundário $x_2=24$ ou 26, sem que seja descrita a origem destes números a partir do número básico primário $x_1=7$. Considerando o número básico secundário, os cariótipos descritos no presente estudo deveriam ser classificados como diploides ($2n=2x=48$), triploides ($2n=3x=72$) e tetraploides ($2n=4x=96$). Entretanto, um número básico $x_2=24$ não coincide com os números básicos descritos para a maioria das angiospermas, estando bem acima daqueles relatados até o momento. Muitos autores propuseram $x=5, 6$ e 9 como limite inferior para os números cromossômicos básicos em angiospermas, (ver EHRENDORFER et al., 1968, STEBBINS, 1971, RAVEN, 1975; GRANT, 1981). Com base nesse argumento, e à luz dos valores encontrados para *Zygopetalum* no presente trabalho, é razoável supor que, $x_1=7$ seja o número básico original da família, e que poderia ter se originado, por displóidia descendente $x_2=6$, que por sua vez teria originado posteriormente os números cromossômicos observados no presente trabalho: $2n=8x=48$ (octaploide), $2n=12x=72$ (dodecaploide) e $2n=16x=96$

cromossomos (hexadecaploide). Eventos de aneuploidia/displóidia, que resultam em perda ou ganho de cromossomos, acompanhados ou não de alteração no conteúdo de DNA durante a reestruturação genômica, já foram citados como relevantes na evolução de Orchidaceae (FÉLIX e GUERRA, 2010; MORAES, LEITCH e LEITCH, 2012; MORAES et al., 2016 e 2017). Sumariamente, se for levada em conta a família Orchidaceae como unidade taxonômica base pra definir o número básico de *Zygopetalum*, a melhor hipótese seria de $x_1=6$. Por outro lado, se a subtribo Zygopetalinae for a unidade taxonômica básica considerada, o “x” básico a ser adotado para o gênero passar a ser $x_2=24$.

Para *Zygopetalum*, relatos sobre a morfometria cromossômica ainda não foram realizados. No presente trabalho, os dados morfométricos revelaram que o cariótipo com $2n=48$ apresenta 40 cromossomos metacêntricos e 8 submetacêntricos, com fórmula cariotípica $FC = 20m + 4sm$. Por outro lado, o cariótipo com $2n=72$ tem $FC = 20m + 3sm + 1t$, enquanto aquele com $2n=96$ tem $FC = 18m + 5sm + 1t$. O cromossomo telocêntrico observado somente nos indivíduos com $2n=72$ e $2n=96$ posiciona-se no cariograma, na mesma ordem (número 24) em que no cariótipo de $2n=48$ observa-se um cromossomo submetacêntrico. Essa diferença na classificação pode indicar um rearranjo sofrido nos indivíduos de maior ploidia. Os cromossomos podem, por exemplo, ter perdido parte do braço curto e por isso mudaram a classificação quando comparados ao par 24 (submetacêntrico) do citótipo de 48 cromossomos. O mesmo raciocínio pode explicar a diferença de tamanho entre os quatro cromossomos de número 1 do cariótipo com 96 cromossomos, onde um deles é menor que os outros três. Neste caso, a morfologia indica que este cromossomo pode ter perdido parte do seu braço curto.

Indivíduos com 48 cromossomos apresentaram o cariótipo ligeiramente mais simétrico quando comparado àqueles de 72 e 96 cromossomos. Não há até o momento inferências sobre o tempo do surgimento de cada um dos citótipos estudados neste trabalho, mas o grau de assimetria cariotípica e os valores de heterogeneidade cromossômica encontrados sugerem que os maiores níveis de ploidia derivam do cariótipo de 48 cromossomos. O citótipo de 96 cromossomos mostrou o menor grau de simetria cromossômica e isto pode ser consequência de uma origem mais recente deste cariótipo quando comparado, por exemplo, ao indivíduo com menor nível de ploidia ($2n=48$). Em geral, o aumento da

heterogeneidade cromossômica (Ai) e da assimetria cariotípica (A) relaciona-se diretamente ao aumento no nível de ploidia (STEBBINS, 1971; LIU et al., 2006; SOUSA et al., 2012).

De forma complementar à morfometria cromossômica, a localização de sítios específicos, como as regiões dos genes ribossomais 5S e 45S pode ser um recurso valioso em abordagens sobre a evolução cariotípica de plantas, já que os DNAr são marcadores universais largamente empregados no estudo de vegetais. Os RNAs ribossomais são transcritos a partir de genes ribossomais com sequências repetitivas *in tandem*, que podem variar em tamanho e número de cópias tanto entre espécies quanto entre indivíduos de mesma espécie (LEVIN, 2002; FUKUSHIMA, 2011; WAN et al., 2012). Neste trabalho, os genes de DNAr 5S variaram entre a região terminal no braço curto do cromossomo e a região subterminal, próxima ao centrômero, corroborando a premissa de que este tipo de DNA ribossomal pode aparecer também em regiões medianas do cromossomo, não restringindo-se somente às zonas terminais (HESLOP-HARRISON, 2000; NEVES et al., 2005). As marcas para DNAr 45S foram todas localizadas em regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos. Este resultado é condizente com a teoria apresentada por Roa e Guerra (2012) de que, nas angiospermas, os sítios de DNAr 45S ocorrem preferencialmente nos braços curtos dos cromossomos.

Os resultados gerados pela FISH, dão suporte à hipótese de poliploidia no complexo "*Z. maculatum*", visto que, o número de marcas de DNAr 5S e 45S aumentou proporcionalmente ao aumento no nível de ploidia dos citótipos analisados (Figura 16 B e C). Foram observadas quatro, seis e oito marcas 5S e 45S nos cariótipos com $2n=48$, 72 e 96 cromossomos, respectivamente. Além disso, a localização das marcas nos cromossomos foi similar em indivíduos com 48, 72 e 96 cromossomos, reforçando a hipótese de que o genoma de menor número cromossômico pode ter originado os outros dois citótipos.

É importante lembrar que os resultados relativos à estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo também ajudam a embasar a hipótese de poliploidia no complexo, tendo-se observado valores 2C proporcionais ao número cromossômico. Com relação à provável origem da poliploidia no grupo, o que se pode afirmar é que se a formação do complexo fosse por aloploidia, pelo menos dois genomas estariam envolvidos na formação dos poliploides. Para garantir a proporcionalidade

aqui observada em relação à quantidade de DNA e o nível de ploidia seria necessário então, que os genomas envolvidos fossem do mesmo tamanho e bastante similares em sua constituição cromossômica, cenário que não é impossível, mas é menos provável.

6. CONCLUSÕES

- A citometria de fluxo apontou três quantidades de DNA para o complexo “*Zygopetalum maculatum*” ($2C=7,36$; 10,52 e 14,09 pg).
- Três números cromossômicos foram identificados ($2n=48$, 72 e 96), sendo um deles descrito pela primeira vez para *Zygopetalum* ($2n=72$).
- As quantidades de DNA para o complexo “*Zygopetalum maculatum*” mostraram-se proporcionais aos números cromossômicos observados.
- Cada população investigada apresenta um perfil próprio no que se refere à quantidade de DNA nuclear e aos números cromossômicos.
- A distribuição dos citótipos em toda a área amostrada sugere uma distribuição particular dos indivíduos com 96 cromossomos nas regiões Sudeste e Sul, com concentração dos indivíduos com 48 cromossomos ao norte da região Sudeste e ao Sul da região Nordeste.
- A proporcionalidade das quantidades de DNA, a constância no número de marcas para genes ribossomais e a similaridade dos cariótipos para os três citótipos sugerem uma possível origem autoploide para o complexo “*Zygopetalum maculatum*”.

CAPÍTULO III – COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE TRÊS CITÓTIPOS DE “*Zygopetalum maculatum*” (ORCHIDACEAE)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Origem natural de poliploides

A duplicação genômica em plantas é provavelmente a alteração citogenética mais relevante na especiação e evolução do grupo (STEBBINS, 1971). Relativamente à origem, organismos poliploides podem ser autopoliploide (oriundo de um mesmo genoma) ou alopoliploide (formado a partir de dois ou mais genomas). Admite-se ainda, uma terceira categoria, composta por poliploides segmentares, fruto de genomas de espécies próximas o suficiente para apresentarem uma certa homeologia cromossômica (STEBBINS, 1971; RAMSEY e RAMSEY 2014).

Em ambientes naturais, a principal fonte de poliploides aceita hoje é a união de gametas não reduzidos gerados na gametogênese (HARLAN e DE WET, 1975; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; RAMANNA e JACOBSEN, 2003; SOLTIS e SOLTIS, 2009; PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010), sendo a origem por duplicação somática (poliploides assexuais) natural considerada uma possibilidade bastante rara (DE WET, 1980).

Considerando a poliploidização por via sexual, há duas possibilidades, a unilateral e a bilateral. Esta última, de acordo com Mendiburu e Peloquin (1971), é menos frequente e caracteriza-se pela formação de poliploides a partir da fusão de dois gametas não reduzidos. Por outro lado, a poliploidia unilateral envolve cruzamento entre um gameta reduzido e outro não reduzido gerando embriões 3x (triploides), sendo o tipo unilateral de poliploidização o mais comum entre as plantas (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995). Em todo caso, a origem sexual de poliploides - lateral ou unilateral - em algum momento, depende da formação de gametas não reduzidos, que são gerados com maior frequência em organismos já poliploides, cuja meiose é irregular. Outra fonte de gametas não reduzidos são indivíduos com comportamento diploide já bem estabelecido, mas expostos a condições adversas do ambiente como extremos de temperatura e sazonalidade (STEBBINS, 1971; RAMANNA e JACOBSEN, 2003).

Geralmente, embriões triploides, gerados pela poliploidização unilateral, são abortados graças ao chamado “efeito do bloco triploide”, que consiste em falhas causadas pela triploidia no desenvolvimento do endosperma (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995). No entanto, casos em que o gameta reduzido é o materno o cruzamento tem chances de produzir uma progênie triploide viável, graças a um balanço entre os fatores genéticos do óvulo e da célula espermática (LEVIN, 2002). Mesmo quando superam as barreiras pós-zigóticas, os triploides apresentam enorme tendência à infertilidade, uma vez que sua gametogênese é comprometida pelo severo conflito genômico gerado pela triploidia. Dessa forma, Otto e Whitton (2000) consideram organismos 3x um obstáculo para a evolução. Por outro lado, de acordo com Ramsey e Schemske (1998), ainda que apresentem tendência para formar gametas aneuploides, os triploides, através de cruzamentos com organismos diploides, tetraploides ou outros triploides podem originar variados citótipos, contribuindo positivamente para a diversidade e evolução vegetal. A reprodução por apomixia também é um recurso a favor da sobrevivência dos triploides, visto que permite aos poliploides reproduzirem-se sem a necessidade de outro indivíduo (COMAI, 2005), contornando o problema dos gametas desbalanceados.

Na natureza, não é surpresa que, após um evento inicial de poliploidização, outros cruzamentos e eventos de poliploidização ocorram entre os morfotipos e acabem por originar uma gama de citótipos com variados níveis de ploidia (SOLTIS et al., 2007). A partir do momento em que os novos citótipos passam a coexistir em uma população, cruzamentos intercitótipos e retrocruzamentos são claramente facilitados (BURTON e HUSBAND, 2001), ampliando as vias para emergência de outros poliploides. Tal dinâmica na reprodução e origem de genomas duplicados subsidia a teoria de que em muitos casos, senão na maioria deles, as espécies poliploides conhecidas atualmente são de origem múltipla, ou seja, em sua história evolutiva carregam eventos de poliploidização recorrentes e em alguns casos independentes, envolvendo ancestrais variados (SOLTIS e SOLTIS, 1995; 1999). Já foi demonstrado que algumas espécies possuem várias origens poliploides, como é o caso de *Tragopogon miscellus* L., originado há cerca de 70 anos, que teria passado por até 20 ciclos de poliploidização (SOLTIS et al., 1995) e *Draba norvegica* Fernald, cuja história evolutiva possui provavelmente 13 ocorrências de duplicação do genoma (SOLTIS e SOLTIS, 1995). Além da origem múltipla, pode ocorrer ainda fluxo gênico entre

populações diploides e poliploides e entre poliploides de diferentes origens, o que contribui para justificar a ampla variabilidade genética dos poliploides (SCHIFINO, 2004).

A variação encontrada entre organismos com genomas múltiplos, normalmente é fruto da redundância genética proporcionada pela duplicação genômica. Essa característica é um importante ponto a favor do estabelecimento de linhagens poliploides, uma vez que oferece certa flexibilidade a possíveis pressões de seleção do ambiente. As cópias extras dos genes nos poliploides conferem a eles maior tolerância às mutações espontâneas de forma que mudanças na sequência ou estrutura do DNA que seriam prejudiciais em diploides, podem oferecer funcionalidades exclusivas, complementar funções de outros genes e até diminuir a expressão gênica (LYNCH et al., 2001; BUGGS et al., 2010a, e b). Paralelamente, as cópias excedentes de sequências são capazes de suprimir o efeito de mutações deletérias (OTTO e WHITTON, 2000; CHEN, HÁ e SOLTIS, 2007; OTTO, 2007).

Qualquer que seja o caminho, as inovações características de poliploides podem incrementar o processo adaptativo destes organismos, e conseqüentemente, favorecer o estabelecimento, aumento populacional e diversificação de citótipos poliploides (OTTO e WHITTON, 2000; PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010).

1.2 Comportamento meiótico em poliploides

A fonte primordial de poliploides está nos gametas não reduzidos formados a partir de anormalidades na micro e na megasporogênese como consequência de problemas intrínsecos do fuso mitótico ou no progresso da citocinese (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995). De forma complementar, gametas $2n$ também podem ser induzidos por condições adversas do meio. Agentes relacionados à temperatura, poluição, além de disponibilidade de recursos hídricos e nutricionais acabam por influenciar na taxa de anormalidade dos pólenes (RAMSEY e SCHEMKE, 1998), isto porque tais fatores seriam capazes de modificar a expressão de genes ligados à meiose (VEILLEUX e LAUER, 1981).

A não redução gamética caracteriza-se pela não disjunção correta dos cromossomos, seja na primeira ou na segunda divisão da meiose, e não por acaso, um dos indicativos mais relevantes de formação de gametas não reduzidos é a observação, por meio da citogenética, de díades e tríades ao final da divisão meiótica (RAMANNA, 1992; ORTIZ, 1997; YAN et al., 1997). Sabe-se que gametas não reduzidos geram poliploides, mas é verdade também que os organismos poliploides tendem a produzir altos índices de gametas não reduzidos.

Existem três tipos de poliploidia sexual – auto, alopoliploidia e poliploidia segmentar – e para cada um deles há consequências genéticas diferenciadas que são detectáveis por meio de ferramentas citogenéticas. Um autopoliploide abriga várias cópias de um mesmo gene, e portanto, espera-se que durante o pareamento cromossômico ocorra a formação de multivalentes; no caso de alopoliploide, os genomas diferentes costumam gerar bivalentes durante o pareamento cromossômico; e por fim, quando o poliploide é segmentar, o padrão de pareamento tende a ser intermediário (SRIVASTAVA, LAVANIA e SYBENGA, 1992). Todavia, a poliploidia é um processo bastante dinâmico e essa delimitação de perfis acaba por dissolver-se com o passar do tempo, pois é uma característica natural dos poliploides, buscar condições para um comportamento diploidizado da meiose, a fim de otimizar os resultados da divisão, minimizando as irregularidades na formação dos gametas (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002). Portanto, a duplicação do genoma proporciona um período de transição que envolve mudanças genômicas consideráveis em busca da diploidização que podem produzir complexos gênicos inéditos e facilitar a rápida evolução (SOLTIS e SOLTIS, 1999).

Os mecanismos genéticos diretamente implicados no processo de diploidização ainda precisam ser elucidados, porém, inúmeras modificações a nível gênico já foram identificadas como envolvidas neste processo: silenciamento gênico, reestruturação cromossômica, ação de transposons e novos padrões de expressão gênica (WOLFE, 2001). Como resultado de tantas alterações genômicas, é comum que após a poliploidização, possivelmente na tentativa de que os cromossomos ocorram aos pares, os indivíduos sofram eliminação e reorganização do material genético (LEITCH e BENNETT, 2004), seja em suas células somáticas ou germinativas. Essa redução e reestruturação do genoma, quando ocorre em células germinativas, colabora diretamente para a regularização do pareamento na meiose

(FELDMAN et al., 1997) e futuro reestabelecimento da fertilidade em poliploide. Informações da literatura relacionadas a poliploides recentes revelam que tanto auto quanto aloploides, na busca por um comportamento diploidizado, demonstram grande complexidade meiótica caracterizada por pareamento multivalente, perda de sequências e até cromossomos inteiros, translocações e produção de gametas não balanceados (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002). Todas essas anormalidades podem ser observadas durante o estudo, via citogenética, da gametogênese em plantas.

A descrição do comportamento meiótico, portanto, ajuda a inferir sobre possibilidades de cruzamentos dentro de um táxon e inclusive entre espécies diferentes, porém, consideradas próximas sob o ponto de vista taxonômico, contribuindo assim para a compreensão acerca da origem de citótipos (LEVIN, 2002). Diante das alterações que podem ser detectadas na meiose e relacionadas a processos de poliploidização, o estudo do comportamento meiótico em indivíduos de "*Zygopetalum maculatum*" coletados em diferentes populações naturais pode ser de grande valia no entendimento da origem deste grupo, considerando a ocorrência de populações com até três citótipos, o que sugere uma série poliploide dentro do complexo.

2 OBJETIVOS

Caracterizar três diferentes citótipos ($2n=48$, $2n=72$ e $2n=96$ cromossomos) do complexo "*Zygopetalum maculatum*" por meio do comportamento meiótico e relacionar os resultados obtidos à uma possível origem poliploide, contribuindo para o esclarecimento da história evolutiva do grupo.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Determinar o percentual de regularidade meiótica de três citótipos de "*Zygopetalum maculatum*";
- 2) Identificar e quantificar as anomalias meióticas para cada um dos três citótipos de "*Zygopetalum maculatum*";

3) Relacionar as possíveis irregularidades da meiose ao nível de ploidia detectado em cada citótipo estudado de "*Zygopetalum maculatum*".

3 MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Material biológico

O material para estudo foi coletado em parceria com a Prof^a Dr^a. Samantha Koehler do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas. Os indivíduos amostrais foram coletados espaçadamente de modo a evitar a coleta de clones (ARNAUD-HAOND, 2007). Os indivíduos que forneceram os botões florais para a análise meiótica encontram-se em cultivo no Orquidário Frederico Carlos Hoehne (OFCH, Instituto de Botânica de São Paulo, SP) em colaboração com o Dr. Eduardo Catharino. A tabela 1 mostra a origem das populações incluídas no estudo meiótico.

Tabela 1 - Origem das populações envolvidas no estudo de comportamento meiótico em "*Zygopetalum maculatum*"

| População/número de indivíduos | Estado | Latitude (Sul) | Longitude (Oeste) |
|--------------------------------|--------|----------------|-------------------|
| Bocaina/2 | SP | 22°42.29' | 44°34.46' |
| Serra do Cipó/2 | MG | 19°15.879' | 43°33.184' |
| Finas/1 | MG | 22°27.12' | 44°54.06' |
| Padre Ângelo/3 | MG | 19°20'171' | 41°34'235' |
| Pedra do Gado/2 | MG | 17°22'143' | 41°44'209' |
| Pico do Garrafão/3 | SP | 23°39.29' | 46°02.05' |
| Pico do Itambé/3 | MG | 18°23.917' | 43°20.436 |
| Pico dos Marins/1 | SP | 22°29'46" | 45°07'39" |
| Pico Paraná/1 | PR | 25°14.120' | 48°50.183' |
| Serra do Pitengo/2 | MG | 18°31.332' | 41°08.422' |
| Parque Estadual do Ibitipoca/2 | MG | 21° 43' 30" | 43° 54' 15" |
| Ciotia/2 | MG | 23° 36' 14" | 46° 55' 09" |

3.2 Análise meiótica

Para o estudo da gametogênese, botões florais foram coletados aleatoriamente em diferentes inflorescências, obtendo-se assim botões em diversos estágios de desenvolvimento. O material foi fixado em *Carnoy* (etanol/ácido acético glacial - 3:1, v/v) e armazenado a -20°C durante o período mínimo de 24 horas.

A avaliação e quantificação das anormalidades meióticas foram realizadas a partir de lâminas obtidas pelas técnicas de esmagamento proposta por Oliveira et al., (1995). O método de maceração enzimática (VICCINI et al., 2005) foi empregado para a obtenção de figuras que permitam melhor documentação do comportamento observado.

Para o preparo das lâminas por esmagamento, as polínias foram hidrolisadas por 20 minutos em HCl 5N, lavadas e coradas comorceína acética 2%, sendo em seguida esmagadas e cobertas com lamínula de vidro. Cada lâmina foi rapidamente flambada em lamparina e as lamínulas seladas com esmalte comercial incolor. A análise procedeu-se em microscópio óptico (Olimpus BX 51) com objetiva de 100x.

As fases da meiose analisadas incluíram diacinese na prófase I, metáfase I, anáfase I, telófase I, metáfase II, anáfase II, telófase II e tétrade. Para calcular o percentual de tétrades anormais foram consideradas tétrades normais aquelas caracterizadas por células com 4 meiócitos isolados de tamanho igual.

Foram avaliadas 100 células/fase de cada indivíduo de todas as fases, com exceção da diacinese que, por ser uma fase rápida é observada com menor frequência em lâmina. Neste caso foram contabilizadas 50 células para cada indivíduo. Figuras representativas das anormalidades foram digitalizadas através de uma câmera de vídeo Olympus DP72 acoplada ao microscópio, e documentadas por meio do *software* Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

As diacineses não mostraram boa qualidade pela técnica de esmagamento, sendo necessário, portanto, a avaliação desta fase por meio da técnica de maceração enzimática. Os botões florais foram fixados e armazenados conforme descrito para a técnica de esmagamento. A suspensão celular foi preparada de acordo com Viccini et al. (2005) com as adaptações necessárias para *Zygopetalum*. Resumidamente, os meiócitos foram extraídos das anteras após maceração em solução enzimática

(Ultrazym AFP-L NOVO NORDISK) à 34°C por 6h. Para a obtenção das lâminas foi empregada a técnica de secagem ao ar (CAIXETA e CARVALHO, 2003), gotejando-se de 3 a 5 gotas da suspensão celular contendo os meiócitos em uma lâmina. A lâmina foi mergulhada em solução de ácido acético 45% por 10 segundos para clareamento do citoplasma, e então corada com Giemsa 5% (Merk®) em tampão fosfato pH 6,8 por 5 minutos. O excesso de corante foi removido das lâminas em dois banhos de 20 segundos em água destilada. A análise foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX 51) com objetiva de 100x. Utilizando o *software* Image Pro-Plus (Media Cybernetics), 50 diacineses foram analisadas e contabilizadas para cada indivíduo.

4 RESULTADOS

Ambas as técnicas empregadas (esmagamento e maceração enzimática) para análise das irregularidades meióticas foram eficientes. As taxas de alterações foram consideradas altas em todos os indivíduos avaliados, oscilando em média de 27,07% a 43,47% no citótipo de $2n=48$ cromossomos, de 64,67% a 82,93% no citótipo de $2n=72$ e de 46,93% a 75,47% no citótipo de $2n=96$ (Figura 1 e Tabela 2). Diversas anormalidades foram observadas na meiose dos três citótipos investigados, desde as fases iniciais até a fase de tétrade (Tabela 2 e Figuras 2, 3 e 4).

As alterações mais frequentes nas duas divisões da meiose foram aquelas relacionadas a problemas no fuso mitótico e DNA aderente. Todos os indivíduos analisados apresentaram irregularidades como segregação tardia, anomalias no fuso, cromossomos aderentes, pontes cromossômicas, assincronia na segunda divisão da meiose e formação de micronúcleos (MN) (Figura 2, 3 e 4).

Material genético aderente foi observado principalmente em diacinese e metáfase I (Figura 2A e B), tornando inviável a determinação do número de cromossomos a partir da meiose. Contudo, informações sobre quantidade de DNA e número cromossômico já haviam sido obtidas a partir de lâminas mitóticas e pela técnica de citometria de fluxo (ver capítulo II).

Ainda na primeira divisão, foram registrados cromossomos com migração tardia na metáfase, anáfase e telófase (Figura 2B, D, E e G; Figura 4, A, C e D), pontes na

anáfase e telófase (Figura 2E, H e I) e anáfase com DNA pegajoso (Figura 2A, B e F). Na meiose II, além dos cromossomos atrasados (Figura 3B, C, e D; Figura 4G), foi bastante comum a observação de metáfases em T (Figuras 3A e 4F) e assincronia na metáfase e anáfase (Figura 4E e H). Micronúcleos (MN) foram observados nas variadas fases do ciclo celular, desde a intérfase até a tétrade (Figura 3F). Tantas irregularidades acabaram por gerar índices consideráveis de tétrades anormais, como tríades (Figura 4I).

Tabela 2 - Percentual de anormalidades (AN) em diferentes fases da meiose em três citótipos de "*Zygopetalum maculatum*"

| Indivíduos/Localidade | Diac. | Met. I | Anaf. I + Telof. I | Met. II | Anaf. II + Telof. II | Tétrade | Meiose |
|---------------------------------|--------|--------|--------------------|---------|----------------------|---------|--------------|
| " <i>Z. maculatum</i> " (2n=48) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) total |
| ZM564/Padre Ângelo | 100,00 | 62,00 | 28,00 | 47,00 | 31,50 | 48,00 | 43,47 |
| ZM588/Pedra do Gado | 100,00 | 18,00 | 24,50 | 16,00 | 35,50 | 28,00 | 30,93 |
| ZM594/Pedra do Gado | 100,00 | 41,00 | 16,50 | 28,00 | 19,50 | 12,00 | 27,07 |
| ZM025/Pico do Garrafão | 100,00 | 19,00 | 37,50 | 38,00 | 34,00 | 28,00 | 37,07 |
| ZM183/Pico do Itambé | 100,00 | 68,00 | 19,50 | 36,00 | 35,50 | 32,00 | 39,47 |
| ZM606/Serra do Pitengo | 100,00 | 22,00 | 18,00 | 65,00 | 31,50 | 33,00 | 35,87 |
| ZM607/Serra do Pitengo | 100,00 | 33,00 | 52,50 | 39,00 | 18,00 | 25,00 | 38,40 |
| ZM018/Cotia | 100,00 | 41,00 | 18,00 | 17,00 | 29,50 | 27,00 | 30,67 |
| " <i>Z. maculatum</i> " (2n=72) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) total |
| ZM123/Serra do Cipó | 100,00 | 86,00 | 69,00 | 79,00 | 66,00 | 71,00 | 74,13 |
| ZM555/Padre Ângelo | 100,00 | 72,00 | 52,00 | 67,00 | 61,00 | 69,00 | 64,67 |
| ZM201/Pico do Itambé | 100,00 | 86,00 | 82,50 | 83,00 | 80,50 | 77,00 | 82,93 |
| ZM002/Cotia | 100,00 | 79,00 | 78,00 | 87,00 | 76,00 | 75,00 | 79,20 |
| " <i>Z. maculatum</i> " (2n=96) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) | AN (%) total |
| ZM050/Bocaina | 100,00 | 68,00 | 38,50 | 65,00 | 49,50 | 48,00 | 54,27 |
| ZM069/Bocaina | 100,00 | 87,00 | 30,50 | 66,00 | 34,00 | 52,00 | 51,20 |
| ZM076/Serra do Cipó | 100,00 | 83,00 | 56,50 | 75,00 | 71,00 | 52,00 | 68,67 |
| ZM162/Finas | 100,00 | 63,00 | 31,00 | 79,00 | 34,00 | 41,00 | 48,40 |
| ZM559/Padre Ângelo | 100,00 | 83,00 | 44,50 | 81,00 | 54,00 | 59,00 | 62,67 |
| ZM006/Pico do Garrafão | 100,00 | 81,00 | 72,00 | 86,00 | 55,50 | 55,00 | 70,27 |
| ZM148/Pico do Garrafão | 100,00 | 84,00 | 75,50 | 87,00 | 66,00 | 63,00 | 75,47 |
| ZM189/Pico do Itambé | 100,00 | 74,00 | 68,50 | 83,00 | 53,50 | 68,00 | 69,20 |
| ZM102/Pico do Marins | 100,00 | 77,00 | 44,50 | 54,00 | 64,00 | 57,00 | 60,67 |
| ZM152/Paraná | 100,00 | 78,00 | 45,50 | 81,00 | 56,50 | 47,00 | 61,33 |
| S20/Ibitipoca | 100,00 | 78,00 | 29,50 | 54,00 | 32,00 | 47,00 | 46,93 |
| S32/Ibitipoca | 100,00 | 62,00 | 48,00 | 74,00 | 41,50 | 58,00 | 56,40 |

AN=anormalidades; Diac.=diacinese; Met.=metáfase; Anaf.= anáfase; Telof.=telófase.

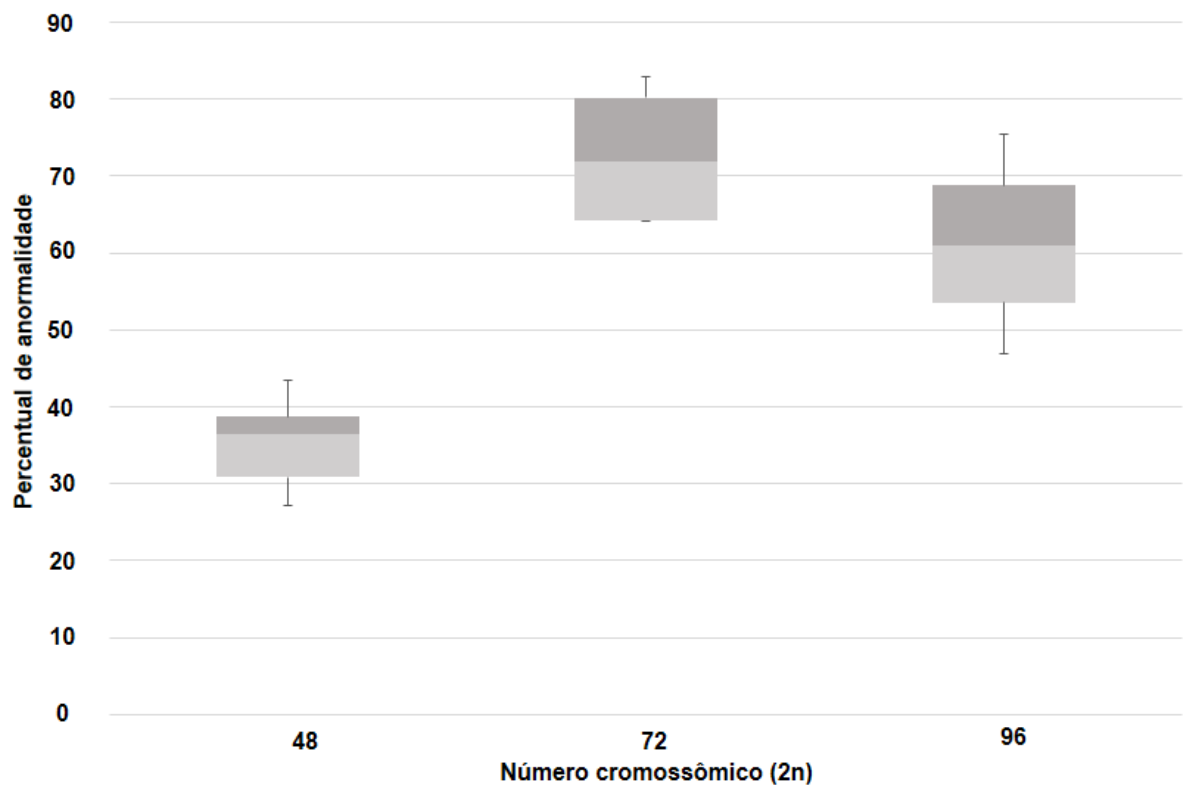


Figura 1 - Variação observada nas porcentagens de anormalidades detectadas em meiócitos dos citótipos $2n=48$, $2n=72$ e $2n=96$ do complexo "*Zygopetalum maculatum*".

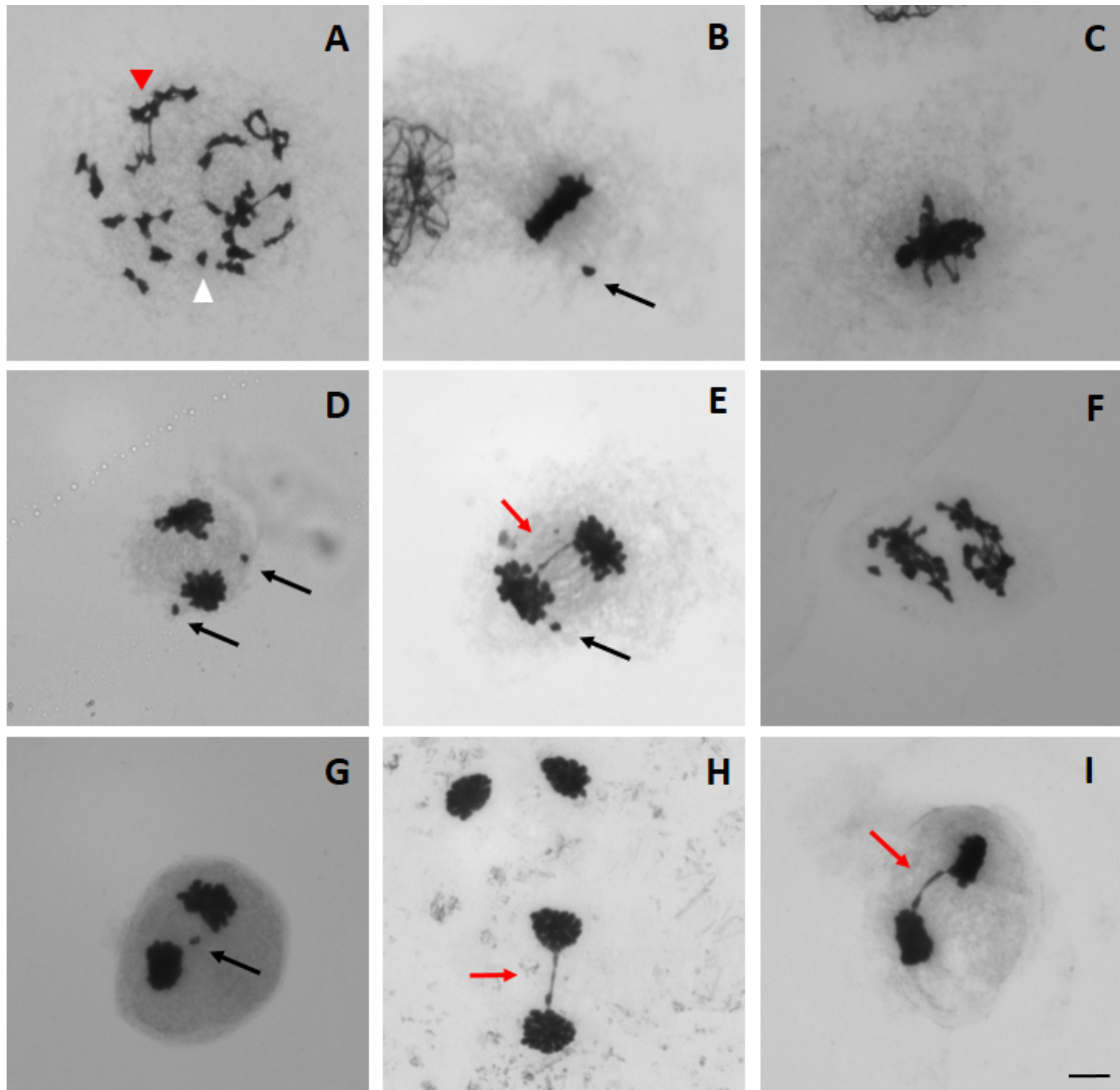


Figura 2 - Anormalidades na primeira divisão meiótica de "*Zygopetalum maculatum*". As imagens foram obtidas por suspensão celular. (A) Diacinese com cromossomos "aderentes", as pontas de setas branca e vermelha indicam univalentes e multivalentes respectivamente (2n=96); (B) Metáfase I com cromossomo atrasado (2n=48); (C) Metáfase I com cromossomo "aderentes" (2n=96); (D) Anáfase I com cromossomos atrasados (2n=48); (E) Anáfase I com cromossomos atrasados e ponte cromossômica (2n=96); (F) Anáfase I com cromossomos "aderentes" (2n=96); (G) Telófase I com cromossomos atrasados (2n=72); (H e I) Telófase I com ponte cromossômica. Setas pretas indicam cromossomos atrasados e setas vermelhas indicam ponte cromossômica, H (2n=72) e I (2n=96). Barra=10 μ m.

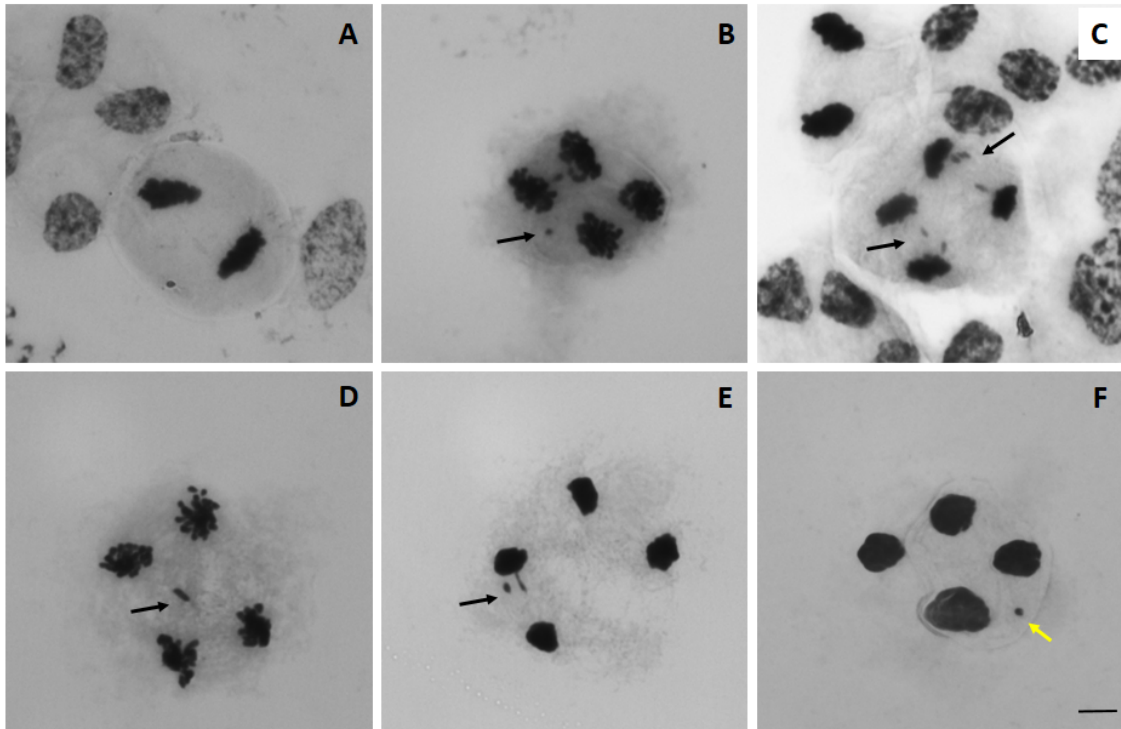


Figura 3 - Anormalidades na segunda divisão meiótica de "*Zygotetrum maculatum*". As imagens foram obtidas por suspensão celular. (A) Metáfase II em T ($2n=96$); (B, C e D); Anáfase II com cromossomos atrasados, B ($2n=96$), C ($2n=48$) e D ($2n=96$); (E) Telófase II com cromossomos atrasados ($2n=48$); (F) Tétrade com micronúcleo ($2n=72$). Setas pretas indicam cromossomos atrasados, seta amarela indica micronúcleo. Barra= $10\mu\text{m}$.

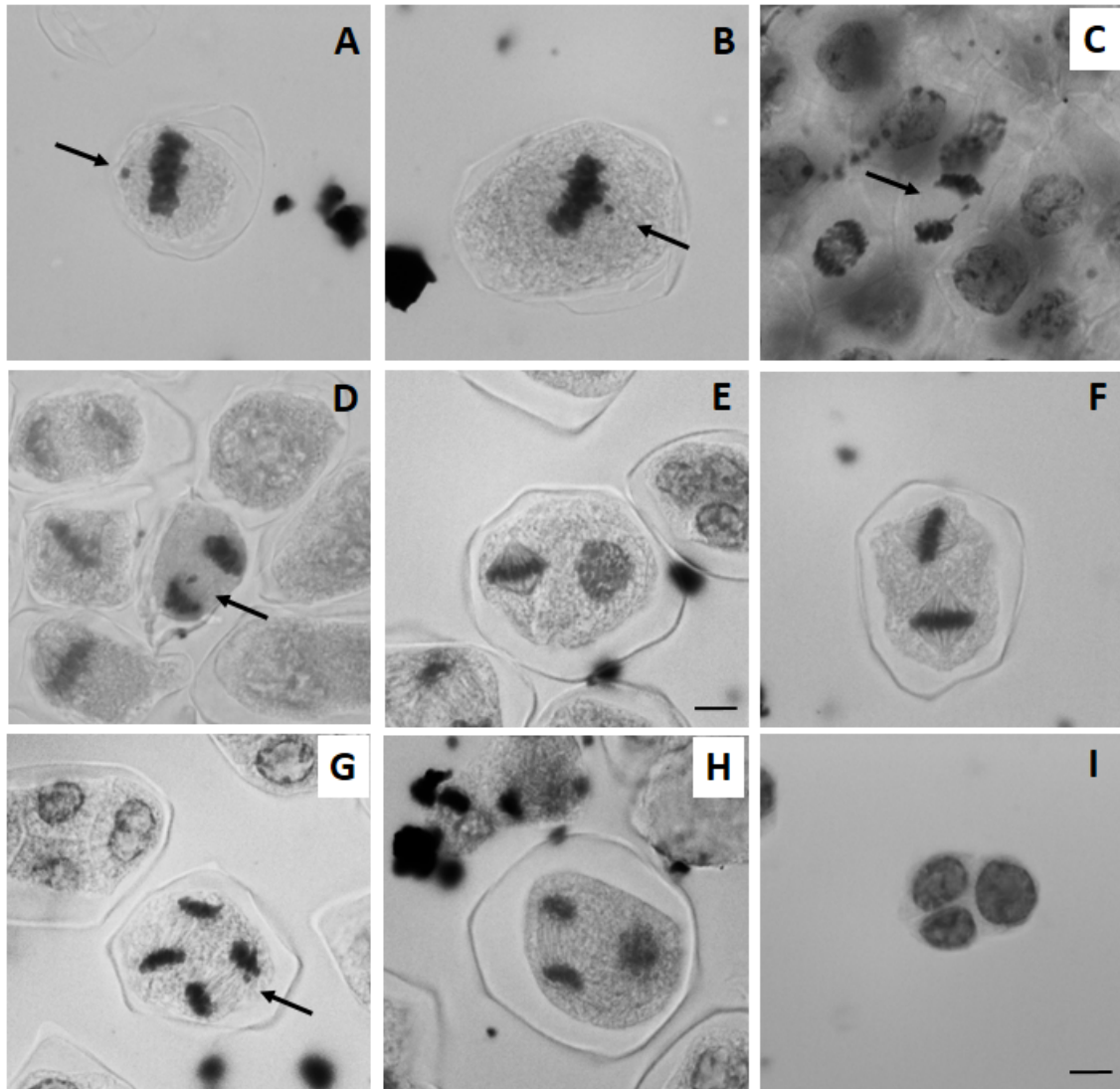


Figura 4 - Anormalidades em células meióticas de “*Zygopetalum maculatum*”. As lâminas foram obtidas pela técnica de esmagamento celular. (A e B) Metáfase I com cromossomo atrasado, A ($2n=72$) e B ($2n=96$); (C e D) Anáfase I com cromossomo atrasado, C ($2n=48$) e D ($2n=96$); (E) Assincronia celular com um grupo de cromossomos ainda em prófase II e outro grupo já em metáfase II, ($2n=96$); (F) Metáfase II em T ($2n=48$); (G) Anáfase II com cromossomo atrasado ($2n=72$); (H) Assincronia celular com parte dos cromossomos em prófase II e outra parte em Anáfase II ($2n=96$) e (I) Triáde com 2 núcleos de tamanho similar e um terceiro maior ($2n=48$). As setas indicam cromossomos atrasados. Barra= $10\mu\text{m}$.

5 DISCUSSÃO

A grande quantidade de células alteradas na meiose de “*Z. maculatum*” pode ser consequência de problemas no pareamento dos cromossomos. Hamant, Ma e Cande (2006) argumentam que múltiplas cópias de um homólogo no genoma leva à formação de multivalentes e cadeias cromossômicas na prófase I acarretando em anormalidades nas fases seguintes da divisão celular, além é claro, de aumentar a produção de gametas não reduzidos e/ou desbalanceados.

Os resultados indicam que indivíduos $2n=48$ cromossomos apresentaram a divisão meiótica menos irregular em comparação com os níveis de ploidia mais altos, $2n=72$ e $2n=96$ (Tabela 2). Porém, os resultados mostram elevado grau de anormalidades cromossômicas, em média 35,37%, mesmo para o menor número cromossômico avaliado, e portanto, sua meiose também pode ser considerada irregular, uma vez que, por exemplo, em orquídeas do gênero *Epidendrum* a meiose foi considerada regular com valores de anormalidade bastante baixos, variando de 1,58% a 5,45% (PINHEIRO et al., 2015). Com isso, adiciona-se, aos resultados descritos no capítulo II, mais um indicativo de que o citótipo $2n=48$ pode não representar um genoma diploide, visto que para tal seria esperado um baixo índice de anormalidade em sua divisão meiótica. Nesse contexto, e com embasamento nos índices de anormalidades, é aceitável supor que o citótipo $2n=48$, que apresenta a meiose menos irregular, esteja mais avançado no processo de atingir o comportamento diploidizado ideal para a formação de meiócitos normais e viáveis.

Indivíduos com 72 cromossomos revelaram uma microsporogênese mais comprometida que os demais citótipos, com média de 75,23% de anomalias contra 35,37% no $2n=48$ e 60,83% no $2n=96$. De maneira genérica, a gametogênese no citótipo $2n=72$ mostrou percentual de irregularidade alto, mas o mesmo foi bastante variável entre os indivíduos analisados. Foram vistos percentuais variando de 64,67% até 82,93%, que representa o maior valor de anormalidade observado dentre todas as populações. Essa amplitude revela variações genômicas em um mesmo citótipo, sugerindo eventos de poliploidização independentes (SOLTIS e SOLTIS, 1995; 1999).

É interessante destacar que quando analisamos cada grupo de citótipo, os indivíduos oriundos de populações consideradas homogêneas com relação a esse caráter são os que obtiveram os menores percentuais de anormalidade. Esse padrão pode ser observado, em vários casos (Tabela 2), mas como exemplo, podemos comparar os percentuais de irregularidades de plantas $2n=48$ coletadas na localidade de Pedra do Gado (27,07% e 30,93%), onde ocorrem apenas indivíduos com 48 cromossomos, com o valor obtido para um indivíduo de mesma ploidia originária de uma população mista como é o caso do Pico do Itambé (39,47% de aberrações meióticas), que abriga os três citótipos estudados. Uma hipótese que explicaria tal diferença é que nas populações homogêneas, os indivíduos com 48 ou 96 cromossomos (dependendo da população homogênea avaliada) são ligeiramente

mais estáveis e pelo menos a curto prazo, os gametas anormais produzidos em meioses irregulares ainda não obtiveram sucesso a ponto de originar e manter novos citótipos. Já nas populações mistas, o maior grau de anormalidade, pode ser responsável por gerar maior volume de gametas não reduzidos aumentando, portanto, a possibilidade de sucesso de algumas fertilizações com estes gametas anormais, e dessa forma emergem na população novos citótipos.

Células em diacinese revelaram grande quantidade de anormalidades, com cromossomos pegajosos em praticamente todas as células além de pareamento incorreto gerando muitos univalentes e multivalentes (Figura 2A). A meiose em organismos poliploides recém-formados, ou neopoliploides, tende a apresentar dificuldade de pareamento correto em bivalentes (LEVIN, 2002) e essa deficiência pode acarretar em baixa fertilidade. Como consequência desta adversidade, os indivíduos com genoma duplicado ficam em desvantagem quando comparados com aqueles cujo comportamento meiótico é diploide (LEVIN, 2002; GAETA e PIRES, 2010; LARROSA, et al., 2012).

Cromossomos retardatários ou atrasados são relatados como as irregularidades mais frequentes durante a metáfase I e anáfase I (PAGLIARINI, 2000). Geralmente, também estão relacionados com formação de micronúcleos (MN) (RISSO-PASCOTTO et al., 2003). Essas anormalidades foram observadas com frequência nas *Zygopetalum* estudadas aqui. Tais dados sugerem que a ação das proteínas envolvidas no mecanismo de *checkpoint* pode estar prejudicada nessas orquídeas. Estudos mostram que quando proteínas relacionadas a *checkpoints* do ciclo celular são inibidas, as plantas apresentam problemas meióticos consideráveis (PREUSS e BRITT, 2003).

Outra alteração bastante observada foi a assincronia meiótica, que é característica comum de híbridos interespecíficos. Isso decorre do fato de esses indivíduos apresentarem em seus núcleos genomas oriundos de espécies diferentes, que apesar de compartilharem semelhanças genômicas, podem ter ciclos celulares diferentes levando a alterações. Células assincrônicas apresentam dois grupos de cromossomos em diferentes fases do ciclo celular e quando não decorrem de hibridização, podem ser explicadas pela despolimerização das fibras do fuso nos polos das células (SOUZA et al., 2003). É possível que a assincronia registrada neste

trabalho não seja de origem aloploide, uma vez que a diferença de sincronia entre os grupos cromossômicos não foi muito marcante, ou seja não mostra uma distância entre ampla de estágios do ciclo celular de cada grupo de cromossomos. Essa anomalia foi vista principalmente quando um dos grupos cromossômicos encontrava-se em prófase II e o outro em metáfase II (Figura 2D e E). Ainda na meiose II, metáfases II em “T” (Figuras, 3A e 4F) foram muito frequentes e segundo SHAMINA (2005) o que gera essa anomalia é o fuso mitótico em estado transversal.

Com relação às perdas de fragmentos de DNA diagnosticadas em algumas fases, a explicação pode estar no fato de que genomas duplicados “buscam” o conhecido processo de diploidização, e nesse processo pode haver ampliação e/ou redução em sequências de DNA repetitivo (CLARKSON et al., 2005; LEITCH e LEITCH 2008; RENNY-BYFIELD et al., 2013). Seguindo essa linha de raciocínio, é possível que os fragmentos de DNA perdidos durante a meiose de “*Z. maculatum*” e os MN formados sejam indicativos de uma tentativa de reorganizar o genoma após a poliploidização e ajudem a explicar a redução do tamanho do genoma esperado que foi detectada nos maiores níveis de ploidia (ver capítulo II).

Finalmente, o produto da meiose em todos os indivíduos mostrou tétrades normais, sendo também recorrentes as anormalidades como tríades e tétrades com micronúcleos (Figuras 3L e 4F). Os altos índices de anormalidades meióticas foram condizentes com o percentual de tétrades anormais observados nos indivíduos. Ainda que o valor de 88% de regularidade tenha sido detectado em um indivíduo com 48 cromossomos, houve registro de valores que indicam menos de 50% de produção de tétrades normais no citótipo de 96 cromossomos e até menos de 30% em plantas $2n=72$ (Tabela 2). Estas anormalidades afetam a formação de gametas gerados por essas plantas, fazendo com que uma boa parte seja desbalanceada ou não reduzida. Assim, mais uma vez, a hipótese de um complexo poliploide é reforçada, visto que gametas não reduzidos são facilitadores naturais da formação de poliploides (RAMANNA e JACOBSEN, 2003; KOUTECKÝ et al., 2011; KOVALSKY e NEFFA, 2012).

Poliploides recém-formados tendem a exibir elevadas taxas de anormalidades meióticas e mitóticas (MADLUNG et al., 2005). Aloploides costumam adotar o comportamento diploidizado na gametogênese já nas primeiras gerações, inclusive com a formação de bivalentes (STEBBINS, 1971; RAMSEY e SCHEMSKE, 2002;

COMAI, 2005; LE COMBER et al., 2010; PARISOD, HOLDEREGGER E BROCHMANN, 2010; ZIELINSKI e SCHEID, 2012). Esse perfil pode ser justificado também pela ação conjunta de um gene chamado *Ph* (*Pairing homeologous*), importante para o pareamento acertado das unidades cromossômicas na prófase I, com rápidos rearranjos cromossômicos que minimizam/eliminam as divergências nas sequências dos homeólogos (CIFUENTES et al., 2010). Em contrapartida, a diploidização da meiose em casos de autopoliploidia é mais lenta e caracterizada pela formação de univalentes e multivalentes na prófase I (LEVIN, 2002), como identificado neste estudo (Figura 2A). Isto ocorre porque há no interior de cada núcleo, uma combinação de genomas geneticamente semelhantes, o que leva ao pareamento das várias cópias dos cromossomos. Esse tipo de anormalidade é esperado, já que em tais casos, o comportamento dos cromossomos tende a formar com frequência conjuntos com mais de dois cromossomos.

Contudo, apesar de todas as anormalidades registradas na divisão meiótica de "*Z. maculatum*", não se pode descartar a possibilidade de formação de gametas viáveis, porém, com tendência a desbalanceamentos, com aneuploidias ou o dobro do número cromossômico esperado. Sumariamente, as análises meióticas corroboram a hipótese do complexo poliploide em *Zygopetalum*.

A alta frequência de anormalidades encontradas durante a divisão sugere a produção recorrente de grãos de pólen desbalanceados, o que pode afetar a reprodução dos indivíduos e culminar na formação de citótipos poliploides (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; GAETA e PIRES, 2010). Este estudo evidencia severas irregularidades no comportamento meiótico de indivíduos inseridos no complexo "*Z. maculatum*". Logo, conclui-se que a reprodução sexuada está comprometida, mesmo que não em sua totalidade, o que poderia prejudicar o estabelecimento e expansão de populações a longo prazo. Entretanto, é fato que o grupo ocupa ampla extensão geográfica em âmbito nacional (Figura 5, capítulo II) e que na maioria das localidades amostradas as populações são compostas por numerosos indivíduos. Como justificativa para tal padrão ressalta-se que a longa permanência dos indivíduos nas populações, em função da possibilidade de emissão de propágulos e também pela pequena exigência nutricional e hídrica, pode contribuir para ampliar as possibilidades de cruzamento, considerando que há possibilidades de formação de gametas viáveis.

Adicionalmente, uma justificativa para o sucesso na ocupação de áreas, no aumento do número de indivíduos e na manutenção de citótipos novos no grupo pode estar no fato de que essas orquídeas realizam reprodução assexuada clonal e são reconhecidamente apomíticas (SUESSENGUTH, 1923; YAM et al., 2002). Em ambiente natural, o modo de reprodução assexual pode ser correlacionado à poliploidia (OTTO e WHITTON 2000) e, de acordo com Horändl (2011), a evolução da apomixia pode ser vista como uma consequência da poliploidização, a fim de incrementar o sucesso reprodutivo da progênie. Portanto, no caso de "*Zygopetalum maculatum*", a apomixia pode representar uma importante estratégia para driblar eventuais problemas reprodutivos gerados por duplicações genômicas recentes.

6 CONCLUSÕES

- Comportamento meiótico foi considerado anormal para os três citótipos de "*Z. maculatum*" avaliados;
- Em geral, populações com apenas um nível de ploidia abrigam indivíduos com meiose menos irregular quando comparados aos citótipos correspondentes em populações com mais de um número cromossômico;
- Diversas anormalidades como segregação tardia, anomalias no fuso, cromossomos aderentes, pontes cromossômicas, assincronia e formação de micronúcleos foram identificadas na gametogênese de "*Z. maculatum*", sendo as mais frequentes o DNA aderente e cromossomos atrasados;
- As elevadas taxas de anormalidade meiótica sugerem a formação de gametas desbalanceados, que podem contribuir para a formação de diferentes citótipos.
- A ausência de pareamento dissômico sugere a ocorrência de autopoliploidia na formação de citótipos com $2n=48$, 72 e 96 cromossomos;
- O menor índice de anormalidade meiótica do citótipo $2n=8x=48$ sugere que o mesmo constitua a base do complexo poliploide.

CAPÍTULO IV – VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DO COMPLEXO “*Zygopetalum maculatum*” (ORCHIDACEAE) ESTIMADA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR

1 INTRODUÇÃO

1. 1 Marcadores moleculares

A análise da variabilidade genética entre indivíduos, espécies e demais níveis taxonômicos pode ser realizada com o uso de marcadores morfológicos, citogenéticos e moleculares, sendo os últimos bastante valiosos, pois acessam e consideram dados a nível de DNA (RAMALHO e FURTINI, 2009).

O marcadores moleculares contribuem para o esclarecimento de situações onde a identificação morfológica pode ser duvidosa (DETTORI et al., 2001; FREUDENSTEIN e CHASE, 2001). Além disso, Agarwal, Shrivastava e Padh (2008) definem marcador molecular como um segmento específico de DNA capaz de representar diferenças em nível genômico. Nesse sentido, as informações geradas por tais marcadores, como a porcentagem de *loci* polimórficos, o índice de fixação e a heterozigosidade esperada têm possibilitado, com sucesso, a caracterização da diversidade genética em plantas (BERG e HAMRICK, 1997). De modo corroborativo, a aplicação de técnicas moleculares, tem sido recorrente em pesquisas que visam elucidar relações filogenéticas entre os diferentes níveis taxonômicos de vegetais: Wolfe, Xiang e Kephart, (1998), Maguire, Peakall e Saenger (2002), Fossati et al. (2004), Woodhead et al. (2005), Essi, Wagner e Chies (2014); Madesis et al. (2014), Zhang et al. (2014), Álvares-Carvalho et al. (2016), Duan et al. (2016), Safaei et al. (2016), entre muitos outros.

Marcadores isoenzimáticos foram os pioneiros no estudo de variação genética. Por volta de 1960 a detecção de polimorfismos era baseada na carga elétrica das proteínas (TORGGLER, CONTEL e TORGGLER, 1995), ou seja, o DNA ainda não era o objeto de estudo. Já no início dos anos 1980 foram desenvolvidos marcadores moleculares a partir da análise direta da molécula de DNA, o que representou um grande salto nas possibilidades de informações geradas, uma vez que, além de

amostrar regiões ativas do genoma, como já faziam os marcadores isoenzimáticos, alguns dos novos marcadores eram capazes de amostrar todo o genoma de uma espécie ou ainda regiões específicas da molécula de DNA, como no caso do microssatélites e sequenciamentos da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Um incremento importante no desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares foi o anúncio, em 1987, da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), tornando possível, a partir de uma reação em cadeia, a síntese em larga escala de cópias de um determinado trecho de DNA (RAMALHO, 2008).

Atualmente, os marcadores moleculares de maior destaque para a caracterização genética subdividem-se em duas categorias conforme a metodologia na qual baseiam-se. Seguindo tal critério, existem os marcadores fundamentados em hibridização como, por exemplo, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) e aqueles baseadas na amplificação de DNA por meio da PCR, onde enquadram-se os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeteas*) (MILACH, 1998; AGARWAL, SHRIVASTAVA e PADH, 2008; KUMAR et al., 2009).

Diante da riqueza de ferramentas, a escolha do marcador molecular a ser empregado em determinado estudo deve considerar muitos aspectos como: a pergunta chave do problema, peculiaridades de cada tipo de marcador e disponibilidade de tempo e recursos, sejam eles biológicos ou financeiros. Desta forma, os marcadores do tipo ISSR agregam a simplicidade metodológica do RAPD aliada à grande quantidade de informações geradas pelos marcadores AFLP e SSR, representando, portanto, uma excelente opção para trabalhos que requerem confiabilidade e reprodutibilidade com análises de baixo custo. Na família Orchidaceae os marcadores ISSR já vêm sendo empregados para a caracterização de diversidade genética (ver SMITH et al., 2002; WALLACE, 2004; GEORGE, SHARMA e YADON, 2009; PINHEIRO et al., 2012; QIAN, WANG e TIAN, 2013; ARRIGONI-BLANK et al., 2015; KHOMANN, NAM e ZAYAKIN, 2016).

1.2 Marcadores ISSR

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) apresentam elevado grau de polimorfismo, além de ampla distribuição pelo genoma, portanto têm sido bastante relevantes em estudos de diversidade genética populacional e biologia evolutiva (WOLFE e LISTON, 1998; REDDY et al., 2002).

Os estudos com ISSR dependem da PCR, onde os produtos correspondem a sequências de variados tamanhos (aproximadamente 100-3000 pares de base) que se situam em pontos adjacentes a regiões de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas. Para iniciar a reação é requerido apenas um *primer* com 16 a 25 pares de bases, sendo cada iniciador composto por di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeos (MISHRA et al., 2014; KUMAR et al., 2009) que ancoram na extremidade 5' - 3' da fita de DNA molde, então, são amplificadas as regiões de interesse localizadas entre os pontos de anelamento do iniciador (WOLFE e LISTON, 1998). Erros nos processos de replicação, deleção, inserção ou translocação modificam a distância entre as repetições de microssatélites gerando os polimorfismos identificados pelos marcadores ISSR (NG e TAN, 2015).

Os ISSR foram desenvolvidos na década de 90 e assim como os RAPD e AFLP, são classificados como dominantes (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ, RAFALSKI e LABUDA, 1994; GOULÃO e OLIVEIRA, 2001). A característica dominante revela alelos pela presença ou ausência de bandas e tal fato impede que indivíduos heterozigotos sejam diferenciados dos homozigotos (GUPTA et al., 1994). Por outra via, o método oferece a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação. Se comparados a outros métodos dominantes, como RAPD, os ISSR oferecem maior polimorfismo e portanto são considerados ferramentas mais eficientes para descrever padrões de diversidade genética em populações naturais e para delimitar espécies (ANAND et al., 2010).

Naturalmente, apesar das importantes vantagens, o método possui algumas desvantagens. Se por um lado apresenta maior polimorfismo que os marcadores RAPD, por outro, perde nesse quesito para outros métodos como SSR e AFLP (WOLFE e LISTON, 1998; ARCHAK et al., 2003). Além disso, por ser classificado como dominante, alguns fragmentos de DNA (comigrantes) de tamanho idêntico

podem ser interpretados como homólogos, apesar de representarem *loci* distintos (BUSSELL, WAYCOTT e CHAPPILL, 2005).

Apesar disso, os marcadores ISSR reúnem vantagens que vão além do alto percentual de polimorfismo, destacando-se também por não exigir o conhecimento prévio do genoma (SEMAGN et al., 2006), identificar sequências abundantes, permitir avaliar sequências de evolução rápida, ser uma técnica de manipulação simples, produzir dados robustos com baixo custo e alta velocidade (ESSELMAN et al., 1999; SHEN et al., 2006). Por tudo isso, esses marcadores tornaram-se, nos últimos anos, uma das principais técnicas moleculares especialmente no estudo de populações naturais, podendo ser aplicada com sucesso a qualquer grupo de organismos (WOLFE, XIANG e KEPHART, 1998; HOSSAIN et al., 2013).

Embora os marcadores ISSR tenham inicialmente sido mais utilizados em plantas cultivadas, mais recentemente esses marcadores vêm sendo empregados para investigar eventos de hibridização e poliploidização, além de estudos de diversidade genética em populações selvagens (JAMES e ABBOTT, 2005; WEISING et al., 2005; WOODS et al., 2005; WOLFE, 2005; GAO e YANG, 2006; SLOTTA e PORTER, 2006; de CASAS et al., 2007; HAN et al. 2007; HAIDER, NABULSI e KAMARY, 2012; MADESIS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; YANG et al., 2016). Em um estudo bastante recente, marcadores do tipo ISSR foram empregados para investigar a variabilidade morfológica e genética, além da relação existente entre espécies de *Salvia*, mostrando um elevado grau de variabilidade genética interespecífica para este gênero (SAFAEI et al., 2016). Ainda utilizando os ISSRs Santana et al., (2016) avaliaram a diversidade genética em uma população natural de cambui, *Myrciaria tenella* O. Berg, com intuito de direcionar as estratégias para formação e manutenção de bancos de germoplasma como forma de conservação da espécie no Brasil.

1.3 Orquídeas como modelo de estudo

As orquídeas podem representar bons modelos para investigações evolutivas, uma vez que existem ainda muitas lacunas no conhecimento de seus táxons, principalmente nas regiões tropicais (PEAKALL, 2007). O tamanho e a ampla distribuição da família são considerados fatores que dificultam a definição de relações

de parentesco nos variados níveis taxonômicos de Orchidaceae (FAY e CHASE, 2009) e, portanto, estudos focados em contribuir para a melhor caracterização e compreensão do grupo são sempre bem vindos.

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversas famílias de angiospermas com excepcional diversidade ecológica e morfológica (DRESSLER, 2005). As orquídeas são consideradas cosmopolitas, sendo que a maior variedade está nos trópicos, com predominância das formas epífitas e rupícolas (JOLY, 2002; PINHEIRO, BARROS e LOURENÇO, 2004). Como país neotropical, o Brasil é considerado um dos seus principais centros de diversidade (PINHEIRO, BARROS e LOURENÇO, 2004). Exemplo disso é o gênero *Zygopetalum* cuja maior parte dos representantes é encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, bem como nos estados da Bahia e Mato Grosso (PUPULIN, 2009).

O gênero *Zygopetalum* foi descrito em 1827 por Hooker e está inserido em Epidendroideae, maior subfamília de Orchidaceae com mais de 75% das espécies registradas (DRESSLER, 1993), dentro da qual concentram-se os principais conflitos taxonômicos da família. *Zygopetalum*, com 14 espécies aceitas hoje para o Brasil (FLORA DO BRASIL, 2017), é um gênero com problemas de delimitação de táxons, abrigando espécies com classificação taxonômica duvidosa devido à sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos, sobretudo folhas e flores (HOEHNE, 1953).

Nesse contexto, a presente proposta busca contribuir para a caracterização genética de espécies de *Zygopetalum* ocorrentes no território brasileiro. Nos dois primeiros capítulos, investigou-se populações de *Zygopetalum* valendo-se de ferramentas citogenéticas como contagem de número cromossômico e localização de genes ribossomais 5S e 45S, além de quantificação de DNA nuclear por citometria de fluxo e do comportamento meiótico. No presente capítulo, objetiva-se adotar uma abordagem de amplo espectro de forma a integrar os dados já obtidos para todas as populações.

Na busca por metodologias adicionais capazes de apontar diferenças entre os indivíduos pertencentes a diferentes populações, os marcadores moleculares do tipo *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), mostram-se como uma opção promissora em face de sua aplicação na investigação da variabilidade genética e da estrutura de populações. Estes marcadores já são largamente utilizados no estudo de gêneros de

orquídeas tais como *Cymbidium* (WANG et al., 2009; SHARMA et al., 2013), *Pseudolaelia* (MENINI NETO, 2011), *Calanthe* (QIAN, WANG e TIAN, 2013) e *Cattleya* (PINHEIRO et al., 2012; MORAES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015). Recentemente, com o objetivo de fundamentar estratégias de conservação, o estudo de Fajardo et al. (2017) empregou marcadores moleculares ISSRs para avaliar a diversidade genética e a estrutura de populações de *Cattleya granulosa*, espécie ameaçada extinção nativa da Floresta Atlântica brasileira. O trabalho revelou diferença genética significativa entre populações indicando isolamento por distância, reforçando que, para a manutenção da diversidade genética da espécie, é essencial a conservação de cada população.

Ainda que existem trabalhos com marcadores moleculares para a família Orchidaceae, para o gênero *Zygopetalum* ainda não há um estudo populacional com o emprego de marcadores moleculares do tipo ISSR. Somado a isso, é importante ressaltar que um estudo engajado em desvendar a origem de variação fenotípica e possíveis morfotipos de populações de *Zygopetalum* em região tropical, não trará conhecimento apenas para o grupo em questão, mas será também de grande valia, para o entendimento geral de processos de diversificação em plantas neotropicais.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar a variabilidade genética em populações de "*Zygopetalum maculatum*", abrangendo sua distribuição geográfica no Brasil e uma população na Bolívia. Para tanto, foram empregados marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

2.1 Objetivos específicos

1) Caracterizar a diversidade genética entre e dentro de populações de "*Zygopetalum maculatum*", abrangendo sua distribuição geográfica no Brasil e uma população na Bolívia;

2) Relacionar a diversidade genética detectada aos diferentes níveis de ploidia dos indivíduos de “*Zygopetalum maculatum*”.

3 MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Para este estudo foram coletadas amostras de orquídeas em 20 localidades no Brasil, uma na Bolívia, e uma amostra foi obtida no orquidário Colibri em São Lourenço da Serra (Tabela 1). Durante a coleta foi respeitado um espaçamento entre os pontos de amostragem a fim de se evitar coleta de clones (ARNAUD-HAOND, 2007). Um total de 91 indivíduos foram amostrados, sendo destes 89 do gênero *Zygopetalum*, 1 de *Pabstia* e 1 de *Neogardneria murrayana* (Gardner ex Hook.) Schltr. As plantas foram identificadas com um código conforme ilustra a tabela 1. O material utilizado como grupo externo (GE) teve a ploidia estimada previamente por citometria de fluxo. Amostras de folhas foram desidratadas e armazenadas em sílica gel, sendo até cinco indivíduos por população cultivados para elaboração de material testemunho, a ser depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Tabela 1 – Localidades de coleta e identificação do material de *Zygopetalum* em estudo

| Localidade/estado | Registro |
|---------------------|----------|
| Bocaina/SP | ZM039 |
| Bocaina/SP | ZM043 |
| Bocaina/SP | ZM044 |
| Bocaina/SP | ZM059 |
| Bocaina/SP | ZM062 |
| Bocaina/SP | ZM155 |
| Bocaina/SP | ZM064 |
| Bocaina - Bacia/SP | ZM058 |
| Finas/MG | ZM012 |
| Finas/MG | ZM168 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM006 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM025 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM120 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM130 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM131 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM135 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM140 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM147 |
| Pico do Garrafão/SP | ZM007 |
| Pico do Itambé/MG | ZM179 |
| Pico do Itambé/MG | ZM184 |
| Pico do Itambé/MG | ZM187 |
| Pico do Itambé/MG | ZM340 |
| Pico do Itambé/MG | ZM341 |
| Pico do Itambé/MG | ZM342 |
| Pico do Itambé/MG | ZM343 |
| Pico dos Marins/SP | ZM103 |
| Pico dos Marins/SP | ZM105 |
| Pico dos Marins/SP | ZM106 |
| Pico dos Marins/SP | ZM107 |
| Pico dos Marins/SP | ZM108 |
| Pico dos Marins/SP | ZM110 |
| Pico dos Marins/SP | ZM112 |
| Pico Paraná/PR | ZM127 |
| Pico Paraná/PR | ZM128 |
| Pico Paraná/PR | ZM151 |
| Pico Paraná/PR | ZM152 |
| Pico Paraná/PR | ZM154 |
| Pico Paraná/PR | ZM165 |
| Pico Paraná/PR | ZM126 |
| Serra do Cipó/MG | ZM075 |
| Serra do Cipó/MG | ZM076 |

| | |
|---------------------------|-------|
| Serra do Cipó/MG | ZM078 |
| Serra do Cipó/MG | ZM125 |
| Serra do Pitengo/MG | ZM381 |
| Serra do Pitengo/MG | ZM383 |
| Serra do Pitengo/MG | ZM395 |
| Serra do Pitengo/MG | ZM398 |
| Serra do Pitengo/MG | ZM403 |
| Parque das Andorinhas/MG | ZM237 |
| Parque das Andorinhas/MG | ZM242 |
| Parque das Andorinhas/MG | ZM245 |
| Parque das Andorinhas/MG | ZM250 |
| Parque das Andorinhas/MG | ZM254 |
| São Thomé das Letras/MG | ZM209 |
| São Thomé das Letras/MG | ZM215 |
| São Thomé das Letras/MG | ZM219 |
| São Thomé das Letras/MG | ZM221 |
| São Thomé das Letras/MG | ZM223 |
| Serra do Desbarrancado/BA | ZM406 |
| Serra do Desbarrancado/BA | ZM407 |
| Serra do Desbarrancado/BA | ZM408 |
| Serra do Desbarrancado/BA | ZM435 |
| Paty de Alferes/RJ | ZM461 |
| Paty de Alferes/RJ | ZM466 |
| Paty de Alferes/RJ | ZM469 |
| Pedra Dubois/RJ | ZM490 |
| Pedra do Gado/MG | ZM575 |
| Pedra do Gado/MG | ZM581 |
| Pedra do Gado/MG | ZM585 |
| Pedra do Gado/MG | ZM587 |
| Pedra do Gado/MG | ZM596 |
| Pedra D'Água/MG | ZM635 |
| Pedra D'Água/MG | ZM642 |
| Pedra D'Água/MG | ZM649 |
| Pedra D'Água/MG | ZM653 |
| Pedra D'Água/MG | ZM655 |
| Padre Ângelo/MG | ZM555 |
| Padre Ângelo/MG | ZM558 |
| Padre Ângelo/MG | ZM564 |
| Padre Ângelo/MG | ZM571 |
| Padre Ângelo/MG | ZM573 |
| Pico do Pinhão/MG | ZM351 |
| Pico do Pinhão/MG | ZM370 |
| Pico do Pinhão/MG | ZM676 |
| Pico do Pinhão/MG | ZM680 |
| Pico do Pinhão/MG | ZM685 |

| | |
|------------------------------------|--|
| PE de Ibitipoca/MG | 180 |
| PE de Ibitipoca/MG | 195 int. |
| PE de Ibitipoca/MG | 198 int. |
| PE de Ibitipoca/MG | 205 int. |
| PE de Ibitipoca/MG | 220 |
| Coroico/NOR/Bolívia | BOL 1 |
| Coroico/NOR/Bolívia | BOL 2 |
| Coroico/NOR/Bolívia | BOL 3 |
| Pico Monte Crista/SC | ZM692 (<i>Pabstia</i> spp. *) |
| Reprodução Orquidário Colibri | ZM693 (<i>Z. maxillare</i> *) |
| Próximo a Serra das Sete Curvas/ES | ZM494 (<i>Z. pabstii</i> *) |
| Próximo a Serra das Sete Curvas/ES | ZM499 (<i>Z. pabstii</i> *) |
| Próximo a Serra das Sete Curvas/ES | ZM503 (<i>Z. pabstii</i> *) |
| P. M. da Serra das Lontras/BA | ZM451 (<i>Z. crinitum</i> *) |
| P. M. da Serra das Lontras/BA | ZM456 (<i>Z. crinitum</i> *) |
| Pico do Garrafão/SP | PED 1 (<i>Z. pedicellatum</i> *) |
| Pico do Garrafão/SP | PED 2 (<i>Z. pedicellatum</i> *) |
| Pico do Garrafão/SP | PED 3 (<i>Z. pedicellatum</i> *) |
| Padre Ângelo/MG | NEO (<i>Neogardneria murrayana</i> *) |

*Grupo externo. A amostragem corresponde à disponibilidade de material biológico para cada população e busca cobrir a ocorrência dos três citótipos identificados no estudo citogenético do capítulo II.

3.2 Extração de DNA

O DNA total foi extraído de folhas frescas ou desidratadas em sílica gel com o auxílio do kit para extração de DNA genômico de plantas NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel), seguindo-se todas as especificações do fabricante. A qualidade do ácido nucléico foi avaliada em géis de agarose a 1%, enquanto a quantidade de DNA genômico foi verificada por quantificação em espectrofotômetro nanométrico (Nanodrop™). Foram consideradas adequadas as amostras que apresentaram a razão 260/280 e a razão 260/230 entre 1,8 e 2,0. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização nas reações de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Para as amostras que não apresentaram o padrão considerado adequado tanto na pureza e concentração quanto na integridade, o DNA foi novamente extraído, conforme protocolo descrito acima.

3.3 PCR e seleção dos iniciadores de ISSR

Dezenove *primers* ISSR (*University of British Columbia*) foram inicialmente testados (Tabela 2). Para cada iniciador a ser validado foram utilizados nove indivíduos do complexo “*Zygopetalum maculatum*”. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X por 45 min. a 100V. Dentre os *primers* testados, dez apresentaram melhor resolução de amplificação e polimorfismo, sendo portanto, selecionados para o estudo (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* de ISSR avaliados para o estudo de diversidade genética no gênero *Zygopetalum*

| <i>Primer</i> | Sequência do iniciador (5'-3') | T°C |
|---------------|--------------------------------|------|
| UBC-809 | AGAGAGAGAGAGAGAGG | 48,2 |
| UBC-823 * | TCTCTCTCTCTCTCC | 48,1 |
| UBC-841 | GAGAGAGAGAGAGAYC | 48,5 |
| UBC-808 * | AGAGAGAGAGAGAGGC | 48,8 |
| UBC-842 * | GAGAGAGAGAGAGAYG | 48,8 |
| UBC-854 | TCTCTCTCTCTCTCRG | 50,0 |
| UBC-835 * | AGAGAGAGAGAGAGAYC | 50,2 |
| UBC-818 * | CACACACACACACAG | 51,0 |
| UBC-820 | GTGTGTGTGTGTGTGTC | 51,0 |
| UBC-830 | TGTGTGTGTGTGTGTGG | 52,7 |
| UBC-848 | CACACACACACACARG | 52,7 |
| UBC-850 * | GTGTGTGTGTGTGTGYC | 52,7 |
| UBC-826 | ACACACACACACACC | 52,8 |
| UBC-827 | ACACACACACACACG | 53,0 |
| UBC-851 * | GTGTGTGTGTGTGTGYG | 53,0 |
| UBC-847 * | CACACACACACACARC | 53,1 |
| UBC-829 | TGTGTGTGTGTGTGTC | 53,4 |
| UBC-857 * | ACACACACACACACYG | 54,3 |
| UBC-859 * | TGTGTGTGTGTGTGRC | 54,5 |

T°C = Temperatura de anelamento. **Primer* polimórfico selecionado para o estudo de *Zygopetalum*

Para cada um dos dez *primers* escolhidos, a temperatura de anelamento foi ajustada a fim de melhorar a resolução de leitura no gel. O DNA genômico das amostras foi, então, usado para amplificação através da PCR. A técnica foi realizada com o kit GoTaq®Flexi Promega, em um volume de 25 µl tampão 1X, 0,5 µM *primer*, 2 mM MgCl₂, 0,15 mM dNTP, 1 unidade de Taq DNA Polimerase e 30ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycle, e foram obedecidas as seguintes condições: uma fase inicial de

desnaturação a 94°C por 4min, seguido por 45 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 45seg, 72°C por 2min e um passo de extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos da amplificação foram carregados em géis de agarose 2% e submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X por 90 min a 110V. Os géis foram previamente corados com solução para coloração de gel SYBR® Safe DNA (Invitrogen™). As imagens dos géis foram capturadas em transiluminador UVP *GelDoc-It Imaging System* e analisadas utilizando-se o programa *Vision Works LS*. O peso molecular dos fragmentos foi estimado utilizando-se 5µl do marcador 1kb plusDNA Ladder (Invitrogen™).

3.4 Análise de dados

Para a análise de similaridade, os *loci* de ISSR foram codificados visualmente como presença (1) ou ausência (0) de uma banda para a construção de uma matriz binária de fenótipos. Foram consideradas homólogas todas as bandas de mesmo tamanho molecular em um mesmo *primer* (WILLIAMS et al., 1993). Os coeficientes de similaridade de Jaccard calculados para cada combinação de pares de acessos sendo utilizado para construir um dendrograma e os valores de *bootstrap* foram obtidos conforme o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do *software* NTSYS (ROHLF, 2000) e PAST (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

4 RESULTADOS

Os dez *primers* selecionados produziram um total de 82 bandas, correspondendo, em média, a 8,2 bandas por *primer*, com tamanho variando de 200 a 950 pb. Todos os 82 *loci* obtidos neste estudo de ISSR foram considerados polimórficos. Os iniciadores UBC-835 e UBC-857 foram os que revelaram o maior número de bandas polimórficas (11), enquanto o UBC-859 foi o iniciador menos informativo, apresentando apenas seis bandas (Tabela 3). Os dez *primers* de ISSR empregados geraram fragmentos de DNA amplificados em todos os 91 indivíduos analisados. A figura 1 ilustra o perfil de amplificação do *primer* UCB-835, um dos mais polimórficos.

Tabela 3 – Sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento e número de bandas polimórficas para um conjunto de dez iniciadores utilizados no estudo da diversidade genética no complexo “*Zygopetalum maculatum*”

| Iniciador | Sequência do iniciador (5'-3') | T °C | Bandas |
|-----------|--------------------------------|------|--------|
| UBC-808 | AGAGAGAGAGAGAGAGC | 48,8 | 7 |
| UBC-818 | CACACACACACACACAG | 51,0 | 10 |
| UBC-823 | TCTCTCTCTCTCTCC | 48,1 | 7 |
| UBC-835 | AGAGAGAGAGAGAGAGYC | 50,2 | 11 |
| UBC-842 | GAGAGAGAGAGAGAGAYG | 48,8 | 8 |
| UBC-847 | CACACACACACACARC | 53,1 | 7 |
| UBC-850 | GTGTGTGTGTGTGTGYC | 52,7 | 7 |
| UBC-851 | GTGTGTGTGTGTGTGYG | 53,0 | 8 |
| UBC-857 | ACACACACACACACYG | 54,3 | 11 |
| UBC-859 | TGTGTGTGTGTGTGRC | 54,5 | 6 |

T°C = Temperatura de anelamento.

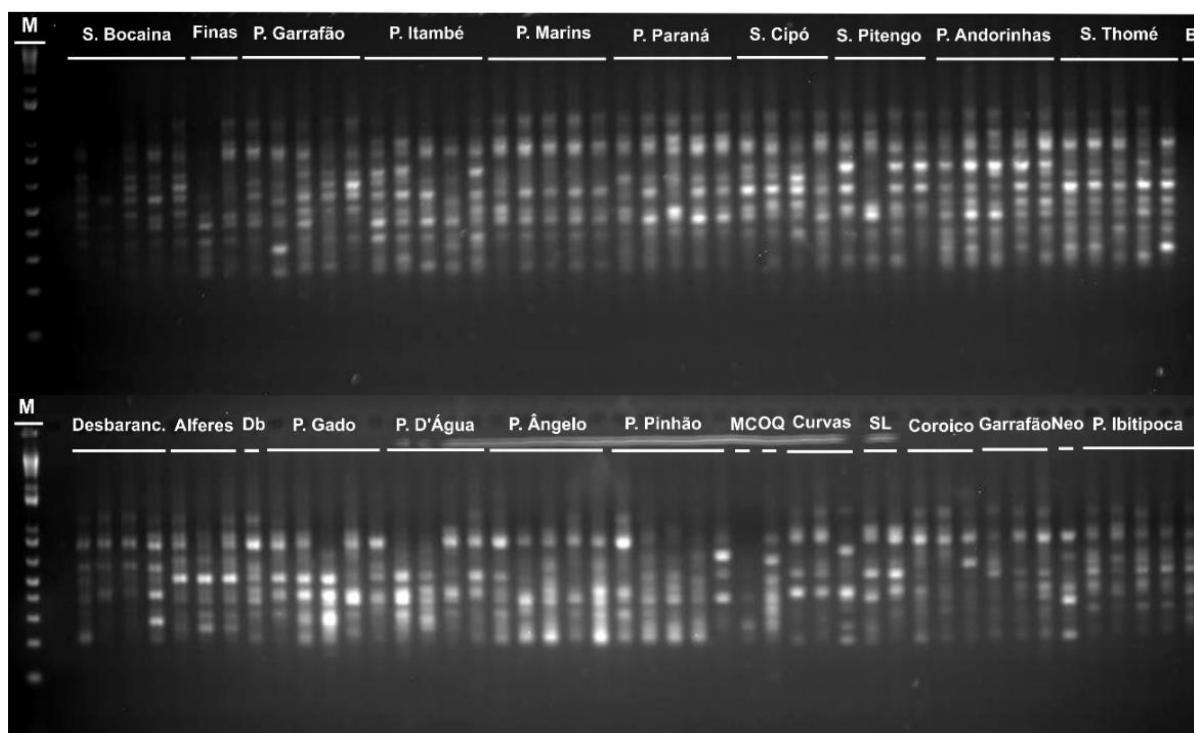


Figura 1 - Perfil representativo de amplificação de marcadores ISSR (*primer* UBC-835) de um conjunto de indivíduos pertencentes a 22 populações de *Zygopetalum*, uma de *Neogardneria murrayana*, uma de *Pabstia* sp. E um indivíduo de *Zygopetalum maxillare* do Orquidário Colibri. M = marcador de 1Kb plus; B = branco; S. Bocaina=Serra da Bocaina; P. Garrafão=Pico do garrafão; P. Itambé=Pico do Itambé; P. Marins=Pico dos Marins; S. Cipó=Serra do Cipó; S. Pitengo=Serra do Pitengo; P. Andorinhas=Parque das Andorinhas; S. Thomé=São Thomé das Letras; Desbaranc=Serra do Desbarancado; Alferes=Paty de Alferes; Db=Pedra Dubois; P. Gado=Pedra do Gado; P. D'Água=Pedra D'Água; P. Ângelo; P. Pinhão; MC = Monte Crista; OQ=Orquidário Colibri; Curvas=Serra das Sete Curvas; SL = Serra das Lontras; Coroico=Coroico Bolívia; Garrafão=Pico do Garrafão; Neo=*Neogardneria murrayana*; P. Ibitipoca=Parque Estadual do Ibitipoca.

Por meio de um dendrograma de distâncias genéticas baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard (Figura 2), observou-se que o menor valor de similaridade genética dentro do complexo "*Z. maculatum*" (0,208) foi observado entre os indivíduos BOL 2 de Coroico e ZM680 do Pico do Pinhão. Por outro lado, o maior valor (0,969) foi observado entre os indivíduos 205 e 198, ambos do Parque Estadual do Ibitipoca (PEI). O menor índice de similaridade geral foi entre ZM155 de Serra da Bocaina e ZM693 (*Z. maxillare*) do Orquidário Colibri.

O maior valor de *bootstrap* (100%) foi para o ramo onde concentraram-se os indivíduos de maior ploidia (amarelo no dendrograma). No total foram identificados 31 ramos com valores de *bootstrap* acima de 50%, ressalta-se que 5 desses ramos são sustentados por *bootstrap* acima de 90% (Figura 2).

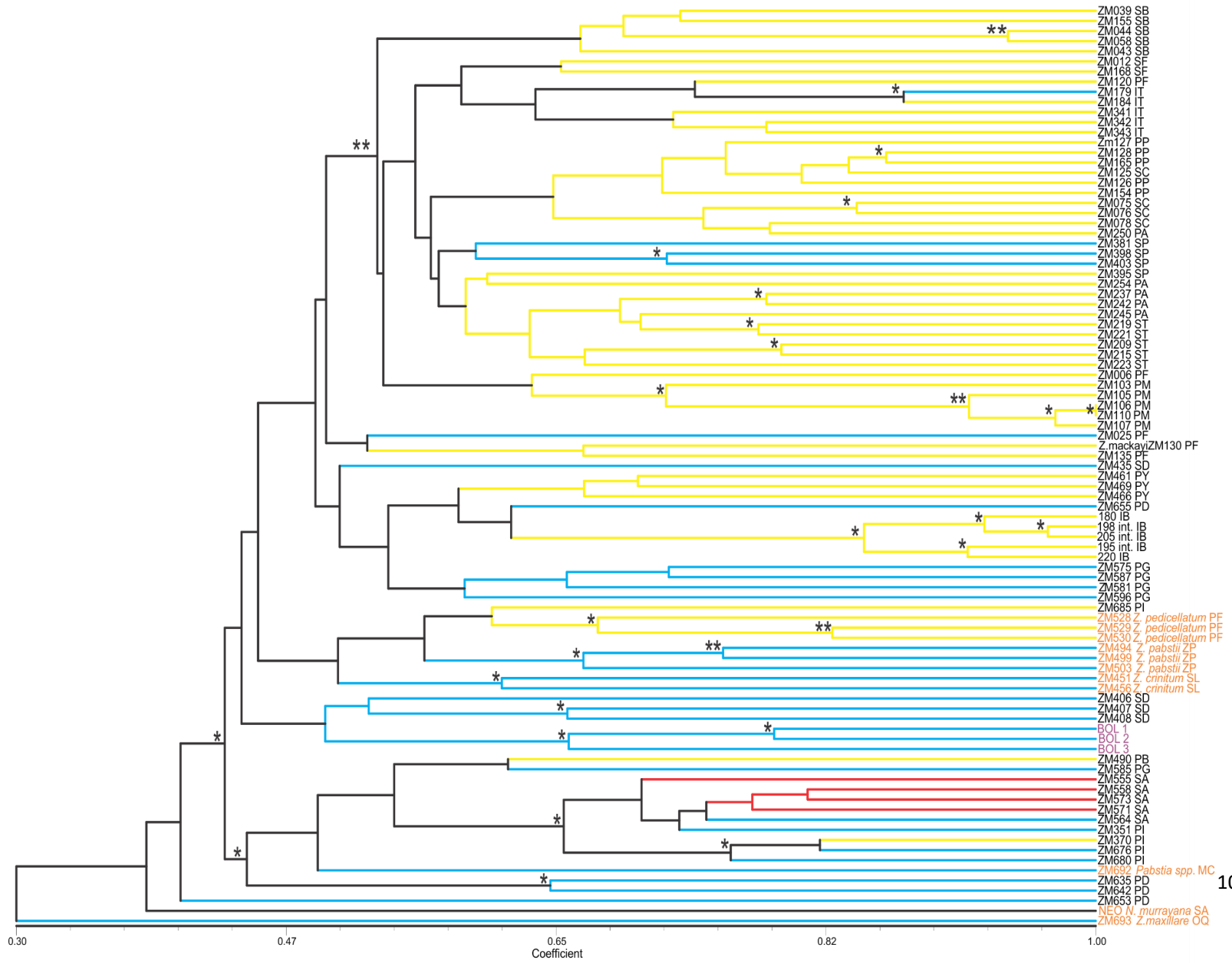


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética entre 91 indivíduos (89 do gênero *Zygopetalum*, 1 de *Pabstia* e 1 da espécie *Neogardneria murrayana*), obtido a partir de dez marcadores ISSR, pelo método de agrupamento UPGMA e coeficiente de Jaccard. As cores indicam as quantidades de DNA correspondentes aos números cromossômicos, como a seguir: azul = 7,36 pg (2n=48); vermelho = 10,52pg (2n=72) e amarelo = 14,09pg (2n=96) . Nomes destacados pela cor laranja representam grupos externos ao complexo “*Zygopetalum maculatum*” e em roxo indicam a população da Bolívia, possível centro de origem de *Zygopetalum*. As estimativas de quantidade de DNA foram obtidas por citometria de fluxo. *representa valores de *bootstrap* acima de 50 e **valores de *bootstrap* acima de 90.

A partir de dados obtidos por citometria de fluxo e descritos no capítulo II 62,64% dos indivíduos amostrados apresentam 2C=7,36pg; 31,87% apresentam 2C=14,09pg e apenas 4,39% apresentam 2C=10,52pd de DNA. A análise do dendrograma em associação com as informações sobre o de nível de ploidia indica a formação de dois grandes grupos, um composto quase exclusivamente por citótipos com 2C=14,09pg (*bootstrap*=100%) e um segundo grande grupo onde encontram-se principalmente os citótipos com 2C=7,36 e 10,52 pg, incluindo os 11 indivíduos considerados como grupo externo (GE) ao complexo “*Z. maculatum*” (Tabela 1).

Salvo poucas exceções, indivíduos de mesma origem e da mesma espécie, agruparam-se mostrando mais similares entre si quando comparados a amostras coletadas em populações diferentes. Na localidade Pico do Garrafão, foram amostrados “*Z. maculatum*” e *Z. pedicellatum* (GE), sendo os primeiros agrupados entre os indivíduos com 2C=14,09pg, enquanto *Z. pedicelatum* foi posicionado no ramo onde ocorrem majoritariamente os citótipos com 2C=7,36 3 10,52pg de DNA. Duas populações destacaram-se por apresentarem os maiores índices de similaridade entre seus indivíduos e elevados valores de *bootstrap*: Pico dos Marins (*bootstrap*=98%) e Parque Estadual do Ibitipoca (PEI) (*bootstrap*=81%), nas quais os valores de coeficiente de similaridade variam de 0,702 a 1,00 e de 0,821 a 0,969, respectivamente. Para o citótipo mais raro amostrado, 2C=10,52pg, os valores de similaridade oscilaram entre 0,689 a 0,813 quando considerados apenas indivíduos com 2C=10,52pg, coletados na mesma população (Padre Ângelo). No entanto, um indivíduo 2C=7,36pg identificado nesta população, mostrou-se mais similar aos indivíduos 2C=10,52pg simpátricos do que aos indivíduos 2C=7,36pg das demais populações.

Dentre os grupos externos, *Neogardneria murrayana* e *Z. maxillare* mostraram-se como os mais distantes geneticamente dos indivíduos de “*Z. maculatum*”, aparecendo em ramos separados. Os demais grupos externos (*Z. pedicellatum*, *Z. crinitum*, *Z. pabstii* e *Pabstia* sp.) não foram agrupados em ramos isolados do

complexo “*Z. maculatum*”, mostrando-se mais similares aos indivíduos 2C=7,36pg e 2C=10,52pg de DNA. Nenhum dos indivíduos utilizados, a *priori* como grupo externo, caiu no grupo formado majoritariamente pelo citótipo 2C=14,09pg de DNA.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo o uso de dez *primers* gerou 82 bandas polimórficas que permitiram o agrupamento por similaridade de alguns dos indivíduos avaliados. Diversos estudos comprovam que o emprego de marcadores ISSR é capaz de avaliar a diversidade genética em populações de plantas. Jimenez et al. (2015), com um número de bandas polimórficas próximo ao obtido neste estudo (seis *primers* e 83 bandas) discriminaram com sucesso genótipos de 38 indivíduos em populações naturais de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). De acordo com Santana et al. (2016) os 71 *loci* obtidos a partir de 10 *primers* foram suficientes para avaliar a diversidade genética em uma população natural de cambui (*Myrciaria tenella* O. Berg). Em outro estudo, Silva et al. (2014b) analisaram a diversidade e estrutura genética de jenipapo (*Genipa americana* L.) com o uso de 12 *primers*. Santana et al. (2011) caracterizaram a variabilidade genética entre acessos umbu-cajazeira (*Spondias* sp) a partir da seleção de 15 *primers*.

Para Orchidaceae, os ISSRs também podem ser ferramentas valiosas no estudo da diversidade genética intra e interespecífica como mostrado por Rodrigues et al. (2015) em um estudo taxonômico do gênero *Cattleya*, onde 253 bandas polimórficas obtidas a partir de 13 *primers* ajudaram esclarecer as relações entre *C. coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* Van den Berg. Também no gênero *Cattleya*, Pinheiro et al. (2012) avaliaram a diversidade e estrutura genética de populações, principalmente da espécie *C. labiata*, contribuindo para o direcionamento de programas de conservação de modo a preservar a diversidade identificada nas populações.

Embora o método utilizado para gerar o dendrograma não leve em conta aspectos evolutivos e possa ainda subestimar as diferenças devido à saturação na substituição de nucleotídeos ao longo do tempo, foi possível evidenciar a formação de grupos coerentes com dados previamente gerados e descritos nos capítulos I e II.

Os resultados relativos à diversidade genética no complexo “*Z. maculatum*” sugerem que, em sua maioria, os agrupamentos mostram alguma relação direta com a origem dos materiais, pois, conforme o esperado, indivíduos de mesma população mostraram maior similaridade genética entre si, evidenciando que indivíduos simpátricos são mais próximos geneticamente. Os dados, portanto indicam diversidade interpopulacional maior que a variação intrapopulacional. Esse padrão de agrupamento por localidade já foi observado em outro gênero de orquídeas, investigado por meio de marcadores ISSR. Qian, Wang e Tian (2013) mostraram maior nível de diferenciação genética entre seis populações *Calanthe tsoongiana* Tang & F. T. Wang do que dentro das mesmas populações, os autores então, associaram os resultados ao fluxo genético restrito devido à fragmentação do *habitat* e à redução do tamanho populacional. Tal justificativa também poderia aplicar-se ao presente estudo, uma vez que a maioria das populações encontram-se distantes geograficamente, dificultando possíveis cruzamentos interpopulacionais.

Outro fator que parece estar relacionado à posição dos terminais no dendrograma é o nível de ploidia dos indivíduos. Percebe-se uma diferenciação do citótipo de maior nível de ploidia em relação aos outros citótipos. De acordo com dendrograma, a grande maioria dos indivíduos com $2C=14,09pg$ de DNA, que representam 62,64% de toda a amostragem, foram agrupados em um ramo único, indicando maior similaridade genética dentro deste grupo comparativamente aos demais citótipos avaliados. Esse fato pode relacionar-se ainda à distribuição geográfica das populações, uma vez que os indivíduos $2C=14,09pg$ concentram-se na região Sul e Sudeste do Brasil, enquanto os demais citótipos são oriundos de estados ao norte da região Sudeste e do Nordeste (Bahia). Essa disposição espacial pode dificultar o fluxo gênico entre os citótipos mais distantes geograficamente e acentuar as similaridades entre os indivíduos $2C=14,09pg$. Sica et al. (2005) diferenciaram populações de *Asparagus acutifolius* L. de acordo com sua localidade de origem confirmando a influência da disposição geográfica na estruturação de populações geneticamente distinguíveis. Wang e Ruan (2012) também identificaram grau relativamente elevado de diferenciação entre populações diploides e poliploides de *Camellia reticulata* Lindl.

Uma terceira explicação para a maior distância genética dos $2c=14,09pg$ em relação aos outros níveis de ploidia pode estar relacionada ao modo de reprodução.

É plausível que, graças à complexidade meiótica comum a genomas poliploides (LEVIN, 2002; RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; GAETA e PIRES, 2010; LARROSA, et al., 2012), os indivíduos de “*Z. maculatum*” estejam recorrendo a meios de reprodução assexuada, como propagação vegetativa e apomixia (ASKER e JERLING 1992, HÖRANDL e HOJGAARD, 2012). Dessa forma, a similaridade genética mantém-se mais conservada dentro de cada grupo de citótipos, justificando os agrupamentos observados no dendrograma.

A população do Parque Estadual do Ibitipoca (PEI) merece uma análise mais detalhada. No PEI há a descrição da ocorrência de uma possível zona híbrida envolvendo as espécies *Z. maculatum* e *Z. triste*, ambas pertencentes ao complexo “*Z. maculatum*”. Além dessas duas espécies, observou-se grande número de indivíduos com várias formas e coloração diferenciadas nas flores dificultando a classificação dos mesmos (comunicação pessoal). Um ramo apenas com os indivíduos do PEI foi formado, no qual indivíduos com características de *Z. maculatum* (indivíduo 220) e de *Z. triste* (indivíduo 180) são mais distantes entre si, ocupando as extremidades do ramo. Os prováveis híbridos ocuparam posições intermediárias em relação aos possíveis parentais, sendo dois deles mais similares ao *Z. triste* e um mais próximo de *Z. maculatum*. Apesar desta disposição, os coeficientes de similaridade entre os indivíduos foram altos (em média 0,884), sendo 0,842 entre *Z. triste* e *Z. maculatum*, impossibilitando uma delimitação consistente das espécies com base nos dados obtidos. Um estudo focado na população do PEI e que abranja uma amostragem maior, seria de grande contribuição para o melhor entendimento sobre a formação e dinâmica desta possível zona de contato entre espécies de “*Z. maculatum*”.

A população de Pico dos Marins foi a única para a qual observou-se possíveis clones. Dois dos seus indivíduos apresentaram coeficiente de similaridade igual a 1. Reconhecidamente orquídeas propagam-se por reprodução assexuada (CRIBB e GASSON, 1982), portanto é perfeitamente possível que durante a etapa de coleta tenham sido coletados dois indivíduos idênticos geneticamente, gerados por propagação vegetativa, mesmo tendo sido respeitado o espaçamento recomendado para estudos com espécies clonais (ARNAUD-HAOND, 2007). A ampliação do número de marcadores pode confirmar a homogeneidade genética observada.

A população da Bolívia, que representa a localidade tipo de *Zygopetalum* na região dos Andes, é constituída por indivíduos “*Z. maculatum*” com $2C=7,36pg$ de DNA. Todas as suas amostras agruparam-se em um único ramo demonstrando maior relação de similaridade (em média 0,499) com os indivíduos de “*Z. maculatum*” ($2C=7,36pg$) da Serra do Pitengo. De forma mais abrangente, há também relação de similaridade da população de Coroico com outras populações brasileiras de *Zygopetalum*, como *Z. crinitum*, *Z. pabstii*, *Z. pedicellatum* (não incluídos no complexo “*Z. maculatum*”) e além de populações do complexo “*Z. maculatum*”. O menor nível de ploidia observado na população que provavelmente é o centro de origem dos demais citótipos é consistente com a hipótese de que genomas menores tendem a servir de base para genomas maiores (SOLTIS et al., 2003). Além disso, a relação de similaridade dos *Zygopetalum* bolivianos com uma população de “*Z. maculatum*” no Brasil, também com $2C=7,36pg$, reforça a hipótese de que a população dos Andes tem participação na formação deste citótipo e possivelmente na origem dos outros citótipos de “*Z. maculatum*” estabelecidos no território brasileiro. Yang et al. (2006) observaram alta similaridade entre os perfis de marcadores moleculares ISSR, RAPD e de cpDNA entre os diploides e tetraploides do complexo poliploide “*Chrysanthemum indicum*” e sugeriram uma origem autopoliploide para os citótipos $2n=4x$ a partir dos citótipos $2n=2x$. Tradicionalmente, a autopoliploidia foi considerada rara em populações naturais por reduzir a fertilidade devido à distribuição irregular dos cromossomos na meiose gerada pela disjunção desigual de multivalentes (STEBBINS, 1947). Entretanto, essa teoria vem perdendo força graças às sucessivas descrições de autopoliploides naturais (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998, ver REIS et. al., 2014).

A duplicação do material genético aumenta a diversidade genética (SOLTIS e SOLTIS, 2000) e oferece vantagens adaptativas aos poliploides, o que pode contribuir para a expansão desses genomas em locais onde os diploides, ou genomas progenitores são escassos ou inexistentes. Pode ser esta a explicação para populações exclusivamente $2C=14,09pg$ de DNA de “*Z. maculatum*” distribuídas principalmente na região Sul e Sudeste. Tetraploides do complexo “*Chrysanthemum indicum*” são amplamente distribuídos em regiões de média e baixa altitude na China, enquanto os diploides são estritamente limitados geograficamente. Esta diferenciação

adaptativa é provavelmente consequência da diversidade genética aumentada dos 4x em relação aos citótipos 2x (YANG et. al., 2006).

É interessante ressaltar que os indivíduos 2C=7,36pg mais similares ao citótipo 2C=14,09pg foram coletados em populações mistas (Pico do Itambé e Serra do Pitengo) da região de Minas Gerais onde parece haver uma zona de contato entre citótipos. Este cenário sugere que os 2C=7,36pg dessas populações podem ter envolvimento na formação dos 2C=14,09pg. De forma complementar, as amostras 2C=14,09pg do Pico do Pinhão que mostram-se mais similares aos citótipos 2C=7,36pg e 2C=10,52pg também são provenientes desta provável zona de contato.

Com relação ao citótipo 2C=10,52pg, as inferências devem ser cautelosas, isso porque, esse citótipo - em decorrência da menor disponibilidade de material vegetal - foi amostrado em apenas uma população mista (Padre Ângelo). Conforme esperado, os quatro indivíduos 2C=10,52pg e o 2C=7,36pg agruparam-se no mesmo ramo, sugerindo similaridade entre os genótipos e a possibilidade de que o 2C=10,52pg tenha origem relacionada aos 2C=7,36pg desta população. Apesar da cautela na elaboração de hipóteses a cerca deste citótipo, sua menor ocorrência pode ser consequência também de sua menor frequência nas populações, evidenciando possivelmente uma combinação genética aparentemente mais recente ou menos vantajosa do ponto de vista adaptativo.

Por fim, merece ser destacado o fato de que duas populações mistas (Pico do Pinhão e Serra do Padre Ângelo) e muito próximas geograficamente, compartilham importante similaridade entre seus indivíduos, de forma que os mesmos emergiram no único ramo onde foram registrados os três citótipos deste estudo. Essas localidades situam-se na possível zona de contato dos diferentes citótipos, e podem representar um ponto importante de cruzamentos entre citótipos, e a consequente expansão de linhagens poliploides.

6 CONCLUSÕES

- Foi comprovada a eficiência dos *primers* selecionados em permitir agrupamentos entre as populações estudadas.

- A variabilidade genética detectada ocorre predominantemente entre populações.
- Apesar de alguns agrupamentos e da detecção de variabilidade genética entre as localidades estudadas, em geral há baixa diversidade entre as populações.
- Indivíduos com o mesmo nível de ploidia apresentaram tendência a formar grupos mais uniformes.

CAPÍTULO V – CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho reuniu dados cromossômicos, de quantidade de DNA e de diversidade genética sobre o gênero *Zygopetalum* (Orchidaceae), possibilitando ampliar o conhecimento sobre aspectos genéticos deste grupo. Tomados em conjunto, os resultados de estimativa do valor 2C, morfometria e número cromossômico, números de marcas indicativas de genes ribossomais 5S e 45S, análise do comportamento meiótico e estimativa de similaridade genética, sugerem que a poliploidia provavelmente está envolvida na evolução das espécies de *Zygopetalum* e pode ser uma das responsáveis pela variação fenotípica dentro do complexo "*Zygopetalum maculatum*".

Os elevados índices de irregularidade na meiose são fortes indicativos de falhas no pareamento e na segregação cromossômica, fenômeno bastante comum em poliploides. É possível que cruzamentos envolvendo gametas não reduzidos e, ou eventos de poliploidização tenham ocorrido espontaneamente. Esta inferência suporta a hipótese de que os indivíduos com menor número cromossômico ($2n=48$), ainda que também sejam poliploides, por terem apresentado menores índices de anormalidade, sejam mais antigos que aqueles com $2n=72$ e 96 cromossomos.

A análise de similaridade genética evidenciou agrupamentos dos indivíduos conforme os níveis de ploidia e os locais de origem. Em linhas gerais, foi possível identificar que há maior variabilidade entre as populações do que dentro das mesmas.

Todas as indicações sustentam, portanto, a hipótese de que o complexo "*Zygopetalum maculatum*" seja formado por uma série poliploide com distribuição geográfica não aleatória dos níveis de ploidia observados. O gênero *Zygopetalum* constitui um excelente modelo para estudo dos padrões de diversificação e especiação em ambiente tropical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, p. 135-141. 2005.

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, v. 27, n. 4, p. 617-631. 2008.

ÁLVARES-CARVALHO, S. V.; DUARTE, F. F.; SANTOS, T. C.; SANTOS, R. M.; SILVA-MANN, R.; CARVALHO, D. Structure and genetic diversity of natural Brazilian pepper populations (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Genetics and Molecular Research*, v. 15, v. 2, p. 1-13. 2016.

ANAND, K. K.; SRIVASTAVA, R. K.; CHAUDHARY, L. B.; SINGH, A. K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. *Taiwania*, v. 55, p. 197-207, 2010.

ANTONELLI, A.; SANMARTÍN, I. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, v. 60, n. 2, p. 403-414. 2011.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, p. 1–20. 2016.

ARCHAK, S.; GAIKWAD, B.; GAUTAM, D.; RAO, V.; SWAMY, M.; KARIHALOO, L. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*, v. 46, p. 362-369. 2003.

ARNAUD-HAOND, S.; DUARTE, C. M.; ALBERTO, F.; SERRAO, E. A. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 5115-5139. 2007.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, M. S.; BLANK, A. F.; RABBANI, A. R. C.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, J. B.; COSTA, A. S.; MENEZES, T. S. A. Analysis of genetic diversity of Laeliinae (Orchidaceae) in the State of Sergipe using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, p. 1-9. 2015.

ARTELARI, R.; GEORGIUO, O. Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area, Greece. III. *Limonium* on the Islands Kithira and Antikithira and the surrounding islets. *Nordic Journal of Botany*, v. 22, p. 483-501. 2003.

ASKER, S. E.; JERLING, L. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton. 1992.

ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS NETO, E.; PINHEIRO, F.; SILVA, A. E. B.; FÉLIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosomal distribution. *Celular e Molecular Biology Letters*, v. 11, p. 214-230. 2013.

BANIAGA, A. E.; ARRIGO, N.; BARKER, M. S. The Small Nuclear Genomes of *Selaginella* Are Associated with a Low Rate of Genome Size Evolution. *Genome Biology and Evolution*, 8 (5): 1516-1525. 2016.

BARROS, F. ANÁLISE MULTIVARIADA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS DOS CAMPOS RUPESTRES DO BRASIL. 1999. 206 f. Tese (Doutorado Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

BARROS, F. Notas taxonômicas para as espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platyste*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica*, v. 10, p. 139-151. 1996.

BARROS, F.; RODRIGUES, V. T.; BATISTA, J. A. N. Orchidaceae. In: STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A. ET AL Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p.372-403, 2009.

BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. Orchidaceae in R.C. Forzza, et al (org.). Catálogo de plantas e Fungos do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, p. 1344-1426. 2010.

BENAMARA-BELLAGHAAB, M.; BAZIZ, K.; PUSTAHIJA, F.; KHALFALLAH, N.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Cytogenetic characterization and nuclear DNA content of three North African endemic *Centaurea* species. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, v.10, p. 1-12. 2014. DOI: 10.1080/11263504.2014.981234.

BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses: 807 new estimate. *Annals of Botany*, v. 26, p. 859-909. 2000.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amount in angiosperms. *Annals of Botany*, v. 76, p. 113-176. 1995.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress problems and prospects. *Annals of Botany*, v. 95, p. 45-90. 2005.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Plant DNA C-values database. Disponível em <http://www.kew.org/cvalues/>. 2012. Acesso em: 25 Jan. de 2017.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research*, New Westminster, v. 27, n. 3, p. 415-424, 1997.

BRETAGNOLLE, F.; THOMPSON, J. D. Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*, v. 129, p. 1-22. 1995.

BUGGS, R. J.; CHAMALA, S. W. U. W.; GAO, L.; MAY, G. D.; SCHNABLE, P. S.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; BARBAZUK, W. B. Characterization of duplicate gene

evolution in the recent natural allopolyploid *Tragopogon miscellus* by next-generation sequencing and Sequenom iPLEX MassARRAY genotyping. *Molecular Ecology*, v. 19, p. 132-146. 2010b.

BUGGS, R.; ELLIOTT, N. M.; ZHANG, K. O. H. J., VICCINI L. F.; SOLTIS. D. E.; SOLTIS, P. S. Tissue-specific silencing of homoeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus*. *New Philologist*, v. 186, p.175-183. 2010a.

BURTON, T. L.; HUSBAND, B. C. Fecundity and offspring ploidy in matings among diploid, triploid and tetraploid *Chamerion angustifolium* (Onagraceae): consequences for tetraploid establishment. *Heredity*, v. 87, p. 573-582. 2001.

BUSSELL, J. D.; WAYCOTT, M.; CHAPPILL, J. A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v. 7, p. 3-26. 2005.

CABRAL, J. S.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 659-664. 2006.

CAIXETA, E. T.; CARVALHO, C. R. Chromomere mapping in maize pachytenes. *Caryologia (Firenze)*, v. 56, p. 53-56. 2003.

CAMPACCI, T. Polinização por engano e poliembrião no complexo '*Zygopetalum maculatum*' (Orchidaceae). 2013. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade Federal de São Paulo, Diadema.

CAROVIC-STANKO, K.; LIBER, Z.; BESENDORFER, V.; JAVORNIK, B.; BOHANEK, B. KOLAC, I.; SATOVIC, Z. Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. *Plant Systematics and Evolution*, v. 285, p. 13-22. 2010.

CARVALHO, C. R. DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA CITOGENÉTICA EM MILHO (*Zea mays* L.). 1995. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V. DNA Data and Orchidaceae Systematics: A New Phylogenetic Classification. *In: Orchid Conservation*. (Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barrett, R.L. & Cribb, P.J., eds.) Kota Kinabalu, Natural History Publications, Sabah, 69-89. 2003.

CHASE, M. W.; RUDALL, P. J. e CONRAN, J. G. New circumscription and a new family of asparagoid lilies: genera formerly included in Anthericaceae. *Kew Bull*, v. 51, p. 667-680. 1996.

CHASE, M. W.; SOLTIS, D. S.; SOLTIS, P. S.; RUDALL, P. J.; FAY, M. F.; HAHN, W. H.; SULLIVAN, S.; JOSEPH, J.; MOLVRAY, M.; KORES, P. J.; GIVNISH, T. J.; SYTSMA, K. J. e PIRES, J. C. Higher-level systematics of monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *In Monocots: Systematics and evolution*, K. L. Wilson e D. A. Morrison (eds.), CSIRO, Collingwood, Australia, p. 3-16. 2000.

- CHASE, M. W.; STEVENSON, D. W.; WILKIN, P. E. RUDALL, P. J. Monocot systematics: a combined analysis. In *Monocotyledons: Systematics and Evolution*, P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler e C. J. Humphries (eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, p. 685-730. 1995.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 177, n. 2, p. 151-174. 2015.
- CHEN, W. H.; KAO, Y. L.; TANG, C. Y.; TSAI, C. C.; LIN, T. Y. Estimating nuclear DNA content within 50 species of the genus *Phalaenopsis* Blume (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, v. 161, p. 70-75. 2013.
- CHEN, W. H.; TANG, C. T.; LIN, T. Y.; WENG, Y. C.; YU-LIN KAO, Y. L. Changes in the endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* (Orchidaceae). *Plant Science*, v. 181, p. 31-38. 2011.
- CHEN, Z. J.; HA, M.; SOLTIS, D. Polyploidy: genome obesity and its consequences. *New Phytologist*, v. 174, p. 705-707. 2007. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02084.x.
- CHESTER, M.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). *Genes*, v. 1, p. 166-192. 2010.
- CIFUENTES, M.; GRANDONT, L.; MOORE, G.; CHEVRE, A. M.; JENCZEWSKI, E. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist*, v. 186, p. 29-36. 2010.
- CLARKSON, J. J.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; LEITCH, A. R. Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana section Repandae* (Solanaceae). *New Phytologist*, v. 168, p. 241-252. 2005.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n.11, p. 836-846. 2005. doi: 10.1038/nrg1711.
- CONCEIÇÃO, L. P.; OLIVEIRA, A. L. P. C.; BARBOSA, L. V. Characterization of the *Epidendrum cinnabarium* Salzm (Epidendroideae: Orchidaceae) occurring in Dunas do Abaeté-Salvador, BA-Brasil. *Japão: Cytologia*, v. 71, p. 125-129. 2006.
- CONTERATO, I. F.; WITTMANN, M. T. S. New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 150, p. 229-240. 2006.
- CORTIS, P.; VEREECKEN, N. J.; SCHIESTL, F. P. Pollinator convergence and the nature of species boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, v. 104, p. 497-506. 2009.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2004.

- COZZOLINO, S.; NARDELLA, A. M.; IMPAGLIAZZO, S.; WIDMER, A.; LEXER, C. Hybridization and orchid conservation: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation*, v. 192, p. 14-23. 2006.
- COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Ecology and Evolution*, v. 20, n. 9, p. 488-494. 2005.
- CRIBB, P. J. Orchidaceae. In: PRIDGEON, A.M., CRIBB, P. J., CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (eds.). *Genera Orchidacearum*, 1 Oxford University Press, New York. 1999.
- CRIBB, P. J.; GASSON, P. Unusual asexual reproduction in the East African orchid, *Cynorkis uncata*. *Kew Bull.*, v. 36, n. 4, p. 661-663. 1982.
- CUI, L., P. K. WALL, J. LEEBENS-MACK, B. G. LINDSAY, D. E. SOLTIS, J. J. DOYLE, P. S. SOLTIS. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, v. 16, p. 738-749. 2006.
- D'EMERICO, S.; PIGNONE, D.; BARTOLO, G.; PULVIRENTI, S.; STUTO, S.; SCRUGLI, A. Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 148, p. 87-99. 2005.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. The families of the Monocotyledons. Springer Verlag. Berlin. 1985.
- DARWIN, C. The various contrivances by which orchids are fertilised by insects, 2nd edn. London: J. Murray. 1877.
- DAVIÑA, J. R.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J. C.; HOJSGAARD, D.H.; ALMADA, R. D.; INSAURRALDE, I. S.; HONFI, A. I. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 4, p. 811-821. 2009.
- DE CASAS, R. R.; CANO, E.; BALAGUERA, L.; PEREZ-CORONAC, E.; MANRIQUED, E.; VERDUGO, C. G.; VARGAS, P. Taxonomic identity of *Quercus coccifera* L. in the Iberian Peninsula is maintained in spite of widespread hybridisation, as revealed by morphological, ISSR and ITS sequence data. *Flora*, 202: 488–499. 2007.
- DE WET, J. M J. Origins of polyploids. In: *Polyploidy biological relevance* (ed. Lewis WH). Plenum Press, New York, p. 3-16. 1980.
- DETTORI, M. T.; QUARTA, R.; VERDE, I. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. *Genome* 44: 783–790. 2001.
- DODSON, C.H. Chromosome number in *Oncidium* and allied genera. *American Orchid Society Bulletin*, v. 26, p. 323-330. 1957.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 143-154. 1991.

DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, v. 95, p. 99-110. 2005.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, v. 31, p. 113-120. 1989.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. Ed. Wiley-VCH. 2007.

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S. Comparison of the three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 85, p. 625-631. 1992.

DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland Oregon: Dioscorides Press, 316p. 1993.

DRESSLER, R. L. The orchids: natural hist classification. Harvard University Press, Cambridge. 1981.

DRESSLER, R.L. How many orchid species? *Selbyana*, v. 26, p. 155-158. 2005.

DUAN, L.; YANG, X.; LIU, P.; JOHNSON, G.; WEN, J.; CHANG, Z. 2016. A molecular phylogeny of *Caraganeae* (Leguminosae, Papilionoideae) reveals insights into new generic and infrageneric delimitations. *PhytoKeys*, v. 70, p. 111-137. 2016.

EHRENDORFER, F., F. KRENDL, E. HABELER, AND W. SAUDER. Chromosome Numbers and evolution in primitive angiosperms. *Taxon*, v.17, p. 337-468. 1968.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUS, J. L.; WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, Vancouver, v. 8, p. 443-451, 1999.

ESSI, L.; WAGNER, H. M. L.; CHIES, T. T. S. ISSR as a tool to support taxonomic decisions: a first approach for *Chascolytrum* species complexes (Poaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 5, n. 2 p. 1-9. 2014.

FAJARDO, C. G.; FA´BIO DE ALMEIDA VIEIRA, F. A.; FELIX, L. P.; MOLINA, W. F. Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid. *Biodiversity and Conservation*, v. 9, p. 1-17. 2017.

FARIA, R. T.; REGO, L. V.; BERNARDI, H. B.; MOLINARI, H. B. Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternative substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 337-342. 2001.

FAVORETO, F. C.; CARVALHO, C. R.; LIMA, A. B. P.; FERREIRA, A.; CLARINDO, W. R. Genome size and base composition of Bromeliaceae species assessed by flow cytometry. *Plant Systematics and Evolution*, v. 298, p. 1185-1193. 2012.

FAWCETT, J. A.; VAN DE PEER, Y. Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 1, p. 3. 2010.

- FAWCETT, J.; VAN DE PEER, Y.; MAERE, S. Significance and biological consequences of polyploidization in land plant evolution. In *Plant genome diversity* (ed. Leitch IJ), Springer, Vienna, v. 2, p. 277-294. 2013.
- FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany*, v. 104, p. 359-364. 2009.
- FELDMA, M.; LEVY, A. A. Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics*, v. 192, p. 763-774. 2012.
- FELDMAN, M.; LIU, B.; SEGAL, G.; ABBO, S.; LEVY, A. A. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, v. 147, p. 1381-1387. 1997.
- FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Basic chromosome number of terrestrial orchids. *Plant Systematics and Evolution*, v. 254, p. 131-148. 2005.
- FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Doston e Dressler: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. *Caryologia*, v. 52, p. 165-168. 1999.
- FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of cymbidioid orchids. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 957-978. 2000.
- FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163: 234-278. 2010.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília. 1998. 220p.
- FLORA DO BRASIL. *Zygopetalum* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12379>>. Acesso em: 08 Mar. 2017.
- FOSSATI, T.; PATRIGNANI, G.; ZAPPELLI, I.; SABATTI, M.; SALA, F.; CASTIGLIONE, S. Development of molecular markers to assess the level of introgression of *Populus tremula* into *P. alba* natural populations. *Plant Breeding*, v. 123, n. 4, p. 382-385. 2004.
- FREELING, M.; WOODHOUSE, M. R.; SUBRAMANIAM, S.; TURCO, G.; LISCH, D.; SCHNABLE, J. C. Fractionation mutagenesis and similar consequences of mechanisms removing dispensable or less-expressed DNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, p. 131-139. 2012.
- FREITAS, L. B.; BERED, F. *Genética & Evolução Vegetal*. Porto Alegre, Editora UFRGS, 463 p. 2003.

- FREUDENSTEIN J. V.; CHASE, M. W. Analysis of mitochondrial nad1b-c intron sequences in Orchidaceae: Utility and coding of length-change characters. *Systematic Botany*, v. 26, p.643-657. 2001.
- FUKAI, S.; HASEGAWA, A.; GOI, M. Polysomaty in *Cymbidium*. *Hortscience*, 7: 1088-1091. 2002.
- FUKUSHIMA, K.; IMAMURA K.; NAGANO, K.; HOSHI, Y. Contrasting patterns of the 5S and 45S rDNA evolutions in the *Byblis liniflora* complex (Byblidaceae). *Journal Plant Research*, v. 124, n. 2, p. 231-44. 2011.
- GAETA, R. T.; PIRES, J. C. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. *New Phytologist*, v. 186, p. 18-28. 2010.
- GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. E DOLEŽEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in cytometry*, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. John Wiley & Sons, Inc., New York. 2002.
- GAO, L.; YANG, B. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. *Biodiversity Science*, Pequim, v. 14, n. 03, p. 250-257, 2006.
- GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. Y. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany*, v. 96, n. 11, p. 2022-2030. 2009.
- GÖGLER, J.; STÖKL, J.; SRAMKOVA, A.; TWELE, R.; FRANCKE, W.; COZZOLINO, S.; CORTIS, P.; SCRUGLI, A.; AYASSE, M. Ménage à trois - two endemic species of deceptive orchids and one pollinator species. *Evolution*, v. 63, p. 2222-2234. 2009.
- GOMES, S. S. L.; SALDANHA, C. W.; NEVES, C. S.; TREVIZANI, M.; RAPOSO, N. R. B.; NOTINI, M. M.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, J. M. S.; OTONI, W. C.; VICCINI, L. F. Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 118, n. 1, p. 45-56. 2014. doi: 10.1007/s11240-014-0460-1.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, Wageningen, v.122, p.81-89, 2001.
- GOVAERTS, R. 2001. How many species of seed plants are there? *Taxon*, v. 50, p. 1085-1090. 2001.
- GOVAERTS, R., BERNET P., KRATOCHVIL K., GERLACH G., CARR G., ALRICH P., PRIDGEON A.M., PFAHL J., CAMPACCI M.A., BAPTISTA D.H., TIGGES H., SHAW J., CRIBB P., GEORGE A., KREUZ K., WOOD J. World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2016. Available from <http://apps.kew.org/wcsp/>

GRANT, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York, New York, USA.

GREILLHUBER, J. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany*, v. 82, (Suppl. A), p. 27-35. 1998.

GREILLHUBER, J.; BORSCH, T.; MULLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant Biology*, v. 8, p. 770-777. 2006.

GUERRA, M. A situação da citotaxonomia de Angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 4, n. 2, p. 75-86. 1990.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson, K. I.; Morrison, D. A. eds. *Monocots II: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, p. 127-136. 2000.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytogenetics: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 120, n. 3-4, p. 339-250. 2008.

GUERRA, M. S. *Introdução à Citogenética Geral*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1988.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SERVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HAIDER, N.; NABULSI, I.; KAMARY, Y. Phylogeny of Orchidaceae species in northwest Syria based on ISSRs. *Journal of Plant Biology Research*, v. 1, n.2, p. 36-50. 2012.

HAMANT, O.; MA, H.; CANDE, W. Z. Genetics of Meiotic Prophase I in Plants. *The Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 267-302. 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics *Software Package for Education and Data Analysis*. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1, p. 9. 2001.

HAN, Y. C.; TENG, C. Z.; ZHONG, S.; ZHOU, M. Q.; HU, Z. L. ; SONG, Y. C. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nificifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR markers. *Aquatic Botany*, v. 86, p. 69-75. 2007.

HARLAN, J. R.; J. M. DE WET. O Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Botanical Review*, v. 41, p. 361-390. 1975.

HEDRÉN. M.; NORDSTROM. S.; STAHLBERG. D. Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculate* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Molecular Ecology*, v. 17, p. 5075-5091. 2008.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequences and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell*, v. 12, p. 617-635. 2000.

HIDALGO, O.; VITALES, D.; VALLÈS, J.; GARNATJE, T.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; LEITCH, I. J.; PELLICER, J. Cytogenetic insights into an oceanic island radiation: The dramatic evolution of pre-existing traits in *Cheirolophus* (Asteraceae: Cardueae: Centaureinae). *Taxon*, v. 66, n. 1, p. 146-157. 2017.

HOEHNE, F. C. *Zygopetalum*. *Flora Brasílica: Orchidaceas*, v. 12, n. 1, p. 1-12. 1953.

HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.; MORA, A.; SEVINK, J.; SANMARTÍN, I.; SANCHEZ-MESEGUER, A.; AANDERSON, C. L.; FIGEUIREDO, J. P.; JARAMILLO, C.; RIFF, D.; NEGRI, F. R.; HOOGHIEMSTRA, H.; LUNDBERG, J.; STADLER, T.; SARKINEN, T.; SARKINEN, T.; ANTONELLI, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, v. 330, p. 927-931. 2010.

HORÄNDL, E. Evolution and biogeography of alpine apomictic plants. *Taxon*, v. 60, p. 390-402. 2011.

HÖRANDL, E.; HOJGAARD, D. The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, v. 146, p. 681-693. 2012.

HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; SILVA, J. A. T. The application of biotechnology to orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 32, p. 69-139, 2013.

JAMES, J. K.; ABBOTT, R. J. Recent allopatric homoploid hybrid speciation: the origin of *Senecio Squalidus* (Asteraceae) in the British Isles from a hybrid zone on Mount Etna, Sicily. *Evolution*, v. 59, p. 2533-2547. 2005.

JIANG, J.; GILL, B. S.; WANG, G. L.; RONALD, P. C.; WARD, D. C. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice with bacterial artificial chromosomes. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 92, p. 4487-4491. 1995.

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

JIMENEZ, H. J.; MARTINS, L. S. S.; MONTARROYOS, A. V. V.; SILVA JUNIOR, J. F.; ALZATE-MARIN, A. L.; MORAES FILHO, R. M. Genetic diversity of the Neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in Northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 17749-17757. 2015.

JOLY, B. A. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Nacional. 2002.

- JONES, W. E.; KUEHNLE, A. R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 Orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*, v. 82, p. 189-194. 1998.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. e DONOGHUE, M. J. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 632p. 2009.
- KAO, Y. Y.; CHANG, S. B.; LIN, T. Y.; HSIEH, C. H.; CHEN, Y. H.; CHEN, W. H.; CHEN, C. C. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* Orchids. *Annals of Botany*, v. 87, p. 387-395. 2001.
- KHOMANN, E. E.; NAM, I. Y. G.; ZAYAKIN, V. V. 2016. Using ISSR-Markers for Genetic Diversity of some Representatives of Orchidaceae. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, v. 13, n. 1, p. 115-118. 2016.
- KISSLING J.; ZELTNER L.; KUPFER P.; MANSION G. Cytogeography of centianaceae-exaceae in Africa, with a special focus on *Sebaea*: the possible role of dysploidy and polyploidy in the evolution of the tribe. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 158, p. 556-566. 2008.
- KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H.; SINGER, R. B.; NEUBIG, K. M.; GUERRA, M.; SOUZA, A. P.; AMARAL, M. *Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus Christensonella (Orchidaceae, Maxillariinae): Species Delimitation and Insights into Chromosome Evolution*. *Annals of Botany*, v. 102, p. 491-507. 2008.
- KOLAR F.; STECH M.; TRAVNICEK P.; RAUCHOVA´ J.; URFUS, T.; VIT, P.; KUBESOVA, M.; SUDA, J. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. *Annals of Botany*, v. 103, p. 963-974. 2009.
- KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p. 547-574. 2003.
- KOUTECKÝ, P.; BADUROVÁ, T.; ŠTECH, M.; KOŠNAR, J.; KARÁSEK, J. Hybridization between diploid *Centaurea pseudophrygia* and tetraploid *C. jacea* (Asteraceae): the role of mixed pollination, unreduced gametes, and mentor effects. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 104, p. 93-106. 2011.
- KOVASLKY, I. E.; NEFFA, V. G. S. Evidence of 2n microspore production in natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. *Journal Plant Research*, v. 125, n. 6, p. 725-734. 2012.
- KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 38, p. 847-876. 2007.

- KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R., PANDEY, B.K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, v. 2, n. 4, p. 141-162. 2009.
- LARROSA, F. H.; MAUNE, J. F.; ERAZZU, L. E.; CAMADRO, E. L. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. *Plant Biology*, v. 14, p. 223-233. 2012.
- LE COMBER, S. C.; AINOUCHE, M. L.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. R. Making a functional diploid: from polysomic to disomic inheritance. *New Phytologist*, v. 186, n. 1, p. 113-122. 2010. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03117.x
- LEAKE, J. R. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist*, v. 19 (3), p. 113-122. 2005.
- LEE, H. C.; CHEN, Y. C.; MARKHART, A. H.; LIN, T. Y. Temperature effects on systemic endoreduplication in orchid during floral development. *Plant Science*, v. 172, p. 588-595. 2007.
- LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, v. 320, p. 481-483. 2008.
- LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T. JACKKSON, D.; LEITCH, I. J. In situ Hybridization: a practical guide. RMS microscopy handbooks. Bios, Scientific Publishers Ltd., Oxford, v. 27, p. 118. 1994.
- LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 82, p. 651-663. 2004.
- LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 470-476. 1997.
- LEITCH, I. J.; KAHANDAWALA, I.; SUDA, J.; HANSON, L.; INGROUILLE, M. J.; CHASE, M. W.; FAY, M. F. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*, v. 104, p. 469-481. 2009.
- LEPERS-ANDRZEJEWSKI, S.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BRONW, S. C.; WONG, M.; DRON, M. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomy from a cytogenetic study of *Tahitian vanilla* (*Vanilla x Tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v. 98, n. 6, p. 986-997. 2011.
- LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas*, v. 52, n. 3, p. 201-220. 1964.
- LEVIN DA. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press. 2002.
- LIM, W. L.; LOH, C. S. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist*, v. 159, p. 279-287. 2002.

- LIN, S.; LEE, H. C.; CHEN, W. H.; CHEN, C. C.; KAO, Y. Y.; FU, Y. M.; CHEN, Y. H.; LIN, T. Y. Nuclear DNA Contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. American Society for Horticultural Science, 126(2): 195-199. 2001.
- LIU, H.; YAN, G.; SHAN, F.; SEDGLEY, R. Karyotypes in *Leucadendron* (Protaceae): evidence of the primitiveness of the genus. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 151, n. 4, p. 387-394. 2006.
- LYNCH, M.; O'HELY, M. WALSH, B. FORCE, A. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. Genetics, v. 159, p. 1789-1804. 2001.
- LYSÁK, M.; DOLEŽELOVÁ, M.; HORRY, J.; SWENNEN, R. E DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. Theoretical and Applied Genetics, v. 98, p. 1344-1350. 1999.
- MA, X. F.; Gustafson, J.P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. Cytogenetics and Genome Research, v. 109, p. 236-249. 2005.
- MADESIS, P.; ABRAHAM, E. M.; KALIVAS, A.; I. GANOPOULOS, I.; TSAFTARIS, A. Genetic diversity and structure of natural *Dactylis glomerata* L. populations revealed by morphological and microsatellite-based (SSR/ISSR) markers. Genetics and Molecular Research, v. 13, n. 2, p. 4226-4240. 2014.
- MADLUNG, A.; TYAGI, A. P.; WATSON, B.; JIANG, H.; KAGOCHI, T.; DOERGE, R. W.; MARTIENSSSEN, R.; COMAI, L. Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids. Plant Journal, v. 41, p. 221–230. 2005.
- MAGUIRE, T.; PEAKALL, R.; SAENGER, P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. Theoretical and Applied Genetics, v. 104, n. 2, p. 388-398. 2002.
- MALLET. J. Hybrid speciation. Nature, v. 446, p. 279-283. 2007.
- MALLET. J. Hybridization as an invasion of the genome. Trends in Ecology & Evolution, v. 20, p. 229-237. 2005.
- MARQUES, I.; DRAPER, D.; RIOFRÍO, L.; NARANJO, C. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). BMC Evolutionary Biology, v. 14, p. 20-35. 2014.
- MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science, v. 264, p. 421-423. 1994.
- MCINTYRE, P. J. Cytogeography and genome size variation in the *Claytonia perfoliata* (Portulacaceae) polyploid complex. Annals of Botany, v. 110, p. 1195-1203. doi:10.1093/aob/mcs187. 2012.
- MENDIBURU, A.O.; PELOQUIN, S.J. High yielding tetraploids from 4x-2x and 2x-2x matings. American Potato Journal, v. 48, p. 300-301. 1971.

MENINI NETO, L. 2011. Sistemática de *Pseudolaelia* Porto & Brade (Orchidaceae). 268 p. Tese de doutorado Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical.

MEUDT, H.; ROJAS-ANDRÉS, B. M.; PREBBLE, J. M.; LOW, E.; GARNOCK-JONES, P. J.; ALBACH, D. Is genome downsizing associated with diversification in polyploid lineages of *Veronica*? *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 178, p. 243-266. 2015.

MILACH, S. C. K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre. 1998. 141 p.

MISHRA, K.K.; FOGAT, R.S.; BALLANI, A.; VINITA, T.; YACHANA, J.; MADHUMATI, B. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Internatinal Journal of Pure and Applied Biosciences*, v. 2, n. 1, p. 169-188. 2014.

MITTELBACH, G. G.; SCHEMSKE, D. W.; CORNELL, H. V.; ALLEN, A. P.; BROWN, J. M.; BUSH, M. B.; HARRISON, S. P.; HURLBERT, A. H.; KNOWLTON, N.; LESSIOS, H. A.; McCAIN, C. M.; McCUNE, A. R.; McDADE, L. A.; McPEEK, M. A.; NEAR, T. J.; PRICE, T. D.; RICKLEFS, R. E.; ROY, K.; SAX, D. F.; SCHLUTER, D.; SOBEL, J. M.; TURELLI, M. Evolution and the latitudinal diversity gradient: Speciation, extinction and biogeography. *Ecology Letter*, v. 10, p. 315-331. 2007.

MOCCIA, M. D.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2855-2866. 2007.

MORAES, A. P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). *Ecology and Evolution*, v. 3, n. 11, p. 3824-3837. 2013. doi: 10.1002/ece3.752.

MORAES, A. P.; KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; GOMES, S. S. L.; VICCINI, L. F.; BARROS, F.; L. P. FELIX, L. P.; M. GUERRA, M.; E. R. FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. *Plant Biology*, p. 1-49. 2017. doi: 10.1111/plb.12527

MORAES, A. P.; LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 170, p. 29-39. 2012.

MORAES, A. P.; OLMOS SIMÕES, A.; OJEDA ALAYON, D. I.; BARROS, F.; FORNI-MARTINS, E. R. Detecting Mechanisms of Karyotype Evolution in Heterotaxis (Orchidaceae). *Plos One*, v. 11, n. 11, p. 1-18. doi: e0165960. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0165960

MORAES, M. C. M.; BERTÃO, M. R.; LOOSE, P. V.; CORDEIRO, A. F. S.; PALMIERI, D. A. Molecular Study on Endemic *Cattleya* Species from Brazilian Flora. *American International Journal of Biology*, v. 2, n. 3 e 4, p. 77-84. 2014.

- MOREIRA, A. S. P.; ISAIAS, R. M. S. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian archives of biology and technology*, v. 51, n. 1, p. 83-93. 2008.
- MOSCONE, E. A.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A.T. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. *Annals of Botany*, v. 92, p. 21-29. 2003.
- NEMORIN, A.; DAVID, J.; MALEDON, E.; NUDOL, E.; DALON, J.; ARNAU, G. . Microsatellite and flow cytometry analysis to help understand the origin of *Dioscorea alata* polyploids. *Annals of Botany*, v. 112, p. 811-819. 2013.
- NEVES, N.; DELGADO, M.; SILVA, M.; CAPERTA, A.; MORAIS-CECÍLIO L.; VIEGAS, W. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetics and Genome Research*, v. 109, p. 104-111. 2005.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? *ASM Science Journal*, v. 9, n. 1, p. 30-39. 2015.
- NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C. S.; MENDONÇA, M. P. Mycorrhizal fungi associated to orchids growing in “campos rupestres” in “Quadrilátero Ferrífero” region, Minas Gerais State, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, n. 3, p. 417-424. 2005.
- OLIVEIRA, I. G.; MORAES, A. P.; ALMEIDA, E. M.; ASSIS, F. N. M.; CABRAL, J. S.; BARROS, F. B.; FELIX, L. P. Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. *The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society*, p. 1-19. 2015.
- OLIVEIRA, M. N.; DAVIDE, L. C.; PINTO, C. A. B. P. Mechanisms of 2n potato pollen formation in dihaploid *Solanum tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt. Hybrid clones. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 445-450. 1995.
- OLIVEIRA, V. M.; BARROS, F.; FORNI-MARTINS, E. R. Chromosome numbers and karyotypes of *Catasetum* species (Orchidaceae). *Plant Biosystems*, v. 148, n. 3, p. 499-507. 2014. doi:10.1080/11263504.2013.788093
- ORTIZ, R. Occurrence and inheritance of 2n pollen in *Musa*. *Annals of Botany*, Bristol, v. 79, p. 449-453. 1997.
- OTERO, J. T.; FLANAGAN, N. S. Orchid diversity – beyond deception. *Trends Ecology and Evolution*, v. 21, p. 64. 2005. doi:10.1016/j.tree.2005.11.016.
- OTTO, P. S. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell*, v. 131, p. 452-462. 2007.
- OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploidy: Incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, v. 34, p. 401-437. 2000.

- PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 4, p. 997-1002. 2000.
- PARIDA, A.; RAINA, S. N.; NARAYAN, R. K. J. Quantitative DNA variation between and within chromosome complements of *Vigna* species (Fabaceae). *Genetica*, v. 82, p.125-133. 1990.
- PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, v. 186, p. 5-17. 2010.
- PAUN, O.; BATEMAN, R. M.; FAY, M. F.; LUNA, J. A.; MOAT, J.; HEDRÉN, M.; CHASE, M. W. Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology*, v. 11, p. 113-127. 2011.
- PAUN, O.; BATEMAN, R. M.; FAY, M. F.; HEDRÉN, M.; CIVEYREL, L.; CHASE M. W. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae). *Molecular Biology and Evolution*, v. 27, p. 2465-2473. 2010.
- PAVARESE, G.; TRANCHIDA-LOMBARDO, V.; GALES, R.; D'EMERICO, S.; CASOTTI, R.; CRISTAUDO, A.; COZZOLINO, S. When polyploidy and hybridization produce a fuzzy taxon: the complex origin of the insular neoendemic *Neotinea commutata* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 173, p. 707-720. 2013.
- PEAKALL, R. Speciation in the Orchidaceae: confronting the challenges. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2834-2837. 2007.
- PELLICER, J.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J. The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 164, p. 10-15. 2010.
- PEREIRA, O. L.; ROLLEMBERG, C. L.; KASUYA, M. C. M. Association des mycorhizies dans les orchidees – perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. *Orchidees*, v. 55, p. 24-27. 2003.
- PIERRE, P. M. C.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, p. 993-1005. 2011.
- PINHEIRO, F., S. COZZOLINO. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon*, v. 62, p. 77-88. 2013.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; LOURENÇO, R. A. O que é uma Orquídea? In: F. Barros & G.B. Kerbauy (org.). *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. Secretaria do Meio Ambiente/Instituto de Botânica, São Paulo, p. 11-33. 2004.
- PINHEIRO, F.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; SUZUKI, R. M.; ABRÃO, M. C. R.; GUIMARÃES, L. R. S.; DRAPER, D.; MORAES, A. P. Strong postzygotic isolation prevents introgression between two hybridizing Neotropical orchids, *Epidendrum*

denticulatum and *E. fulgens*. Ecology and Evolution, p. 1-20. 2015. DOI 10.1007/s10682-015-9753-z.

PINHEIRO, L.; RABBANI, A.; SILVA, A.; SILVA, A. L.; PEREIRA, K.; DINIZ, L. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. Plant Systematics e Evolution, v. 298, n 10, p. 1815-1826. 2012.

POGGIO, L.; REALINI, M. F.; FOURASTIE, M. F.; GARCIA, A. M.; GONZALEZ, E. G. Genome downsizing and karyotype constancy in diploid and polyploid congeners: a model of genome size variation. AoB PLANTS, v. 15, p. 1-11. 2014.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; CRUZ, C. D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. Plant Cell Reports, v. 30, p. 1183-1191. 2011.

PREUSS, A. B.; BRITT, S. B. A DNA-Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint in *Arabidopsis*. Genetics, v. 164, p. 323-334. 2003.

PRIDGEON, A. M. The illustrated encyclopaedia of orchids. Timber Press, Portland, p. 304. 2003.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). Genera Orchidacearum. New York: Oxford University Press, v. 1. 1999.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). Genera Orchidacearum. New York: Oxford University Press, v. 4. 2005.

PUPULIN, F. Zygopetalinae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. Genera Orchidacearum: Epidendroideae (Part Two), Vol. 5. Oxford, Oxford University Press, 456-547. 2009.

QIAN, X.; WANG, C. X.; TIAN, M. Genetic Diversity and Population Differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a Rare and Endemic Orchid in China. . International Journal of Molecular Sciences, v. 14, p. 20399-20413. 2013.

RAMALHO, M.A.P.; FURTINI, I.V. Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. Revista Ceres, n. 56, v. 4, pag. 473-479. 2009.

RAMANNA, M. S; JACOBSEN, E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. Euphytica, v. 133, p. 3-18. 2003.

RAMANNA, M.S. The use of 2n gametes in breeding polysomic polyploid species; some achievements and perspectives. Journal Article: Proc. Workshop Gametes with somatic chromosome number in the evolution of and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives. Perugia, Italy, p. 91-100. 1992.

RAMSEY, J. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v. 108, p. 7096-7101. 2011.

RAMSEY, J.; RAMSEY, T.S. Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its Discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, p.1-20. 2014.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Neopolyploidy in flowering plants; *Annual Review in Ecology and Systematics*, v. 33, p. 589-639. 2002.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 29, p. 467-501. 1998.

RASMUSSEN, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, v. 244, p. 149-163. 2002.

RAVEN, P. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Cytology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 62, p. 724-764. 1975.

REDDY, M.P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v.128, n.1, p.9-17, 2002.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M. O.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VIERA, R. F.; VICCINI, L. F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? *American Journal of Botany*, v. 101, p. 1002-1012. 2014.

RENNY-BYFIELD, S.; KOVARIK, A.; KELLY, L. J.; MACAS, J.; NOVAK, P.; CHASE, M. W. Diploidisation and genome size change in allopolyploids is associated with differential dynamics of low and high copy sequences. *Plant Journal*, v. 74, p. 829-839. 2013.

RENNY-BYFIELD, S.; CHESTER, M.; KOVAŘÍK, A.; LE COMBER, S. C.; GRANDBASTIEN, M. A.; DELOGER, M.; NICHOLS, R. A.; MACAS, J.; NOVÁK, P.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2843-2854. 2011.

RIESEBERG, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, p. 351-358. 2001.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do; MENDES-BONATO, A. B. Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Plant Breeding, Berlin*, v. 122, n. 2, p. 136-140. 2003.

ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BioMedCentral Evolutionary Biology*, v. 12, p. 225-238. 2012. doi:10.1186/1471-2148-12-225.

RODRIGUES, J.; VAN DEN BERG, C.; ABREU, A.; NOVELLO, M.; VEASEY, E.; OLIVEIRA, G.; KOEHLER, S. 2015. Species delimitation of *Cattleya coccínea* and *C.*

mantiqueirae (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. *Plant Systematics and Evolution*, v. 301, p. 1345-1359. 2015.

ROHDE, K. Latitudinal gradients in species diversity: the search for the primary cause. *Oikos*, v. 65, p. 514-527. 1992.

ROHLF, F.J. NTSYS-Pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Manual Applied Biostatistics, New York. 2000.

ROMANINI, R. P. A família Orchidaceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP. 2006. 219 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

ROMERO-DA CRUZ, M. V.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI MARTINS, E. R.; MOSCONE, E. A. A Cytogenetic marker for the characterization of *Capsicum annuum* L. cultivars. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, v. 11, n. 43 p. 1-20. 2017.

RUPP, B.; SAMUEL, S.; RUSSELL, A.; TEMSCH, E. M.; CHASE, M. W.; LEITCH, I. J. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 163, p. 223-233. 2010.

SAFAEI, M.; SHEIDAI, M.; ALIJANPOOR, B.; NOORMOHAMMADI, Z. Species delimitation and genetic diversity analysis in *Salvia* with the use of ISSR molecular markers. *Acta Botanica Croatica*, v. 75, n. 1, p. 45-54. 2016.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; MOREIRA, C. R. F. Genetic variability among Umbu-Cajazeira accessions by ISSR markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, p. 868-876. 2011.

SANTANA, J. G. S.; NASCIMENTO, A. L. S.; COSTA, T. S.; DE ALMEIDA, T. M. B.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Estimation of genetic diversity in a natural population of cambui tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 4, p. 1-11. 2016.

SANZO, A. M. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 138, p. 451-459. 2003.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 10, n. 2, p. 151-157. 2004.

SCHRANZ, M. E.; MOHAMMADIN, S.; EDGER, P. P. Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: the WGD Radiation Lag-Time Model. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, p. 147-153. 2012.

SCOPECE, G.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. *American Naturalist*, v. 171, p. 315-326. 2008.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 25, p. 2540-2568. 2006.

SHAMINA, N. V. A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. *Cell Biology International*, v. 29, p. 384-391. 2005.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J.A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 142, p. 309-320. 2003.

SHARMA, C; MANSOORI, M. N; DIXIT, M; SHUKLA, P; KUMARI, T; BHANDARI, S. P. S; NARENDER, T; SINGHB, D; ARYA, K. R. Ethanolic extract of *Coelogyne cristata* Lindley (Orchidaceae) and its compound coelogin promote osteoprotective activity in ovariectomized estrogen deficient mice. *Phytomedicine*, v. 21, p. 1702-1707. 2014.

SHARMA, S. K.; KUMARIA, S.; TANDON, P.; RAO, S. R. 2013. Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v. 22, n. 2, p. 250-255. 2013.

SHEEHAN, T. J.; SHEEHAN, M. An illustrated survey of orchid genera. Timber, Portland. 1994.

SHEN, J.; DING, X.; LIU, D.; DING, G.; HE, J.; LI, X.; TANG, F.; CHU, B. Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA *et* MIGO. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tóquio, v. 29, n. 3, p. 420-422, 2006.

SHENG, J.; HU, X.; ZENG, X.; LI, Y.; ZHOU, F.; HU, Z.; JIN, S.; DIAO, Y. Nuclear DNA content in *Miscanthus* sp. and the geographical variation pattern in *Miscanthus lutarioriparius*. *Scientific Reports*, v. 6, p. 34342-34350. 2016.

SICA, M.; GAMBA, G.; MONTIERI, S.; GAUDIO, L.; ACETO, S. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genetics*, v. 6, n. 17, p. 1-7. 2005.

SILVA, A. V. C.; FREIRE, K. C. S.; LÉDO, A. S.; RABBANI, A. R. C. Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa americana* L.) Brazilian accessions. *Scientia Agricola*, v.71, n.5, p.345-355. 2014b.

SILVA, J. A. T.; GIANG, D. T. T.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S.; TANAKA, M. Ploidy analysis of *Cymbidium*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium* and *Paphiopedillum* (Orchidaceae), and *Spathiphyllum* and *Syngonium* (Araceae). *Biologia*, v. 69, n. 6, p. 750-755. 2014. doi: 10.2478/s11756-014-0370-z.

SLOTTA, T. A. B.; PORTER, D. M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 151, p. 345-354. 2006.

SMARDA, P.; KOCI, K. Chromosome number variability in Central European members of the *Festuca ovina* and *F. pallens* groups (sec. *Festuca*). *Folia Geobotanica*, v. 38, p. 65-95. 2003.

SMARDA, P.; MÜLLER, J.; VRÁNA, J.; KOCI, K. 2005. Ploidy level variability of some Central European fescues (*Festuca* subg. *Festuca*, Poaceae). *Biologia*, v. 60, p. 25-36. 2005.

SMITH, J. L.; HUNTER, K. L.; HUNTER, R. B. Genetic variation in the terrestrial orchid *Tripularia discolor*. *Southeastern Naturalist*, v. 1, n. 1, p. 17-26, 2002.

SOLIVA, M.; WIDMER, A. Gene flow across species boundaries in sympatric sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution*, v. 57, p. 2252-2261.

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

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany*, v. 90, n. 11, p. 1596-1603. 2003.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. ENDRESS, P. K. e CHASE, W. W. *Phylogeny and Evolution of Angiosperms*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, p. 370. 2005.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: Origins of species and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 14, p. 348-352. 1999.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; SCHEMSKE, D. W.; HANCOCK, J. F.; THOMPSON, J. N.; HUSBAND, B. C.; JUDD, W. S. Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon*, v. 56, p. 13-30. 2007.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, v. 161, p. 173-191. 2003.

SOLTIS, D.E., SOLTIS, P. S. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 92, n. 18, p. 8089-8091. 1995.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 97, p. 7051-7057. 2000.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Plant Biology*, v. 60, p. 61-588. 2009.

SOSA, M. M.; ANGULO, M. B.; GREPPI, J. A.; BUGALLO, V. Chromosome numbers and DNA content in some species of *Mecardonia* (Gratiolae, Plantaginaceae). *Comparative Cytogenetics*, v. 10, n.4, p. 769-780. 2016.

- SOUSA S. M.; TORRES, G. A.; VICCINI, L. F. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 84, p. 1029-1037. 2012.
- SOUZA, L. G. R.; CROSA, O.; GUERRA, M. Karyological circumscription of *Ipheion Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 287, p. 119-127. 2010.
- SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., VIANA, A. P., PEREIRA, M. G., BERNACCI, L. C., SUDRÉ, C. P., SILVA, L. C. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia*, v. 56, n. 2, p. 161-169. 2003.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG I*. 2.ed. Nova Odesa: Inst. Plantarum, 208: 640. COLOMBO L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. 2004. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 6, n. 2, p. 253-258. 2008.
- SRIVASTAVA, S.; LAVANIA, U.C.; SYBENGA, J. Genetic variation in meiotic behaviour and fertility in tetraploid *Hyoscyamus muticus*: correlation with diploid meiosis. *Heredity*, v. 68, p. 231-239. 1992.
- STÅHLBERG, D., HEDRÉN M. Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology*, v. 23, p. 295-328. 2009.
- STEBBINS, G. L. *Chromosomal evolution in higher plants*. Arnold, London, 216p. 1971.
- STEBBINS, G. L. Types of polyploidy: their classification and significance. *Advances in Genetics*, v. 1, p. 403-429. 1947.
- SUDA, J.; KRAHULCOVÁ, A.; TRÁVNÉCEK, P.; KRAHULEC, F. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*, v. 5, p. 447-450. 2006.
- SUESSENGUTH K. Über die Pseudogamie bei *Zygopetalum mackayi* Hook. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, v. 41, p. 16-23. 1923.
- TANAKA, R. E.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: Counting and numbers. In: Arditti J (ed) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press, Ithaca, p. 324-410. 1984.
- TE BEEST, M.; ROUX, L. E.; RICHARDSON, J. J.; BRYSTING, D. M.; SUDA, A. K.; KUBESOVA, J.; PYSEK, M. P. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*, v. 109, p. 19-45. 2012.

- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. 1995. Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Sociedade Brasileira de Genética. São Paulo-Ribeirão Preto. 175p.
- TORRELL, M.; VALLES, J. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome*, v. 44, n. 2, p. 231-238. 2001.
- TOSCANO-DE-BRITO, A. L. V; CRIBB, P. Orquídeas da Chapada Diamantina. São Paulo: Nova Fronteira, v. 399. 2005.
- TRÁVNÍČEK, P.; PONERT, J.; URFUS, T.; JERSÁKOVÁ, J.; VRÁNA, J. HRIBOVÁ, E.; DOLEŽEL, J.; SUDA, J. Challenges of Flow-Cytometric Estimation of Nuclear Genome Size in Orchids, a Plant Group with Both Whole-Genome and Progressively Partial Endoreplication. *Cytometry Part A*, 00A: 00-00. 2015. doi: 10.1002/cyto.a.22681.
- VAN DEN BERG, C. 2003. 138 f Estudos de Sistemática Molecular na família Orchidaceae. Tese (Doutorado e Sistemática de Fanerógamas) - Universidade Federal de Feira de Santana.
- VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. Orchidaceae In: TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. Flores Tropicais. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 25-41. 2005.
- VEILLEUX, R. E.; LAUER, F. I. Variation for 2n pollen production in clones of *Solanum phureja* Juz. And Buk. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 59, p. 95-100. 1981.
- VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v, 256, p. 171-178. 2005.
- WALLACE, L. E. A comparison of genetic variation and structure in the allopolyploid *Platanthera huronensis* and its diploid progenitors, *Platanthera aquilonis* and *Platanthera dilatata* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, Guelph v. 82, n. 2, p. 244–252, 2004.
- WAN, T.; ZHANG, X.; GREGAN, J.; ZHANG, Y.; GUO P.; GUO, Y. A dynamic evolution of chromosome in subgenus *Potamogeton* revealed by physical mapping of rDNA loci detection. *Plant Systematics and Evolution*, v. 298, n. 6, p. 1195-1210. 2012.
- WANG, B. T.; RUAN, Z. Y. Genetic diversity and differentiation in *Camellia reticulata* (Theaceae) polyploid complex revealed by ISSR and ploidy. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 1, p. 503-511. 2012.
- WANG, G.; MENG, Y.; YANG, Y. Genome size variation among and within Ophiopogoneae species by flow cytometric analysis. *Brazilian Journal of Botany*, v. 12, p. 1-9. 2017.

- WANG, H. Z.; WU, Z. X.; LU, J. J.; SHI, N. N.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z. T.; LIU, J. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetica*, 136 (3): 391-399. 2009.
- WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KONSUGE, K. Chromosomal Evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae) Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plant Research*, v. 112, n. 2, p. 45-161. 1999.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. DNA fingerprinting in plants – principles, methods and application. CRC Press, p. 444. 2005.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; GREILHUBER, J.; SCHNEEWEISS, G. M. genome size evolution in holoparasitic *Orobanche* (OROBANCHACEAE) and related genera. *American Journal of Botany*, v. 93, n. 1, p. 148-156. 2006.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, v. 42, p. 225-249. 2000.
- WENDEL, J. F.; JACKSON, S. A.; BLAKE C. MEYERS, B. C.; WING, R. A. Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology*, v. 17, n. 37, p. 1-14. 2016.
- WESTON, P. H.; PERKINS, A. J.; ENTWISLE, T. J. More than symbioses: orchid ecology, with examples from the Sydney Region. *Cunninghamia*, v. 9, n. 1, p. 1-15. 2005.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods on Enzymology*, San Diego, v. 218, p. 704-740, 1993.
- WINDHAM, M. Chromosome counts and taxonomic notes on *Draba* (Brassicaceae) of the intermountain west. 2: Idaho, Nevada, and Vicinity. *Madroño*, v. 50, p. 221-231. 2003.
- WOLF, D. E.; STEETS, J. A.; HOULISTON, G. J.; TAKEBAYASHI, N. Genome size variation and evolution in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* and its parents, *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis halleri*. *AoB PLANTS*, v. 6, p. 1-11. 2014.
- WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. In: Zimmer EA, Roalson EH (eds) *Methods in enzymology*, Vol. 395 – Molecular evolution: producing the biochemical data, part B. Elsevier, San Diego, 134-144. 2005.
- WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1107-1125. 1998.
- WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Boston: Kluwer, p. 43-86. 1998.
- WOLFE, K. H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, New York, v. 2, p. 333-341. 2001.

- WOOD, T. E.; TAKEBAYASHI, N.; BARKER, M. S.; MAYROSE, I.; GREENSPOON, P. B.; RIESEBERG, L. H. The frequency of polyploidy speciation in vascular plants. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, p. 13875-13879. 2009.
- WOODHEAD, M.; RUSSELL, J.; SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P M.; MACKENZIE, K.; GIBBY, M.; POWELL. Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. Molecular Ecology, v. 14, n. 6, p. 1681-1695. 2005.
- WOODS, K.; HILU K. W.; WIERSEMA, J.H.; BORSCH, T. Pattern of variation as systematics of *Nymphaes odorata*. I. Evidence from morphology and inter-simple sequence repeats (ISSRs). Systematic Botany, v. 30, p. 471-480. 2005.
- XU, S.; SCHLÜTER, P. M.; SCOPECE, G.; BREITKOPF, H.; GROSS, K.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F. P. Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. Evolution, v. 65, p. 2606-2620. 2012.
- YAM, T. W.; YEUNG, E.C.; YE, X. L.; ZEE, S. Y.; ARDITTI, J. Orchid embryos. Orchid biology: reviews and perspectives, VIII. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 287-385. 2002.
- YAN, G.; FERGUSON, A. R.; McNEILAGE, M. A.; MURRAY, B. G. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in Actinidia. Euphytica, v. 96, n. 2, p. 267-272. 1997.
- YANG, J.; LI, Q.; YU, N.; YIN, G. WU, Z.; LI, R.; ZOU, W. Genetic diversity and structure among natural populations of *Sindora glabra* in Hainan Island, China as revealed by ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology, v. 69, p. 145-151. 2016.
- YANG, M.; LOH, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. BMC Cell Biology, v. 5, p. 33-41. 2004.
- YANG, X. M.; CAO, Z. Y.; AN, L. Z.; WANG, Y. M.; FANG, X. W. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica, v. 152, p. 217-224. 2006.
- ZHANG, D.; XIA, T.; YAN, M.; DAI, X.; XU, J.; LI, S.; YIN, T. Genetic Introgression and Species Boundary of Two Geographically Overlapping Pine Species Revealed by Molecular Markers. PLoS ONE, v. 9, n. 6, p. 1-9. 2014.
- ZIELINSKI, M. L.; SCHEID, M. O. Meiosis in polyploid plants. In: Soltis PS, Soltis DE, eds. Polyploidy and genome evolution. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 33-55. 2012.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, v. 20, p. 176-183. 1994.

ZOLDOS, V.; PAPE, D.; BROWN, S.; PANAUD, O.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome*, v. 41, p. 162-168. 1998.

ZONNEVELD, B. J. M.; POLLOCK, W. I. Flow cytometric analysis of somaclonal variation in lineages of *Hosta* sports detects polyploidy and aneuploidy chimeras. *Plant Biology*, v. 14, p. 972-979. 2012.