



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

TESE

**CITOTAXONOMIA DO GÊNERO NEOTROPICAL *Epidendrum* L.
(LAELIINAE, ORCHIDACEAE): DISCUTINDO GRUPOS INFRAGENÉRICOS**

JOEL MACIEL PEREIRA CORDEIRO

2019



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



CITOTAXONOMIA DO GÊNERO NEOTROPICAL *Epidendrum* L.
(LAELIINAE, ORCHIDACEAE): DISCUTINDO GRUPOS INFRAGENÉRICOS

JOEL MACIEL PEREIRA CORDEIRO

Sob a Orientação do Professor

Leonardo Pessoa Felix

e Co-orientação do Professor

Gustavo Souza

Tese submetida como requisito para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia** no Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Área de concentração em Ecologia, Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Areia, PB

Abril de 2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C794c Cordeiro, Joel Maciel Pereira.

Citotaxonomia do gênero neotropical *Epidendrum* L.
(Laeliinae, Orchidaceae): discutindo grupos
infragenéricos / Joel Maciel Pereira Cordeiro. - Areia,
PB, 2019.

131f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.

Coorientação: Gustavo Souza.

Tese (Doutorado) - UFPB/Agronomia.

1. Displóidia. 2. Epidendroideae. 3. Heterocromatina.
4. Poliploidia. 5. Tamanho do Genoma. 6. Variação
cariotípica. I. Felix, Leonardo Pessoa. II. Souza,
Gustavo. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

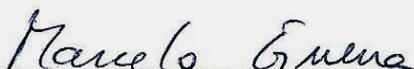
TÍTULO: CITOTAXONOMIA DO GÊNERO NEOTROPICAL *Epidendrum* L.
(LAELIINAE, ORCHIDACEAE): DISCUTINDO GRUPOS INFRAGENÉRICOS

AUTOR: JOEL MACIEL PEREIRA CORDEIRO

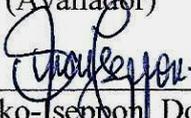
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em
AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela Comissão Examinadora



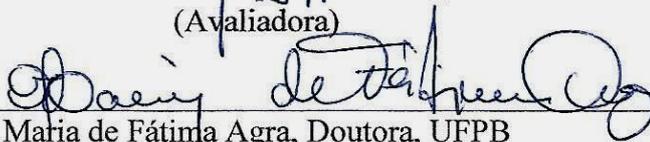
Leonardo Pessoa Felix, Doutor, UFPB
(Orientador)



Marcelo Guerra, Doutor, UFPE
(Avaliador)



Ana Maria Benko-Jesppon, Doutora, UFPE
(Avaliadora)



Maria de Fátima Agra, Doutora, UFPB
(Avaliadora)



Ana Emília Barros e Silva, Doutora, UFPB
(Avaliadora)

Data da realização: 22 de abril de 2019

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. Leonardo Pessoa Felix
Orientador

In memoriam ao agricultor José Morais Cordeiro.

Homem sábio, simples e humilde. Meu pai, meu
primeiro professor de Botânica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, criador de todas as coisas, fonte da ciência, fortaleza e sabedoria do ser humano. Agradeço pela força, coragem, proteção e inteligência durante todos os momentos da minha vida.

Ao P PGA (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) pelo suporte técnico. Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento da pesquisa. Ao INSA (Instituto Nacional do Semiárido) pelo apoio institucional e cessão de equipamentos, e ao Laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) pela concessão de uso do laboratório;

Ao professor Leonardo Pessoa Felix pela orientação e ensinamentos na área de Botânica e Citogenética. A Eric Hágsater (herbário AMO, México), Edlley Pessoa (UFMT) e Erton Almeida (INSA) pelo auxílio em identificações taxonômicas, concessão de materiais vegetais e apoio em trabalhos de campo. A Lucas Costa, Gustavo Souza e Amanda Santos (UFPE) pelo auxílio na pesquisa de laboratório;

Aos avaliadores Marcelo Guerra, Ana Maria Benko-Iseppon, Maria de Fátima Agra e Ana Emília Barros e Silva pelas contribuições valiosas na melhoria do trabalho.

Aos familiares: Creuza Pereira Cordeiro (mãe), Tatiana Renata (esposa), Lyana Maria (filha) e Miguel Cordeiro (irmão) pelo apoio e ajuda cotidiana.

Aos amigos do laboratório de Citogenética vegetal da UFPB: Saulo Alves, Felipe Nollet, Angeline Maria, Charles, Enoque, Achilles, William, Rosemere, Ronimere, Maria das Graças, Rodrigo Garcia, José Lorivaldo, Harrison, Karla, Ingrid Torres; Aos amigos da UFPE: Cláudio Montenegro e Sibelly Dias; Aos amigos Luciana Ledra, Adriana, Maria José, Sarah Nascimento, Bruno César, Lânia Isis, Cattleya e Normanda. A todos sou grato pelo companheirismo e apoio no decorrer dos estudos e pesquisas.

*Em favor da liberdade, / Iniguaçu prosseguiu
Incendiando engenhos / Em defesa do Brasil
Não era só fazer guerra / Era defender a Terra
Que o colono invadiu*

Gustavo de Oliveira. Cordel - *Iniguaçu e o massacre de Tracunhaém*. ONG Saci, Serra da Raiz, PB, 2019.

CORDEIRO, Joel Maciel Pereira. **Citotaxonomia do gênero Neotropical *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae): discutindo grupos infragenéricos**. 2019. 131f. Tese. Doutorado em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

O gênero *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae) abrange cerca de 1.800 espécies distribuídas pelas regiões Neotropicais. Suas espécies apresentam alto grau de variação morfológica, interações ecológicas e diversidade no número cromossômico, o que, por vezes, dificulta o estabelecimento de classificações infragenéricas e organizações taxonômicas no gênero. O presente trabalho tem como objetivo discutir o número cromossômico e a distribuição de regiões heterocromáticas com o uso dos fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4´6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) em espécies de distintos grupos infragenéricos de *Epidendrum*, assim como analisar o cariótipo (número cromossômico e bandas heterocromáticas) e o tamanho do genoma (2C DNA) em espécies dos grupos “Difforme” e “Nocturnum”. A aliança *Epidendrum nocturnum* é marcada por eventos de poliploidia e regiões ricas em pares de base GC (CMA⁺) localizadas na região proximal das espécies. O conteúdo de DNA nuclear foi, de forma geral, correlacionado ao nível de ploidia, onde uma espécie diploide apresentou 2C = 2,91 µg, espécies tetraploides apresentaram 2C ~ 6,00 µg e uma espécie hexaploide apresentou 2C = 8,92 µg. Para o grupo “Difforme”, todas as espécies apresentaram 2n = 40 e números variáveis de 0-4 bandas terminais e 8-16 bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻. O conteúdo de DNA nuclear variou de 3,99 µg em *E. campaccii* Hágsater & L.Sánchez a 5,68 µg em *E. althausenii* A.D.Hawkes. Novas considerações taxonômicas são propostas ao conciliar as informações de distribuição de heterocromatina, tamanho do genoma, número cromossômico e caracteres morfológicos para as espécies dos grupos “Difforme” e “Nocturnum”. A discussão envolvendo distribuição de heterocromatina em diferentes grupos infragenéticos de *Epidendrum* abrangeu 47 espécies pertencentes a 20 grupos. Novos registros cromossômicos foram registrados para 22 espécies. A maioria dos cariótipos apresentou 2n = 40 e regiões heterocromáticas ricas em pares de base GC (CMA⁺). Bandas heterocromáticas ricas em AT (DAPI⁺) foram registradas especialmente nos grupos *Schistochilum* e *Loefgrenii*. As variações no número cromossômico aliados à distribuição de heterocromatina parecem seguir um padrão específico para a maioria dos grupos analisados. Fatores ecológicos como hábito e habitat das plantas e distribuição geográfica também são discutidos entre os diferentes grupos de *Epidendrum* e conciliados nas discussões infragenéricas do gênero.

Palavras-chave: Displóidia, Epidendroideae, Heterocromatina, Poliploidia, Tamanho do Genoma, Variação cariotípica.

CORDEIRO, Joel Maciel Pereira. **Cytotaxonomy of the genus Neotropical *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae): discussing infrageneric groups.** 2019. 131f. Thesis. Doctor Science in Agronomy, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.

ABSTRACT

Epidendrum L. (Laeliinae, Orchidaceae) has about 1,800 species distributed in the Neotropical regions. Their species present a high degree of morphological variation, ecological interactions and diversity in the chromosome number, which, at times, makes it difficult to establish infrageneric classifications and taxonomic organization in the genus. The aim of this research was to discuss the chromosomal number and the distribution of heterochromatic regions with the use of the fluorochromes cromomycin A₃ (CMA) and 4'6-diaminidine-2-phenylindole (DAPI) in species of different infrageneric groups of *Epidendrum*, as well as to analyze the karyotype (chromosome number and heterochromatic bands) and genome size (2C-value) in species of the "Difforme" and "Nocturnum" groups. The "Nocturnum" group is marked by polyploidy and regions rich in CMA⁺ bands located in the pericentromeric region. DNA content was generally correlated to the level of ploidy, where one diploid species presented 2C = 2.91 µg, tetraploids species presented 2C ~ 6.00 µg and one hexaploid species presented 2C = 8.92 µg. For the "Difforme" group, all species presented 2n = 40 and variable numbers of terminal (0-4) and pericentromeric (8-16) CMA⁺/DAPI⁻ bands. DNA content ranged from 3.99 µg in *E. campaccii* Hágsater & L. Sanchez to 5.68 µg in *E. althausenii* A.D. Hawkes. The data of heterochromatin distribution, 2C-value, chromosome number and morphological characters allowed discussing new taxonomic considerations for the species of the "Difforme" and "Nocturnum" groups. The discussion involving heterochromatin distribution on infragenerics groups of *Epidendrum* comprised 47 species belonging to 20 groups. New chromosome records are recorded for 22 species. Most karyotypes presented 2n = 40 and heterochromatic regions rich in GC (CMA⁺). Heterochromatic bands rich in AT (DAPI⁺) were recorded especially in the Schistochilum and Loeffgrenii groups. Variations in the chromosomal number allied to the heterochromatin distribution appear to follow a specific pattern for most of the groups analyzed. Ecological factors such as habit and habitat and geographic distribution are also discussed among the different groups of *Epidendrum* and reconciled in the infrageneric discussions for the genus.

Keywords: Dysploidy, Epidendroideae, Genome size, Heterochromatin, Karyotype variation, Polyploidy.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Fundamentação teórica

Figura 1. Distribuição geográfica e alguns aspectos ecológicos de *Epidendrum*.....14

Figura 2. Análises filogenéticas das regiões ITS, *matK*, *Trn-L* em espécies de *Epidendrum*.....18

Tabela 1. Números cromossômicos registrados para *Epidendrum* distribuídos em seus respectivos grupos infragênicos.....21

Tabela 2. Espécies de *Epidendrum* analisadas quanto ao conteúdo de DNA e seus respectivos números cromossômicos e referências.....28

- Capítulo 1. Poliploidia, heterocromatina e tamanho do genoma em *Epidendrum* L. “grupo Nocturnum” (Laeliinae, Orchidaceae)

Figura 1. Espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum” analisadas.....44

Figura 2. Metáfases mitóticas em espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum”.....47

Figura 3. Distribuição do conteúdo de DNA (2C) entre as espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum” e seus respectivos níveis de ploidia.....48

Tabela 1. Lista de espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum” analisadas, incluindo *E. ciliare*, e seus respectivos vouchers, local de coleta, número cromossômico, bandas heterocromáticas e tamanho do genoma (2C DNA).....45

- Capítulo 2. Análises cariotípicas e de tamanho do genoma contribuem para a organização taxonômica de *Epidendrum* L. “grupo Difforme” (Laeliinae, Orchidaceae)

Figura 1. Espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme” analisadas.....66

Figura 2. Distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme”.....67

Figura 3. Metáfases mitóticas em espécies de *Epidendrum* “grupo Difforme”.....70

Figura 4. Filogenia, bandas heterocromáticas e tamanho do genoma em espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme”.....74

Tabela 1. Lista de espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme” analisadas e seus respectivos vouchers, procedência, número cromossômico, bandas heterocromáticas e tamanho do genoma (2C DNA).....71

- Capítulo 3. Discutindo grupos infragenéricos de *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae) com base em números cromossômicos e distribuição de heterocromatina

Figura 1. Espécies de distintos grupos infragenéricos de *Epidendrum* (Orchidaceae).....95

Figura 2. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae), grupos Alpicolum, Amblostoma, Amblostomioides, Aquaticum, Campestre, Coilostylis, Compressum e Coronatum.....103

Figura 3. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae), grupos Difforme e Incomptum.....104

Figura 4. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae), grupos Lanium, Loeffgrenii, Nanodes e Nocturnum.....105

Figura 5. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae), grupos Pseudepidendrum, Ramosum e Schistochilum.....106

Figura 6. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae), grupos Schistochilum, Setiferum, Smaragdinum e Spathiger.....107

Tabela 1. Lista de espécies de *Epidendrum* analisadas, distribuídas em seus respectivos grupos infragenéricos e suas principais características.....91

Tabela 2. Espécies de *Epidendrum* analisadas e seus respectivos Vouchers, Hábito/Habitat e principais informações citológicas.....97

Material Suplementar S1. Padrões de composição e localização da heterocromatina registradas para as espécies de *Epidendrum* analisadas.....123

Material Suplementar S2. Padrão de distribuição de heterocromatina verificada entre diferentes grupos infragenéricos de *Epidendrum*.....124

Material Suplementar S3. Números cromossômicos registrados para *Epidendrum* distribuídos em seus respectivos grupos infragenéricos.....125

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 Ecologia e distribuição geográfica de <i>Epidendrum</i>	13
2.2 Classificação infragenérica de <i>Epidendrum</i>	15
2.3 Filogenia.....	17
2.4 Número cromossômico em <i>Epidendrum</i>	19
2.5 Citotaxonomia e padrão de distribuição de heterocromatina.....	24
2.6 Conteúdo de DNA nuclear	25
3. REFERÊNCIAS	29

CAPÍTULO I

Poliploidia, heterocromatina e tamanho do genoma em espécies de <i>Epidendrum</i> L. “grupo Nocturnum” (Laeliinae, Orchidaceae).....	39
--	----

CAPÍTULO II

Análises cariotípicas e de tamanho do genoma contribuem para a organização taxonômica de <i>Epidendrum</i> L. “grupo Difforme” (Laeliinae, Orchidaceae)	63
---	----

CAPÍTULO III

Discutindo grupos infragenéricos de <i>Epidendrum</i> L. (Laeliinae, Orchidaceae) com base em números cromossômicos e distribuição de heterocromatina	87
---	----

CONCLUSÕES GERAIS	130
-------------------------	-----

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero Neotropical *Epidendrum* L. aparece entre os mais diversificados da família Orchidaceae com aproximadamente 1.800 espécies (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a,b; PINHEIRO et al., 2009; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a). Suas espécies são distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos ao norte da Argentina, além de ser notavelmente cultivada em outras regiões (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a). Apresenta ampla variação morfológica, especialmente em relação ao hábito (epífita, rupícola ou terrestre) e tamanho, morfologia e cor das flores (amarelas, esverdeadas, brancas, vermelhas, rosadas e púrpuras) (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013). O gênero ocorre em uma extensa variedade de habitats, especialmente em florestas tropicais úmidas, mas, além disso, em áreas ciliares, dunas litorâneas, *tepuys* e afloramentos rochosos em regiões semiáridas (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013).

Classificações infragenéricas em *Epidendrum* têm sido propostas (PABST & DUNGS, 1975; BRIEGER, 1976-1977; DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985), baseadas especialmente em caracteres morfológicos e, muitas vezes, são complexas e difíceis de serem interpretadas devido à ampla variação morfológica e diversidade de espécies do gênero. O tratamento infragenérico mais aceito atualmente foi proposto por Hágsater (1985), o qual classifica o gênero *Epidendrum* conforme as afinidades morfológicas das espécies, sendo descritos 40 grupos informais. Análises filogenéticas preliminares confirmam o monofiletismo da maioria destes grupos (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a,b), além de apontar uma correlação entre distribuição geográfica e ecologia das espécies. Nos últimos anos estes grupos têm sido atualizados e ampliados conforme novas espécies têm sido descritas (HÁGSATER & SALDAÑA, 2013, 2015, 2016; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a,b), compondo atualmente mais de 80 grupos.

Na citogenética, o gênero *Epidendrum* é caracterizado pelo predomínio de $2n = 40$ (65% das espécies registradas), mas com registros de variações por displóidia e poliploidia se destacando em determinados grupos, como *Schistochilum* (= *Amphiglottium*), *Nocturnum*, *Coilostylis* e *Smaragdinum* (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Além disso, muitas espécies apresentam ampla variação intraespecífica, como *E. secundum*

Jacq. ($2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80$ e 84 ; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013), *E. radicans* Pav. ex Lindl. ($2n = 40, 60, 62, 64$ e 70 ; TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009) e *E. ibaguense* Kunth ($2n = 58, 70, 72$ e 76 ; PINHEIRO et al., 2009; NÓBREGA et al., 2017). As variações por poliploidia e disploidia intra e interespecíficas em *Epidendrum* dificultam a interpretação de um número básico ancestral para o gênero, embora $x = 20$ (FELIX & GUERRA, 2010) ou $x = 10$ (ASSIS et al., 2013) sejam os mais aceitos para explicar a evolução cariotípica do gênero e estabelecer relações com outros grupos de Laeliinae.

As variações morfológicas e cariotípicas, além das relações taxonômicas em *Epidendrum*, podem ser melhor interpretada com auxílio de diferentes técnicas. Entre elas, a análise do padrão de distribuição de heterocromatina com uso dos fluorocromos cromomicina A_3 (CMA) e 4'-6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) e a quantificação do conteúdo de DNA nuclear (2C) têm se mostrado bastante promissoras. Apesar de ainda escassos em *Epidendrum*, o uso destas técnicas tem permitido a discussão de diferentes hipóteses envolvendo híbridos naturais (ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013; MARQUES et al., 2014), descrição de novas espécies (PESSOA et al., 2014) e discussões citotaxonômicas em diferentes grupos infragenéricos (ASSIS, 2013).

O presente trabalho tem como objetivo discutir o número cromossômico e a distribuição de regiões heterocromáticas com o uso dos fluorocromos cromomicina A_3 (CMA) e 4'-6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) em espécies de distintos grupos infragenéricos de *Epidendrum*, assim como analisar o cariótipo (número cromossômico e bandas heterocromáticas) e o tamanho do genoma (2C DNA) em espécies dos grupos “Difforme” e “Nocturnum”. Tais análises serão aliadas a discussões taxonômicas, ecológicas e evolutivas dentro de *Epidendrum* para contribuir com melhor entendimento da organização infragenérica do gênero.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ecologia e distribuição geográfica de *Epidendrum*

O gênero *Epidendrum* é Neotropical e suas espécies são distribuídas do sudeste dos Estados Unidos ao norte da Argentina, mas com maior diversidade em florestas úmidas andinas e subandinas da América do Sul e da América Central (HÁGSATER &

SOTO-ARENAS, 2005a; Figura 1). Para o Brasil são descritas cerca de 150 espécies, com maior distribuição pelas Matas úmidas do leste do país e na floresta Amazônica, embora o Cerrado também apresente considerável diversidade de espécies (BFG, 2015).

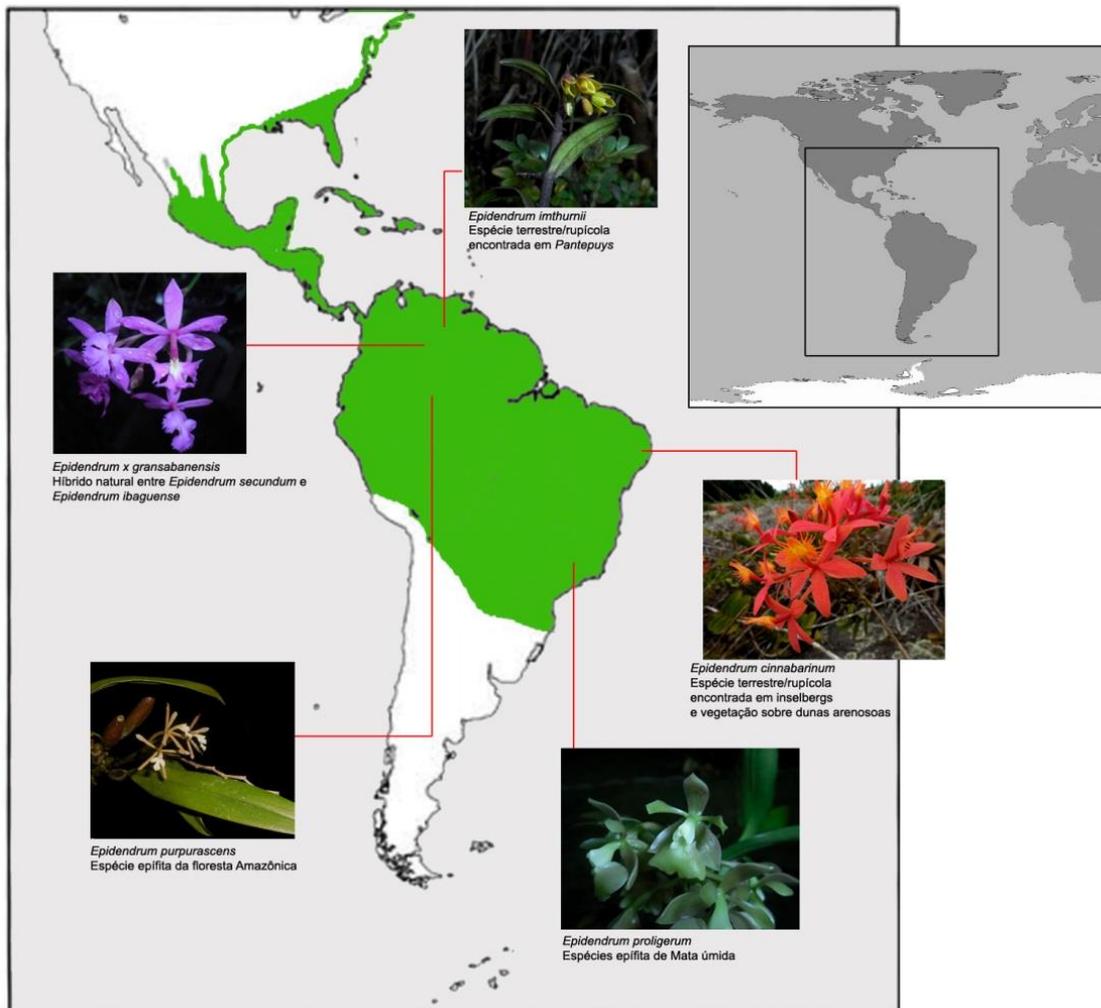


Figura 1. Distribuição geográfica (verde) e alguns aspectos ecológicos de *Epidendrum*.
Fonte: adaptado de Hágsater & Soto-Arenas (2005a).

As espécies de *Epidendrum* são comumente encontradas em florestas úmidas da América tropical, sendo algumas encontradas em dunas de areia, matas ciliares, vegetações arbustivas, áreas alagadiças, afloramentos rochosos, inselbergs e tepuys (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; STANCIK et al., 2009; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a,b). As espécies são tipicamente epífitas ou litófitas, embora muitas delas sejam completamente terrestres, como *Epidendrum cernuum* Kunth, *E. elleanthoides* Schltr. e *E. dendrobioides* Thunb. Algumas poucas espécies de *Epidendrum* são encontradas em associação com “ninhos de formigas” como *E.*

flexuosum G.Mey, *E. baumannianum* Schltr., *E. macrocarpum* Rich. e *E. smarigdinum* Lindl. (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a).

A maioria das espécies de *Epidendrum* é polinizada por borboletas e mariposas (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013). A maioria das espécies polinizadas por mariposas são fragrantas durante a noite e têm flores brancas ou verdes, em formato de estrela, com parte do perianto estreito e nectário aprofundado (espécies do grupo *Nocturnum* e *Coilostylis*, por exemplo) (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a). As espécies polinizadas por borboletas têm fragrâncias fracas, mas apresentam flores de colorido vivo e brilhante, como em membros do subgênero *Amphiglottium* (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013).

Híbridos naturais são ocasionalmente encontrados em *Epidendrum*, especialmente pertencentes à *Amphiglottium* (FERNÁNDEZ-CONCHA & RAMÍREZ-MORILLO, 2003; ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013; MARQUES et al., 2014). Parte das espécies de *Epidendrum* que ocorrem em simpatria, especialmente aquelas de hábito terrestre/litófitas, apresentam baixas barreiras reprodutivas, alta compatibilidade polínica, compartilham diversos agentes polinizadores e têm períodos de floração em comum (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013), comumente resultando em cruzamentos interespecíficos e origem de híbridos naturais.

2.2 Classificação infragenérica de *Epidendrum*

O nome *Epidendrum* deriva do grego *Epi* (sobre) e *Dendrum* (árvore), em referência ao hábito epífita da primeira espécie descrita (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a). O conceito inicial de *Epidendrum* foi designado por Linnaeus em 1753 referindo-se a diversas espécies de orquídeas de hábito epífita dos trópicos (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a). Entretanto, nenhuma das espécies inicialmente descritas como *Epidendrum* estão atualmente incluídas neste gênero, mas correspondem a outros grupos, como *Brassavola* Adans., *Cymbidium* SW., *Cyrtopodium* R.Br., *Dendrobium* SW., *Octomeria* R.Br, *Oncidium* SW., *Phalaenopsis* Blume, *Prosthechea* Knowles & Westc. e *Vanda* Jones ex R.Br. (DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985; HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a). Assim, como parte do Congresso Internacional de Botânica de Leningrado em 1975, foi concedido à

conservação do nome genérico *Epidendrum*, com *Epidendrum nocturnum* Jacq. reconhecido como sua espécie tipo (DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985).

Epidendrum pertence à subtribo Laeliinae (tribo Epidendreae, subfamília Epidendroideae) e se distingue dos demais gêneros de Orchidaceae por apresentar geralmente caules longos, eretos e finos, do tipo caniculado, folhas dísticas, flores com margens ventrais da coluna ligadas ao labelo, e o rostelo fendido relativamente paralelo ao eixo da coluna, estigma com lobos laterais bem desenvolvidos, geralmente projetados para fora, e um nectário do tipo caniculado (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a,b; STANCIK et al., 2009).

No nível infragenérico, determinadas classificações em *Epidendrum* foram propostas baseadas especialmente em caracteres morfológicos das espécies (presença/ausência de pseudobulbo, duas/muitas folhas, tipo de inflorescência e caracteres florais). Tradicionalmente, o gênero foi dividido em quatro subgêneros: *Epidendrum* Lindl., *Spathium* Lindl., *Amphiglottium* Lindl. e *Strobilifera* Lindl. (LINDLEY, 1852-1859). Diferentes autores, como Cogniaux (1898-1902), Dressler (1984), Pabst e Dungs (1975) e Brieger (1976-1977) reconhecem estes subgêneros e organizam as espécies em diferentes grupos, seções, subseções e alianças com base em caracteres morfológicos individuais (presença de pseudobulbos, inflorescência lateral, base da coluna, número e tipo de polínias, tamanho do viscido, entre outros). Contudo, a maioria destes tratamentos é difícil de ser interpretados mediante a diversidade de espécies do gênero e a ampla variação de caracteres morfológicos, além da maioria dos grupos não ser congruente com propostas filogenéticas, o que leva a formação de grupos polifiléticos ou parafiléticos (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a,b). A classificação infragenérica atualmente mais usada para *Epidendrum* foi proposta por Hágsater (1985), o qual dividiu o gênero em 40 grupos informais com base em afinidades de caracteres morfológicos. Análises filogenéticas preliminares confirmam o monofiletismo da maioria destes grupos (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a,b; PINHEIRO et al., 2009; CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018), além de apontar uma correlação entre distribuição geográfica e ecologia das espécies. Nos últimos anos estes grupos têm sido atualizados e ampliados conforme novas espécies têm sido descritas (HÁGSATER & SALDAÑA, 2013, 2015, 2016; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a,b), compondo atualmente mais de 80 grupos.

Entre os grupos, apenas *Amphiglottium* tem recebido maior atenção, seja em relação a estudos filogenéticos (PINHEIRO et al., 2009; CARDOSO-GUSTAVSON et

al., 2018), aspectos ecológicos e de especiação (PINHEIRO & COZZOLINO, 2013; PINHEIRO et al., 2014; CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018), citogenéticos (FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013) e análises do tamanho do genoma (ASSIS, 2013; MARQUES et al., 2014). Os demais grupos se restringem especialmente a trabalhos taxonômicos, como verificado nos grupos *Nocturnum* (CARNEVALI & ROMERO, 1996), *Difforme* (SALDAÑA & HÁGSATER, 1996; PESSOA et al., 2014) e *Incomptum* (FRAGA et al., 2015; PESSOA et al., 2015).

2.3 Filogenia

O gênero *Epidendrum* é monofilético e na subtribo Laeliinae aparece relacionado aos gêneros *Barkeria* Knowles & Westc., *Caularthron* Raf., *Myrmecophila* Rolfe e *Orleanesia* Barb. Rodr. (van den BERG et al., 2009; FREUDENSTEIN & CHASE, 2015). *Amphiglottium*, até então, aparece como o grupo mais estudado em relação a análises filogenéticas (PINHEIRO et al., 2009; PESSOA et al., 2012; CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018). O grupo aparece como um clado monofilético bem suportado, dividido entre as distintas regiões biogeográficas de ocorrência das espécies, como o clado Andean (espécies distribuídas ao longo dos Andes e montanhas do escudo das Guianas) e o clado Atlantic (espécies distribuídas ao longo da costa brasileira, mas, além disso, no Cerrado e Caatinga) (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; PINHEIRO et al., 2009; PESSOA et al., 2012).

Para o gênero *Epidendrum*, de forma geral, Hágsater e Soto-Arenas (2005a,b) analisaram sequências de DNA das regiões ITS, *matK* e *Trn-L* de cerca de 300 espécies (Figura 2). Nos resultados foi observado que a maioria dos grupos propostos por Hágsater (1985) constituíam em clados monofiléticos. Além disso, houve uma correlação entre a distribuição geográfica das espécies, com o clado mais basal de distribuição mexicano-mesoamericana, seguido pelo clado com espécies de distribuição andina e um clado mais derivado, composto por espécies amplamente distribuídas (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005b).

Nas análises filogenéticas propostas por Hágsater e Soto-Arenas (2005a,b) verifica-se que diferentes caracteres morfológicos em *Epidendrum* (presença de pseudobulbo, flores em forma de estrela, hábito da planta) aparecem em linhagens distintas ao longo da evolução do gênero. Isto reforça a observação que caracteres morfológicos individuais das espécies são inapropriados para organizações

infragenéricas do gênero e podem gerar grupos polifiléticos ou parafiléticos (HÁGSATER, 1985; HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a,b).

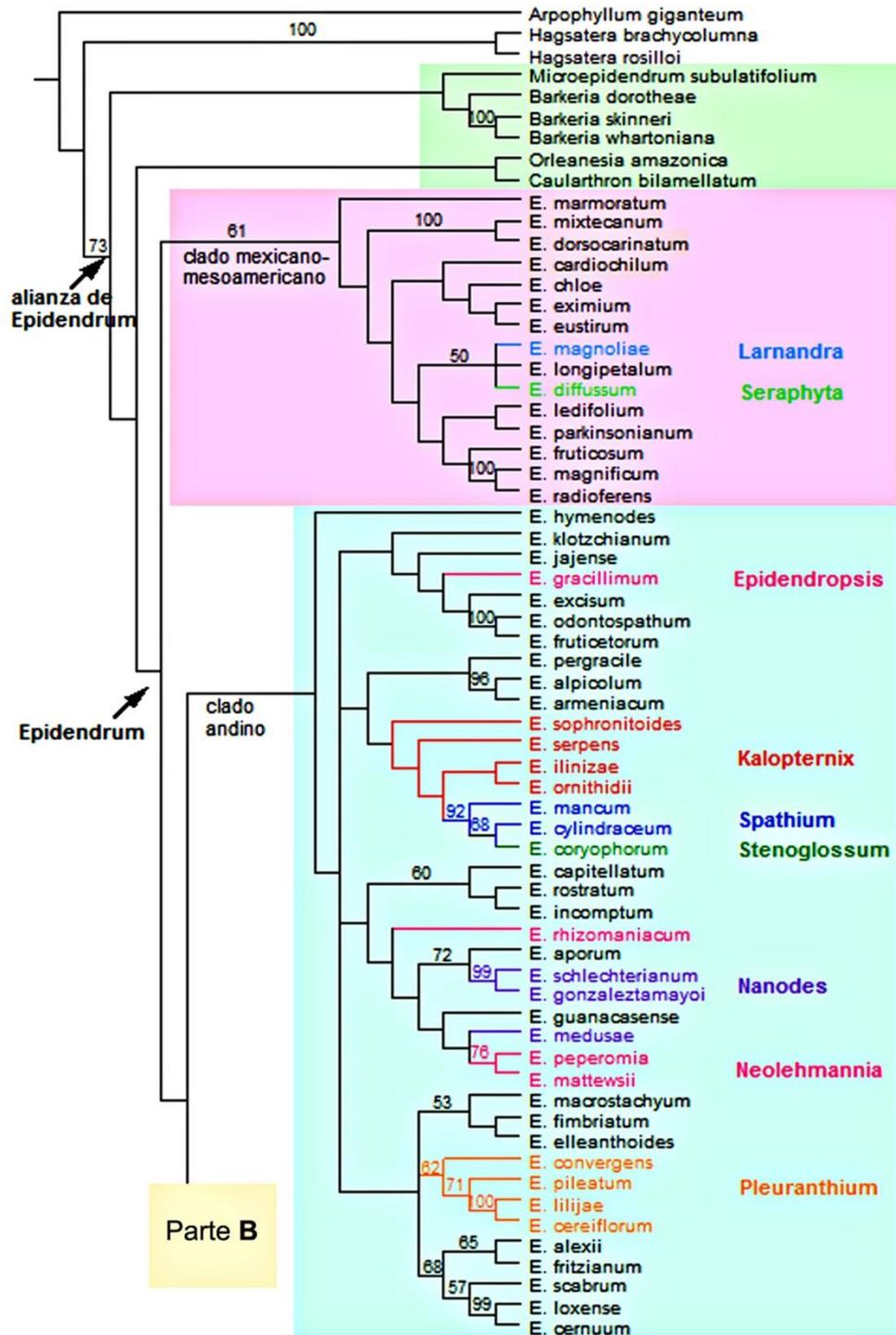


Figura 2. Análises filogenéticas das regiões ITS, *matK*, *Trn-L* em espécies de *Epidendrum*. Fonte Hágsater e Soto-Arenas (2005a,b). Continua...

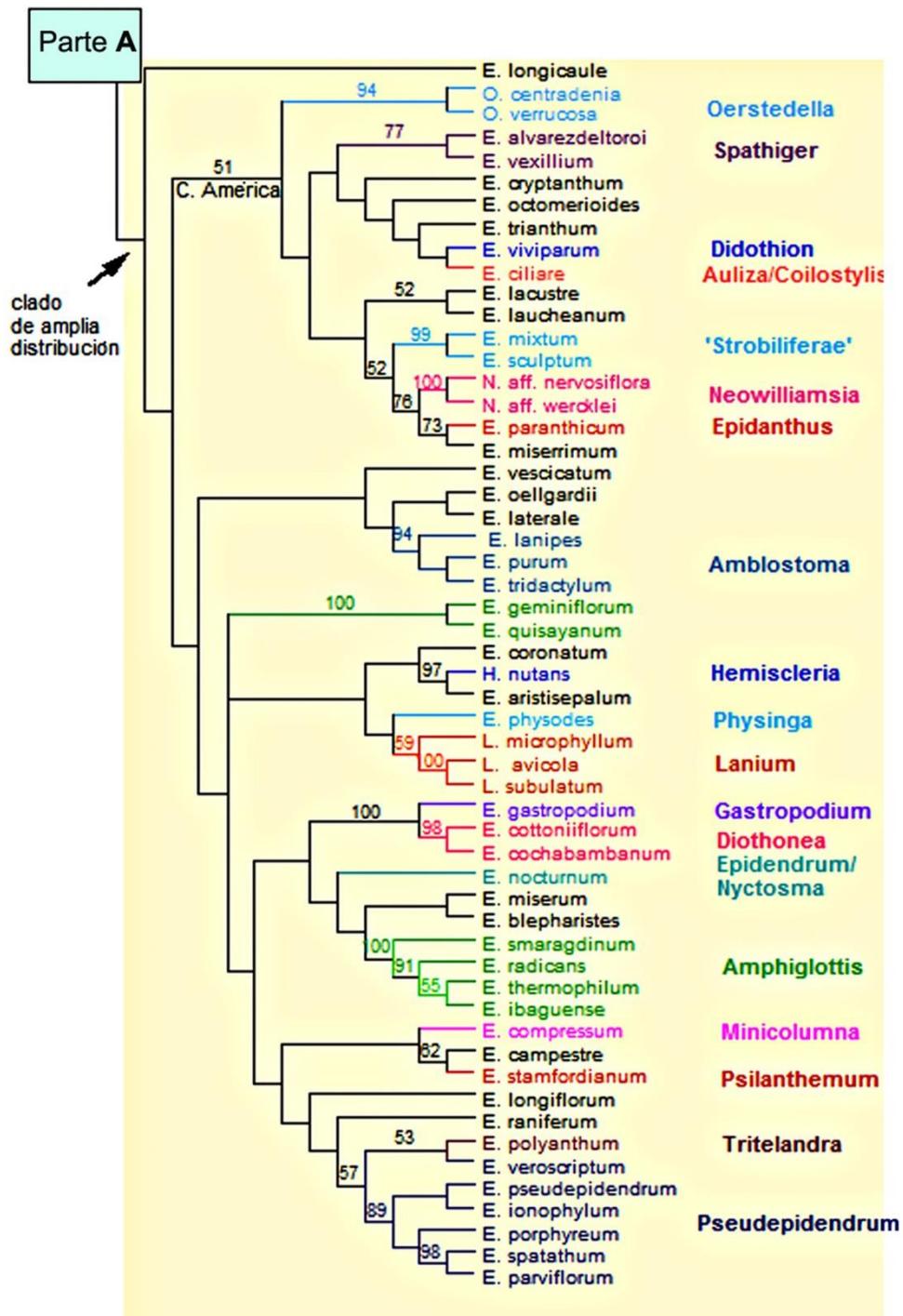


Figura 2. Continuação.

2.4 Número cromossômico em *Epidendrum*

Entre as 1.800 espécies de *Epidendrum*, registros cromossômicos são descritos para 41 espécies, o que representa 2,27% do gênero (Tabela 1). O gênero apresenta ampla variação no número cromossômico, com registros que podem variar de $2n = 24$

em *E. fulgens* Brongn. (ASSIS et al., 2013; MORAES et al., 2013) a $2n = 240$ em *E. cinnabarinum* Salzm. (FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Contudo, o número cromossômico predominante é $2n = 40$, registrado para 69% das espécies analisadas (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013; Tabela 1).

Variações interespecíficas por poliploidia e disploidia são encontradas especialmente nos grupos Schistochilum, Nocturnum, Smaragdinum e Coilostylis (Tabela 1). Determinadas espécies apresentam ampla variação intraespecífica, conforme verificado em *E. secundum* ($2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80$ e 84 ; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013), *E. radicans* Pav. ex Lindl. ($2n = 40, 60, 62, 64$ e 70 ; TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009) e *E. ibaguense* Kunth ($2n = 58, 70, 72$ e 76 ; PINHEIRO et al., 2009; NÓBREGA et al., 2017). As variações numéricas ocorrentes em *Epidendrum* são decorrentes principalmente de eventos de disploidia e poliploidia ao longo da evolução do gênero (FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Parte das variações cromossômicas em *Epidendrum*, além disso, pode ser decorrente de hibridizações (recentes ou antigas) e introgressões entre espécies de números cromossômicos diferentes (PINHEIRO et al., 2009; ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013).

A significativa variação cromossômica numérica nas espécies de *Epidendrum* dificulta o estabelecimento de um número básico ancestral para o gênero. O número cromossômico $2n = 40$ aparece como o mais frequente entre as espécies analisadas cariologicamente (PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Espécies de grupos próximos na subtribo Laeliinae (*Caularthron* Rafin, *Brassavola* R.Br., *Encyclia* Hook. e *Dimerandra* Schltr.) também compartilham o mesmo número cromossômico (FELIX & GUERRA, 2010). Assim, $x = 20$ de forma consensual é proposto como o número básico ancestral de *Epidendrum* (FELIX & GUERRA, 2010). Contudo, para alguns grupos, especialmente Schistochilum, os números cromossômicos registrados para as espécies são, em maior parte, diferentes de $2n = 40$. Para Assis et al. (2013), o número básico ancestral que melhor explicaria a variação numérica para Schistochilum seria $x = 12$. Medeiros-Neto (em preparação) descreve a evolução cariotípica de *Epidendrum* utilizando softwares de análises probabilísticas (ChromEvol; MAYROSE et al. 2010). Os resultados sugerem $x = 10$ como número básico ancestral de *Epidendrum*, o que conciliaria a ampla variação numérica registrada para Schistochilum e o frequente registro de $2n = 40$ nos demais

grupos. Entretanto, amostragens mais completas entre os diferentes grupos (Tabela 1) demonstra que apenas em *Schistochilum* e *Smaragdinum* ocorrem o predomínio de $n \neq 20$. Nos demais grupos prevalecem $2n = 40$ ou ocorrem séries poliploides correlacionadas ($2n = 80, 120, 160$). Desta forma, $x = 20$ seria o número básico ancestral mais aceito para *Epidendrum*, assim como verificado para a maioria dos representantes da subtribo Laeliinae (FELIX & GUERRA, 2010).

Tabela 1. Números cromossômicos registrados para *Epidendrum* distribuídos em seus respectivos grupos infragenéricos conforme proposta de Hágsater (1985).

Grupo / Espécie	Número cromossômico e referência
Grupo Alpicolum	
<i>E. armeniacum</i> Lindl.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013)
Grupo Amblostoma	
<i>E. lanipes</i> Lindl.	$2n = 40$ (Goldblatt, 1985)
<i>E. tridactylum</i> Lindl.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013)
Grupo Coilostylis	
<i>E. ciliare</i> L.	$2n = 40$ (Assis, 2013)
	$2n = 40, 80, 160$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. viviparum</i> Lindl.	$2n = 40$ (Assis, 2013)
Grupo Cristatum	
<i>E. cooperianum</i> Bateman	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. cristatum</i> Ruiz and Pavon	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Difforme	
<i>E. campaccii</i> Hágsater & L. Sánchez	$2n = 40$ (Pessoa et al., 2014)
<i>E. difforme</i> Jacq.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. latilabre</i> Lindl.	$2n = 40$ (Felix & Guerra, 2010; Assis et al., 2013)
<i>E. pseudodifforme</i> Hoehne & Schltr.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013)
<i>E. sanchezii</i> E.Pessoa & L.P.Felix	$2n = 40$ (Pessoa et al., 2014)
Grupo Incomptum	
<i>E. proligerum</i> Barb. Rodr.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013)

Grupo Lanium

E. avicula Lindl. $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010)

Grupo Loefgrenii

E. loefgrenii Cogn. $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)

Grupo Magnoliae

E. magnoliae Muhl. $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)

E. propinquum A. Rich. & Galeotti $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)

Grupo Mutelianum

E. patens Sw. $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)

Grupo Nocturnum

E. nocturnum Jacq. $2n = 40, 80$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010)
 $2n = 80$ (Assis et al., 2013)

Grupo Pseudepidendrum

E. paniculatum Ruiz & Pav. $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Assis et al., 2013)

Grupo Ramosum

E. ramosum Jacq. $2n = 40$ (Assis et al., 2013)

E. strobiliferum Rchb.f. $2n = 24$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)

Grupo Schistochilum =**Amphyglottis**

E. blepharistes Barker ex Lindl. $2n = 40$ (Goldblatt & Johnson, 1994)

E. calanthum Rchb.f. & Warsc. $2n = 30$ (Pinheiro et al., 2009)

E. cinnabarinum Salzm $2n = 240$ (Felix & Guerra, 2010; Assis et al., 2013)

E. cochlidium Lindl. $2n = 28$ (Pinheiro et al., 2009)

E. denticulatum Barb. Rodr. $2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Pinheiro et al., 2009);
 $2n = 38$ (Assis et al., 2013)

E. ellipticum Grah. $2n = 56$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)

$2n = 68$ (Felix & Guerra, 2010)

E. ibaguense Kunth. $2n = 58, 72, 76$ (Nóbrega et al., 2017)

	$2n = 70$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. flammeum</i> E. Pessoa & M. Alves	$2n = 50$ (Assis, 2013)
<i>E. flexuosum</i> G. Mey	$2n = 28$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. fulgens</i> Brongn.	$2n = 24$ (Pinheiro et al., 2009; Moraes et al., 2013; Assis et al., 2013)
<i>E. myrmecophorum</i> Barb. Rodr.	$2n = 120$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. puniceoluteum</i> F.Pinheiro & F.Barros	$2n = 52$ (Pinheiro et al., 2009); $2n = 56$ (Moraes et al., 2013)
<i>E. purpureum</i> Barb. Rodr.	$2n = 56$ (Tanaka & Kamemoto, 1984) $2n = 120$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. radicans</i> Pav. ex Lindl.	$2n = 40, 57, 62, 64, 70$ (Tanaka & Kamemoto, 1984) $2n = 60$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. secundum</i> Jacq.	$2n = 28, 40, 48, 52, 80$ (Pinheiro et al., 2009); $2n = 30, 40, 42, 48, 50, 54, 56, 58, 84$ (Assis et al., 2013) $2n = 50, 56, 58, 68, 84$ (Assis, 2013) $2n = 56, 60$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	$2n = 28, 30, 60$ (Pinheiro et al., 2009); $2n = 40, 60, \text{ca. } 80$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Seraphyta	
<i>E. diffusum</i> Sw.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Smaragdinum	
<i>E. orchidiflorum</i> (Salzm.) Lindl.	$2n = 112$ (Assis et al., 2013); $2n = \text{ca. } 120$ (Assis, 2013)
Grupo Spathiger	
<i>E. rigidum</i> Jacq.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010)

2.5 Citotaxonomia e padrão de distribuição heterocromatina

O termo “citotaxonomia” ou “cariossistemática” corresponde ao uso de dados citológicos como auxílio na organização e diferenciação taxonômica de espécies vegetais e animais (GUERRA, 2008). De forma geral, grupos taxonômicos que apresentam caracteres cariotípicos mais similares (número, tamanho e morfologia dos cromossomos, padrão de bandas heterocromáticas, sítios de DNAr) tendem a ser mais relacionados (GUERRA, 2012). Além de auxiliar na organização taxonômica, a citotaxonomia permite ainda estabelecer relações entre diferentes populações de uma mesma espécie ou realizar interpretações filogenéticas e evolutivas entre diferentes grupos (GUERRA, 2008; GUERRA, 2012).

Os caracteres cariotípicos tradicionalmente empregados na citotaxonomia correspondem ao número cromossômico, tamanho e morfologia dos cromossomos e simetria cariotípica (GUERRA, 2008; GUERRA, 2012). Em termos evolutivos, a poliploidia e a disploidia são os fenômenos citológicos mais atuantes em diversos grupos vegetais (GUERRA, 2008; MADLUNG, 2013; ESCUDERO et al., 2014) e podem ser identificados facilmente através do número cromossômico e simetria cariotípica (ver por exemplo, DEMATTEIS, 1998; GALBANY-CASALS et al., 2009; MENDES et al., 2018). Alguns grupos com número cromossômico constante podem ser diferenciados pelo tamanho e morfologia dos cromossomos, especialmente empregando cálculos que medem a razão entre braços curtos e longos e classificações de cromossomos com base na posição do centrômero (metacêntrico, submetacêntrico, telocêntrico, acrocêntrico) (ver, por exemplo, ALVES et al., 2011; MEDEIROS-NETO et al., 2017; BAEZA et al., 2018).

Entretanto, alguns grupos vegetais apresentam números cromossômicos constantes, além de cariótipos simétricos e cromossomos pequenos ($< 2 \mu\text{m}$) de difícil visualização do centrômero. Nestes casos, a análise do padrão de heterocromatina aparece como importante ferramenta na análise citotaxonomica, permitindo diferenciar cariótipos com número, tamanho e morfologia similares (ver, por exemplo, ALMEIDA et al., 2007; BARROS E SILVA et al., 2010; CORDEIRO et al., 2017). Isso é possível graças à capacidade da heterocromatina em se apresentar com coloração diferenciada em relação às regiões eucromáticas no cariótipo das espécies, podendo estas regiões variar em número, tamanho e localização nos cromossomos (HENNIG, 1999; BENNETZEN, 2000; GUERRA, 2000).

Além do número, tamanho e localização das regiões heterocromáticas nos cromossomos, diferentes técnicas, como o uso dos fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4´6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), permitem ainda identificar a composição da heterocromatina rica em GC (guanina/citosina) e AT (adenina/timina), respectivamente (GUERRA, 2000). O uso da dupla coloração CMA/DAPI tem permitido discutir diversas hipóteses envolvendo evolução cariotípica (CHIARINI et al., 2013), descrição de híbridos naturais (ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013), descrição de novas espécies (ALMEIDA et al., 2016), identificação de cromossomos B (NASCIMENTO et al., no prelo) e diferenciação de espécies correlacionadas (ALMEIDA et al., 2007; CORDEIRO et al., 2016; MARINHO et al., 2018).

Em Orchidaceae, estudos envolvendo a análise de distribuição de heterocromatina vêm sendo melhor discutidos nos últimos anos (ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013; PESSOA et al., 2014) e revelam-se promissores para a organização taxonômica de diferentes grupos, especialmente Maxilariinae (MORAES et al., 2017) e Pleurothallidinae (OLIVEIRA et al. 2015). Análises mais aprofundadas quanto ao padrão de bandas heterocromáticas em *Epidendrum*, da mesma forma, podem auxiliar na organização taxonômica e evolutiva do gênero, tendo em vista que o mesmo exibe ampla variação morfológica, ocupa distintos habitats e apresenta significativa variação no número cromossômico (PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). A análise cariotípica usando dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI em *Epidendrum* tem auxiliado descrições de híbridos naturais envolvendo *E. fulgens* × *E. puniceoluteum* (MORAES et al., 2013), *E. secundum* × *E. flammeum*, *E. secundum* × *E. xanthinum* (ASSIS, 2013) e *E. secundum* × *E. ibaguense* (MEDEIROS-NETO, em preparação). Além disso, permitiu uma melhor interpretação de variações intraespecíficas em *E. secundum* (ASSIS, 2013) e descrições de novas espécies, como *E. sanchesii* (PESSOA et al., 2014). Assim, a análise do padrão de bandas heterocromáticas em uma maior amostragem pode auxiliar na organização taxonômica de *Epidendrum* e testar a correlação entre padrões cariotípicos das espécies e classificações infragenéricas do gênero.

2.6 Conteúdo de DNA nuclear

O Conteúdo de DNA nuclear aparece como um importante atributo para todos os eucariotos, e seu conhecimento é importante para muitas áreas de pesquisas, incluindo

taxonomia, ecologia e biologia evolutiva (BENNETT et al., 2000; KRON et al., 2007; VRÁNA et al., 2014). Seu uso é bastante correlacionado com informações citológicas das espécies, tendo em vista que valores de tamanho do genoma variam significativamente em decorrência de variações por poliploidia, disploidia, aneuploidias e quantidade de sequências repetitivas (KRON et al., 2007; SOSA et al., 2016; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2017; GOMES et al., 2018).

Além da variação em decorrência de diferentes fenômenos cariotípicos, o conteúdo de DNA também pode variar em decorrência de fatores ecológicos, morfologia da planta e distribuição geográfica (KNIGHT & ACKERLY, 2002; CIRES et al., 2009; VRÁNA et al., 2014; ŠTUBŇOVÁ et al., 2017; SOUZA et al., 2019). A conciliação destas informações permite auxiliar na organização e delimitação de grupos taxonômicos, conforme observado em *Sisyrinchium* L. (Iridaceae; BURCHARDT et al., 2018), *Carex* L. (Cyperaceae; CHUNG et al., 2012) e *Mecardonia* Ruiz & Pavon (Plantaginaceae; SOSA et al., 2016).

Estudos referentes ao tamanho do genoma em Orchidaceae vêm sendo melhor discutido nos últimos anos (JONES et al., 1998; LEITCH et al., 2009; TRÁVNÍČEK et al., 2015; MORAES et al., 2017; GOMES et al., 2018). A família aparece entre as angiospermas com maiores variações no tamanho do genoma (168 vezes), com valores que vão de $1C = 0,33 \mu\text{g}$ em *Oncidium maduroi* Dressler a $55,4 \mu\text{g}$ em *Pogonia ophioglossoides* (L.) Ker Gawl. (LEITCH et al., 2009). Epidendroideae aparece como a subfamília mais variável entre as Orchidaceae, com valores de conteúdo de DNA variando cerca de 60 vezes ($1C = 0,3 - 19,8 \mu\text{g}$), embora a maioria de suas espécies analisadas seja caracterizada por genomas pequenos (em média $1C = 3,2 \mu\text{g}$) (revisado por LEITCH et al., 2009). Para a subtribo Laeliinae (excluindo *Epidendrum*), o conteúdo de DNA não apresenta variações discrepantes, com valores que vão de $1C = 1,1 \mu\text{g}$ no gênero *Broughtonia* R.Br. a $1C = 2,9 \mu\text{g}$ em *Laelia gouldiana* Rchb.f., com valores médios entre as espécies de $1C = 2,1 \mu\text{g}$ (LEITCH et al., 2009; SOUZA, 2015).

O gênero *Epidendrum* apresenta descrições de valores de conteúdo de DNA para 15 espécies (LEITCH et al., 2009; ASSIS, 2013; MARQUES et al., 2014) (Tabela 2). Diferente das demais espécies da subtribo Laeliinae, *Epidendrum* apresenta significativa variação no conteúdo de DNA (8,3 vezes), com valores que vão desde $2C = 2,42 \mu\text{g}$ em *E. rigidum* Jacq (TRÁVNÍČEK et al., 2015) a $2C = 20,21 \mu\text{g}$ em *E. cinnabarinum* (ASSIS, 2013). Estas diferenças podem ser justificadas especialmente pelo alto número cromossômico de *E. cinnabarinum* ($2n = 240$) (FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et

al., 2013) e a presumível correlação entre poliploidia e conteúdo de DNA (KRON et al., 2007; VRÁNA et al., 2014).

Em Orchidaceae, análises de quantificação de DNA nuclear revelam a ocorrência de fenômenos de endopoliploidia em diferentes tecidos (LIM & LOH, 2003; YANG & LOH, 2004; BORY et al., 2008; TRÁVNÍČEK et al., 2015). Nestes casos, replicações do DNA mitótico em células somáticas não são seguidas por divisão celular (endoreduplicação), mas nas análises de citometria de fluxo múltiplos níveis de ploidia são registrados (KUDO & KIMURA, 2001; YANG & LOH, 2004; TRÁVNÍČEK et al., 2015). Além de Orchidaceae, endopoliploidia tem sido descrita em muitas espécies de plantas, como milho, girassol, tomate, *Arabidopsis* e pode ser comumente encontrada em insetos e mamíferos (revisado por YANG & LOH, 2004). Para Orchidaceae, são descritos dois tipos de endoreduplicação: a endoreduplicação convencional e a endoreduplicação parcial progressiva (BORY et al., 2008; TRÁVNÍČEK et al., 2015). Neste último caso, no histograma de citometria de fluxo aparecem alguns picos de conteúdo de DNA, mas a razão entre eles é menor que 1:2 e aumentam progressivamente com o aumento no número de ciclos de endoreduplicação parcial (BORY et al., 2008; TRÁVNÍČEK et al., 2015). Alguns gêneros, como *Vanilla* Mill., *Paphiopedilum* Pfitzer, *Masdevallia* Ruiz & Pav. e *Dracula* Luer frequentemente apresentam fenômenos de endoreduplicação parcial progressiva (revisado por TRÁVNÍČEK et al., 2015). Para *Epidendrum*, contudo, são descritos apenas ciclos de endoreduplicação convencional (ASSIS, 2013; TRÁVNÍČEK et al., 2015).

Análises de conteúdo de DNA em *Epidendrum* revelaram-se promissores para discutir diferentes hipóteses envolvendo híbridos naturais, especialmente entre *E. madsenii* Hágsater & Dodson × *E. rhopalostele* Hágsater & Dodson × *E. falcisepalum* F.Lehm. & Kraenzl. em florestas tropicais andinas do Equador (MARQUES et al., 2014) e entre *E. flammeum* × *E. secundum* e *E. xanthinum* × *E. secundum* em inselbergs do Sudeste e Nordeste do Brasil (ASSIS, 2013). Além disso, a análise conciliada com variações cariotípicas envolvendo a distribuição de heterocromatina tem contribuído para a caracterização de diferentes grupos, especialmente nos subgêneros *Amphyglottium* e *Epidendrum* (*sensu* BRIEGER, 1976-1977) (ASSIS, 2013). Assim, maiores amostragens envolvendo valores de conteúdo de DNA nuclear conciliado com análises de distribuição de heterocromatina podem ser usados como auxílio na organização taxonômica e para discutir diferentes classificações infragenéricas no gênero *Epidendrum*.

Tabela 2. Espécies de *Epidendrum* analisadas quanto ao conteúdo de DNA e seus respectivos números cromossômicos e referências.

Espécie	2n	2C DNA (µg)	Referência
Grupo Difforme			
<i>E. latilabre</i> Lindl.	40	4,33	Assis, 2013
Grupo Andean			
<i>E. obliquum</i> Schltr como	-	2,87	Jones et al., 1998
<i>E. steinbachii</i> Ames			
Grupo Nocturnum			
<i>E. nocturnum</i> Jacq	40	3,37	Assis, 2013
Grupo Pseudepidendrum			
<i>E. paniculatum</i> Ruiz & Pav	40	3,41	Assis, 2013
Grupo Schistochilum =			
Amphyglottis			
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm.	224	20,21	Assis, 2013
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	38	4,06	Assis, 2013
<i>E. falcisepalum</i> F.Lehm. & Kraenzl.	-	4,08	Marques et al., 2014
<i>E. flammeum</i> E. Pessoa & M. Alves	50	5,04	Assis, 2013
<i>E. fulgens</i> Brongn.	24	3,23	Assis, 2013
<i>E. madsenii</i> Hágsater & Dodson	-	2,69	Marques et al., 2014
<i>E. rhopalosteale</i> Hágsater & Dodson	-	3,13	Marques et al., 2014
<i>E. secundum</i> Jacq.	84	8,24	Assis, 2013
<i>E. secundum</i>	56	4,08	Assis, 2013
<i>E. xanthinum</i> Lindl	28	4,48	Assis, 2013
Grupo Spathiger			
<i>E. rigidum</i> Jacq	40*	2,42	Trávníček et al., 2015

* Número cromossômico obtido de Felix e Guerra (2010).

3. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.C.S.; CARVALHO, P.C.L. & GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 541-547, 2007.
- ALMEIDA, E. M.; WANDERLEY, A. M.; NOLLET, F.; COSTA F. R.; SOUZA, L. G. R. & FELIX, L. P. A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. **Systematic Botany**, v. 41, n. 2, p. 423-429, 2016.
- ALVES, L. I. F.; LIMA, S. A. A.; FELIX, L. P. Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 259-267, 2011.
- ASSIS, F. N. M. **Mecanismos de evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Tese. Doutorado em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil, 2013.
- ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; BARROS E SILVA, A. E.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, n. 3, p. 329-344, 2013.
- BAEZA, C. M.; FINOT, V.; RUIZ, E.; CARRASCO, P.; NOVOA, P.; ROSAS, M.; TORO-NUÑEZ, O. Cytotaxonomic study of the Chilean endemic complex *Alstroemeria magnifica* Herb. (Alstroemeriaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.41, n. 2, 2018.
- BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A.; SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosome Research**, v. 18, n. 4, p. 503-514, 2010.
- BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms and their modern uses—807 new estimates. **Annals of Botany**, v. 86, n. 4, p. 859-909, 2000.

BENNETZEN, J. L. The many hues of plant heterochromatin. **Genome Biology**, 2000. DOI: <http://genomebiology.com/2000/1/1/reviews/107>.

BFG (Brazilian Flora Group). Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BORY, S.; CATRICE, O.; BROWN, S.; LEITCH, I. J.; GIGANT, R.; CHIROLEU, F.; GRISONI, M.; DUVAL, M.; BESSE, P. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). **Genome**, v. 51, p. 816-826, 2008.

BRIEGER, F. G. Gattungsreihe Epidendra. In: BRIEGER, F. G.; MAATSCH, R. & SENGHAS, K. (eds). **Schlechter Die Orchideen**, 3rd edn. Paul Parey, Berlin, pp. 509-549, 1976-1977.

BURCHARDT, P.; SOUZA-CHIES, T. T.; CHAUVEAU, O.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BRISOLARA-CORRÊA, L.; INÁCIO, C. D.; EGGERS, L.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; CAMPOS, J. M. S.; KALTCHUK-SANTOS, E. Cytological and genome size data analyzed in a phylogenetic frame: evolutionary implications concerning *Sisyrinchium* taxa (Iridaceae: Iridoideae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. supl. 1, p. 288-307, 2018.

CARDOSO-GUSTAVSON, P.; SAKA, M. N.; PESSOA, E. M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Unidirectional transitions in nectar gain and loss suggest food deception is a stable evolutionary strategy in *Epidendrum* (Orchidaceae): insights from anatomical and molecular evidence. **BMC Plant Biology**, v. 18, p. 179-191, 2018.

CARNEVALI, G.; ROMERO, G. A. Orchidaceae Dunstervillorum VII: the *Epidendrum nocturnum* alliance in the Venezuelan Guayana and the Guianas. **Lindleyana**, v. 11, p. 239-249, 1996.

CHIARINI, F.E.; SANTIÑAQUE, F.F.; URDAMPILLETA, J.D. & LAS PEÑAS, M.L. Genome size and karyotype diversity in *Solanum* sect. *Acanthophora* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 113-125, 2013.

CHUNG, K.; HIPPEL, A. L.; ROALSON, E. H. Chromosome number evolves independently of genome size in a clade with nonlocalized centromeres (*Carex*: Cyperaceae). **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2708-2772, 2012.

CIRES, E.; CUESTA, C.; PEREDO, E. L.; REVILLA, M. A.; PRIETO, J. A. F. Genome size variation and morphological differentiation within *Ranunculus parnassifolius* group (Ranunculaceae) from calcareous screes in the Northwest of Spain. **Plant Systematic and Evolution**, v. 281, p. 193-208, 2009.

COGNIAUX, A. *Epidendrum*. In: MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G.; URBAN, I. (Eds.). **Flora Brasiliensis**. Oldenbourg (Munich), p. 30-186, 1898-1902.

CORDEIRO, J. M. P.; LIMA, S. A. A.; PAZ, S. N.; SANTOS, M. A. S. & FELIX, L. P. Karyotype evolution in the genus *Jacaranda* Juss. (Jacarandaeae, Bignoniaceae): chromosome numbers and heterocromatin. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, gmr15048973, 2016.

CORDEIRO, J. M. P.; KAEHLER, M.; SOUZA, G.; FELIX, L. F. Karyotype analysis in Bignoniaceae (Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2697-2706, 2017.

DEMATTEIS, M. Chromosome studies of some *Vernonia* species (Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, 1998.

DRESSLER, R. L. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. **Orquídea (Méx.)**, v. 9, p. 277-290, 1984.

ESCUADERO, M.; MARTÍN-BRAVO, S.; MAYROSE, I.; FERNÁNDEZ-MAZUECOS, M.; FIZ-PALACIOS, O.; HIPPEL, A. L.; PIMENTEL, M.; JIMÉNEZ-MEJÍAS, P.; VALCÁRCEL, V.; VARGAS, P.; LUCEÑO, M. Karyotypic changes through dysploidy persist longer over evolutionary time than polyploidy changes. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2014.

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

FERNÁNDEZ-CONCHA, G. C.; RAMÍREZ-MORILLO, I. M. Nomenclatural Novelties in the Orchidaceae from Venezuela and Guyana. **Novon**, v. 13, p. 405-418, 2003.

FRAGA, C. N.; FONTANA, A. P.; KOLLMANN, L. J. C. A new species of *Epidendrum* (Orchidaceae) from the Brazilian Atlantic forest of Espírito Santo. **Plant Ecology and Evolution**, v. 148, n. 1, p. 128-133, 2015.

FREUDENSTEIN, J. V.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, v. 115, p. 665-681, 2015.

GALBANY-CASALS, M.; SUSANNA, A.; BRIONES, J. M. Low base numbers and dysploidy in annual *Helichrysum* Mill. (Asteraceae: Gnaphalieae). **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica**, v. 51/2, p. 107-114, 2009.

GOLDBLATT, P. (ed.). **Index to plant chromosome numbers 1982–1983**. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, 1985.

GOLDBLATT, P. (ed.). **Index to plant chromosome numbers 1984–1985**. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, 1988.

GOLDBLATT, P.; JOHNSON, D. E. (eds.). **Index to plant chromosome numbers 1990–1991**. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, 1994.

GOMES, S. S. L.; VIDAL, J. D.; NEVES, C. S.; ZORZATTO, C.; CAMPACCI, T. V. S.; LIMA, A. K.; KOEHLER, S.; VICCINI, L. F. Genome size and climate segregation suggest distinct colonization histories of an orchid species from Neotropical high-elevation rocky complexes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 3, p. 456-465, 2018.

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

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

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems**, v. 146, n. 3, p. 703-710, 2012.

HÁGSATER, E. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: TAN, K. W. (ed.). **Proceedings of the eleventh World Orchid Conference**. Miami, 1985, pp. 195-201.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 10. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 14**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2013, 209p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2015, 148p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(2)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2016, 72p.

HÁGSATER, E.; SANTIAGO, E. The genus *Epidendrum*, Part 12. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 16(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2018a, 144p.

HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A. *Epidendrum*. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASSMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum: 4. Epidendroideae (part one)**. Oxford University Press, Oxford, 2005a, pp. 236-251.

HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A. **Presentation, 18th World Orchid Conference**, Dijon, France, 2005b.

HENNIG, W. Heterochromatin. **Chromosoma**, v. 108, p. 1-9, 1999.

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, n. 2, p. 189-194, 1998.

KNIGHT, C. A.; ACKERLY, D. D. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. **Ecology Letters**, v. 5, p. 66-77, 2002.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 38, p. 847-876, 2007.

KUDO, N.; KIMURA, Y. Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some *Brassica* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 104-110, 2001.

- 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, n. 3, p. 469-481, 2009.
- LIM, W. L.; LOH, C. S. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). **New Phytologist**, v. 159, p. 279-287, 2003.
- LINDLEY, J. *Epidendrum*. In: LINDLEY, J. (ed.) **Folia Orchidacea**. J Matthews (London), p. 1-97, 1852-1859.
- MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. **Heredity**, v. 110, n. 2, p. 99, 2013.
- MARINHO, A. C. T. A.; VASCONCELOS, S.; VASCONCELOS, E. V.; MARQUES, D. A.; BENKO-ISEPPON, A. M. & BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Karyotype and genome size comparative analyses among six species of the oilseed-bearing genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, p. 442-449, 2018.
- 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, n. 1, p. 20-34, 2014.
- MAYROSE, I.; BARKER, M. S.; OTTO, S. Probabilistic Models of Chromosome Number Evolution and the Inference of Polyploidy. **Systematic Biology**, v. 59, n. 2, p. 132-144, 2010.
- MEDEIROS-NETO, E.; NOLLET, F.; MORAES, A. P.; FELIX, L. P. Intrachromosomal karyotype asymmetry in Orchidaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 610-619, 2017.
- MENDES, M. G.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, P. E.; BONETTI, A. M.; SAMPAIO, D. S. Sexual, apomictic and mixed populations in *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) polyploid complex. **Plant Systematics and Evolution**, v. 304, p. 817-829, 2018.
- MORAES, A. P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* × *E.*

puniceoluteum hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). **Ecology and evolution**, v. 3, n. 11, p. 3824-3837, 2013.

MORAES, A. P.; KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; GOMES, S. S. L.; VICCINI, L. F.; BARROS, F.; FELIX, L. P.; GUERRA, M.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. **Plant Biology**, v. 19, n. 2, p. 298-308, 2017.

NASCIMENTO, S.; COELHO, M. A. N.; CORDEIRO, J. M. P.; FELIX, L. P. Chromosomal variability in Brazilian species of *Anthurium* Schott (Araceae): heterochromatin, polyploidy, and B chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, no prelo.

NÓBREGA, S. R.; COELHO, A. L. F.; VEROLA, C. F.; COSTA, I. R.; VILAÇA, R.; LUZ, F. J. F.; ARAÚJO, W. F. Chromosome variations and diversity of *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) on the Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017. DOI: 10.4238/gmr16039754

OLIVEIRA, I. G.; MORAES, A. P.; ALMEIDA, E. M.; ASSIS, F. N. M.; CABRAL, J.; BARROS, F.; FELIX, L. P. Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 102-120, 2015.

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

PESSOA, E.; ALVES, M.; ALVES-ARAÚJO, A.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). **Táxon**, v. 61, n. 4, p. 721-734, 2012.

PESSOA, E.; FELIX, L. P.; ALVES, M. A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. **Brittonia**, v. 66, n. 4, p. 347-352, 2014.

PESSOA, E.; MIRANDA, M. R.; ALVES, M. A new whitish flowered *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of southeastern Brazil. **Brittonia**, 2015. DOI 10.1007/s12228-015-9404-2

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. **Taxon**, v. 62, p. 77-88, 2013.

PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, p. 165-177, 2009.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; DRAPER, D.; BARROS, F.; FELIX, L. P., FAY M. F.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 49, 2014.

SALDAÑA, L. M. S.; HÁGSATER, E. Taxonomic study of *Epidendrum difforme* group (Orchidaceae). In: PEREIRA, C. E. B. (ed.) **Proceedings of the 15th World Orchid Conference**. Naturalia Publications, Rio de Janeiro, 1996, p. 235-244.

SILJAK-YAKOVLEV, S.; GODELLE, B.; ZOLDOS, V.; VALLÈS, J.; GARNATJE, T.; HIDALGO, O. Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: a case study in *Reichardia* genus. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. e0182318, 2017.

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

SOUZA, G.; COSTA, L.; GUIGNARD, M. S.; VAN-LUME, B.; PELICCER, J.; GAGNON, E.; LEITCH, I. J.; LEWIS, G. P. Do tropical plants have smaller genomes? Correlation between genome size and climatic variables in the Caesalpinia Group (Caesalpinioideae, Leguminosae). **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 38, p. 13-23, 2019.

SOUZA, B. C. Q. **Diversidade da heterocromatina na subtribo Laeliinae (Epidendroideae: Orchidaceae), com ênfase no gênero *Cattleya* Lindl.** Tese. Doutorado em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil, 2015.

STANCIK, J. F.; GOLDENBERG, R.; BARROS, F. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 3, p. 864-880, 2009.

ŠTUBŇOVÁ, E.; HODÁLOVÁ, I.; KUČERA, J.; MÁRTONFIOVÁ, L.; SVITOK, M.; SLOVÁK, M. Karyological patterns in the European endemic genus *Soldanella* L.: absolute genome size variation uncorrelated with cytotype chromosome numbers. **American Journal of Botany**, v. 104, n.8, p. 1241-1253, 2017.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. (ed.) **Orchid biology: reviews and perspectives III**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1984, pp. 324-410.

TRÁVNÍČEK, P.; PONERT, J.; URFUS, T.; JERSÁKOVÁ, J.; VRÁNA, J.; HŘIBOVÁ, 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**, v. 87, n. 10, p. 958-966, 2015.

van den BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417-430, 2009.

VRÁNA, J.; CÁPAL, P.; BEDNÁŘOVÁ, M.; DOLEŽEL, J. Flow cytometry in plant research: a success story. In: NICK, P.; OPATRNÝ, Z. (eds.). **Applied Plant Cell Biology**. Plant Cell Monographs 22, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2014. pp. 395-430.

YANG, M.; LOH, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BMC Cell Biology**, v. 5, p. 33-40, 2004.

Capítulo I

Poliploidia, heterocromatina e tamanho do genoma em espécies de *Epidendrum* L. “grupo Nocturnum” (Laeliinae, Orchidaceae)

Poliploidia, heterocromatina e tamanho do genoma em espécies de *Epidendrum* L. “grupo Nocturnum” (Laeliinae, Orchidaceae)

Joel M. P. Cordeiro¹, Eric Hágsater², Lucas Costa³, Gustavo Souza³, Leonardo P. Felix¹

Resumo

Em *Epidendrum*, o grupo infragenérico “Nocturnum” envolve cerca de 50 espécies distribuídas pelos Neotrópicos. Suas espécies são caracterizadas pelos ramos caniculados, flores produzidas em sucessão de racemos, sem espata, flores em forma de estrela, de cores brancas e fragrantas à noite. O grupo apresenta-se morfológicamente complexo e análises citogenéticas e de conteúdo de DNA nuclear podem contribuir para a organização taxonômica de suas espécies. Este trabalho tem como objetivo analisar o cariótipo (número cromossômico e bandas heterocromáticas) e o tamanho do genoma (2C-value) em espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum”. Foram analisadas seis espécies e 15 indivíduos do grupo Nocturnum + *E. ciliare* L. O cariótipo das espécies *E. ciliare* e *E. aff. nocturnum* Jacq. foram diplóides ($2n = 40$), *E. bahiense* Rchb.f., *E. carpophorum* Barb. Rodr., *E. minus* (Cogn.) Hágsater e *E. nocturnum* foram tetraploides ($2n = 80$) e *E. tumuc-humaciense* (Veyret) Carnevali & G.A.Romero foi hexaploide ($2n = 120$). O padrão de heterocromatina foi marcado especialmente pela ocorrência de regiões ricas em pares de base GC (CMA⁺), localizadas nas regiões proximais da maioria dos cromossomos e entre 2-6 bandas terminais entre as espécies. O conteúdo de DNA nuclear foi, de forma geral, correlacionado ao nível de ploidia, onde uma espécie diploide apresentou $2C = 2,91 \mu\text{g}$, espécies tetraploides apresentaram $2C \sim 6,00 \mu\text{g}$ e uma espécie hexaploide apresentou $2C = 8,92 \mu\text{g}$. *Epidendrum ciliare*, considerado muitas vezes como correlacionado ao grupo Nocturnum, apresentou padrões de distribuição de heterocromatina (ausência de bandas CMA⁺ proximais) e conteúdo de DNA ($2C = 2x = 6,28 \mu\text{g}$) dessemelhantes as demais espécies analisadas, corroborando com o posicionamento da espécie em um grupo distinto dentro do gênero *Epidendrum*.

Palavras-chave: Citotaxonomia, CMA/DAPI, Complexo taxonômico, 2C DNA.

Introdução

Epidendrum nocturnum Jacq. tipo nomenclatural do gênero *Epidendrum* (DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985) foi por muito tempo considerada uma espécie altamente polimórfica e de ampla distribuição geográfica (BRIEGER & BICALHO, 1977; VEYRET, 1982). Entretanto, estudos taxonômicos demonstram que um número considerável de espécies podiam ser separadas e reconhecidas, compondo um grupo infragenérico no gênero *Epidendrum* denominado “aliança *Epidendrum nocturnum*” ou

¹ Universidade Federal da Paraíba, Brasil

² Herbarium AMO, México

³ Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

“grupo Nocturnum” (CARNEVALI & ROMERO, 1996; HÁGSATER & SOTO, 2003; KOLANOWSKA & MYSTKOWSKA, 2014; HÁGSATER & SALDAÑA, 2015).

As espécies do grupo Nocturnum são caracterizadas pelos ramos caniculados, flores sucessivas de racemos curtos, sem espata, flores em forma de estrela, com pétalas e sépalas longas e estreitas, de cores brancas e fragrantas à noite (HÁGSATER, 1985; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a,b). As espécies do grupo são distribuídas em florestas tropicais desde o sul da Flórida, toda a América Central e América do Sul, com ocorrência parapátrica ou simpátrica em microhabitats distintos (CARNEVALI & ROMERO, 1996). Inicialmente, o número de representantes para a aliança *Epidendrum nocturnum* era estimado em cerca de 35 espécies (HÁGSATER, 1985). Entretanto, diversos novos táxons no grupo têm sido recentemente descritos (HÁGSATER & SALDAÑA, 2010, 2015; KOLANOWSKA & MYSTKOWSKA, 2014; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a,b), contabilizando aproximadamente 50 espécies. Para o Brasil, estima-se que ocorram entre 9 e 11 espécies, distribuídas especialmente pela Mata Atlântica e Floresta Amazônica (BFG, 2015).

Na citogenética, *E. nocturnum* apresenta registros cromossômicos de $2n = 40$ e $2n = 80$ (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). *Epidendrum ciliare* L., mencionado por diferentes autores como possuindo afinidades à aliança *Epidendrum nocturnum* (DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985), apresenta registros de $2n = 40$, 80 e 160 (TANAKA & KAMEMOTO, 1984) e forma híbridos naturais com *E. nocturnum*, como por exemplo, *Epidendrum* × *dorotheae* P.H.Allen (HÁGSATER & SALDAÑA, 2008). A poliploidia em espécies da aliança *Epidendrum nocturnum* pode ser decorrente de antigas combinações do genoma (ASSIS et al., 2013) e provavelmente está correlacionada com eventos de autopolinização, cleistogamia e poliembrionia, comumente registrados para o grupo (BRIEGER & BICALHO, 1977; STORT & PAVANELLI, 1985, 1986).

A interpretação e/ou diferenciação dos cariótipos em grupos taxonômicos pode ser melhor discutida com o uso de marcadores específicos de regiões heterocromáticas (ver, por exemplo, BARROS E SILVA et al., 2010; MELO et al., 2014; CORDEIRO et al., 2017). Os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA) e 4´6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) aparecem entre os mais empregados (GUERRA, 2000), marcando regiões do genoma ricas em pares de base Guanina-Citosina (GC) e Adenina-Timina (AT), respectivamente (GUERRA, 2000; BARROS E SILVA et al., 2010). No gênero *Epidendrum*, estudos empregando a dupla coloração CMA/DAPI permitiu, entre outras

análises, a diferenciação de cariótipos em diferentes grupos (ASSIS, 2013), a investigação de híbridos naturais (ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013) e a descrição de novas espécies (PESSOA et al., 2014), constituindo, assim, uma importante ferramenta para discutir a citogenética e taxonomia no gênero.

Além das análises do cariótipo, a variação no tamanho do genoma (2C DNA) permite a discussão de hipóteses envolvendo grupos taxonomicamente complexos quanto à delimitação de espécies e identificação de híbridos naturais (KRON et al., 2007; TRÁVNÍČEK et al., 2012; BURCHARDT et al., 2018). Todavia, para espécies de *Epidendrum*, estudos que envolvam tamanho do genoma são escassos (ASSIS, 2013; MARQUES et al., 2014). Para o grupo Nocturnum, o tamanho do genoma pode auxiliar na delimitação de espécies, além de contribuir para a interpretação de diferentes níveis de ploidia e variações intraespecíficas, conforme vem sendo discutido em outros grupos de plantas, como *Gymnadenia* R.Br. (Orchidaceae; TRÁVNÍČEK et al., 2012), Maxillariinae (Orchidaceae; MORAES et al., 2017), e *Sisyrinchium* L. (Iridaceae; BURCHARDT et al., 2018).

O presente trabalho tem como objetivo analisar o cariótipo (número cromossômico e bandas heterocromáticas) e o tamanho do genoma (2C DNA) em espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum” (Laeliinae, Orchidaceae) buscando auxiliar a delimitação taxonômica do grupo, assim como entender a evolução cromossômica e determinados aspectos ecológicos próprios de cada espécie.

Material e Métodos

Material vegetal

A análise cariotípica e o tamanho do genoma em espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum” envolveu sete espécies (incluindo *Epidendrum ciliare*) (Figura 1). Nome dos táxons, vouchers e locais de coleta são apresentados na Tabela 1. As espécies foram coletadas em campo e cultivadas no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFPB. Exsicatas de todas as espécies analisadas foram depositadas no herbário EAN. A identificação das espécies foi estabelecida conforme Carnevali e Romero (1996), Hágsater e Saldaña (2015), e Hágsater e Santiago (2018a,b).

Análise citogenética

Pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2 mM a 10°C por 24 horas, fixadas em etanol absoluto/ácido acético glacial (3:1, v/v) por 2 horas e estocadas em freezer a -20°C. Para o preparo das lâminas as raízes foram digeridas em solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) (w/v) a 37°C por 60 minutos. O material foi esmagado em ácido acético 60% e congelado em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. Para a seleção das melhores lâminas, estas foram coradas com uma solução DAPI (2 µg/mL):glicerol (1:1, v/v) e analisadas ao microscópio de fluorescência. Subsequentemente, as lâminas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 minutos e mantidas em etanol absoluto à temperatura ambiente por duas horas (GUERRA & SOUZA, 2002).

Para a coloração com os fluorocromos CMA/DAPI as lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e posteriormente coradas por uma hora com 10 µL de CMA (0,1 mg/ml) e depois com 10 µL de DAPI (1 µg/ml) por meia hora, montadas em glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v) e estocadas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos (GUERRA & SOUZA, 2002).

As metáfases foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision® v.4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). As imagens foram editadas (sobreposição e otimização de brilho e contraste) com o uso do software Adobe Photoshop CS3 Extended Version 10.0. As medições cromossômicas foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ 1.51k (SCHNEIDER et al., 2012) e a morfologia cromossômica estabelecida conforme Guerra (1986).

Tamanho do genoma

O conteúdo de DNA nuclear das espécies do grupo Nocturnum foi determinado por citometria de fluxo conforme protocolo adaptado de Doležel et al. (2007). Folhas frescas de diferentes indivíduos de cada espécie foram coletadas para a preparação das amostras. Foram analisados indivíduos de 1-3 populações, com três repetições para cada indivíduo amostrado. Como padrão interno foram usados *Zea mays* L. 'CE-777' (2C = 5,43 µg) e *Glycine max* Merr. 'Polanka' (2C = 2,50 µg) (DOLEŽEL et al., 1998).

Aproximadamente 25-50 mg de tecido foliar de cada amostra + tecido foliar padrão foi macerado com uma lâmina de aço em uma placa de Petri contendo 1 ml de tampão de isolamento WPB (LOUREIRO et al., 2007). A solução foi completamente filtrada com um filtro de malha de 30 µm e misturada com 20 µl de iodeto de propídeo (1 mg/ml). A quantificação do DNA por citometria de fluxo foi realizada usando PARTEC Cyflow Space (Müster, Germany) equipado com laser canon 488-nm. O histograma de fluorescência relativa foi analisado usando o software FloMax 2.3 e os picos com um coeficiente de variação (C.V.) maior que 5% foram descartados. O conteúdo de DNA (µg) das amostras foi calculado usando a equação “DNA da amostra (µg) = (G1 da amostra / G1 padrão) × DNA padrão (µg)”, onde: G1 da amostra corresponde à posição do pico G1 da amostra; G1 padrão corresponde à posição do pico G1 do padrão; e DNA padrão corresponde à quantidade de DNA nuclear (µg) previamente conhecida do padrão usado em cada medição.

Os resultados do tamanho do genoma para cada grupo de espécie amostrada foi comparado estatisticamente usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Para tanto, foi utilizado o programa SISVAR[®] versão 5.6 (FERREIRA, 2000).

Resultados

Análise cariotípica

O número cromossômico observado para as espécies de *Epidendrum* grupo Nocturnum foi de $2n = 40$ em *E. aff. nocturnum* e *E. ciliare*, $2n = 80$ em *E. bahiense*, *E. carpophorum*, *E. minus* e *E. nocturnum*, e $2n = 120$ em *E. tumuc-humaciense*. A morfologia dos cromossomos foram principalmente metacêntricos e submetacêntricos, e cariótipos relativamente simétricos. O tamanho médio dos cromossomos variou de 1,56 µm em *E. minus* a 2,52 µm em *E. aff. nocturnum*. Novos registros cromossômicos foram descritos para as espécies *E. bahiense*, *E. carpophorum*, *E. minus* ($2n = 80$) e *E. tumuc-humaciense* ($2n = 120$) (Tabela 1).

Em relação ao padrão de bandas heterocromáticas, a maioria das espécies apresentou cariótipo formado por bandas ricas em pares de base GC (CMA⁺) localizadas nas regiões proximais (Figura 2). Além disso, um número variável de cromossomos com bandas CMA⁺ terminais correspondentes as RONS foi observado: duas bandas em *E. bahiensis* (Figura 2A), *E. minus* (Figuras 2D) e *E. aff. nocturnum*

(Figura 2F), quatro bandas em *E. carpophorum* (Figura 2B) e *E. nocturnum* (Figuras 2E) e seis bandas em *E. tumuc-humaciense* (Figura 2G). *Epidendrum ciliare*, por sua vez, apresentou apenas duas bandas CMA⁺ terminais, sem bandas CMA proximais claramente visualizadas (Figura 2C).

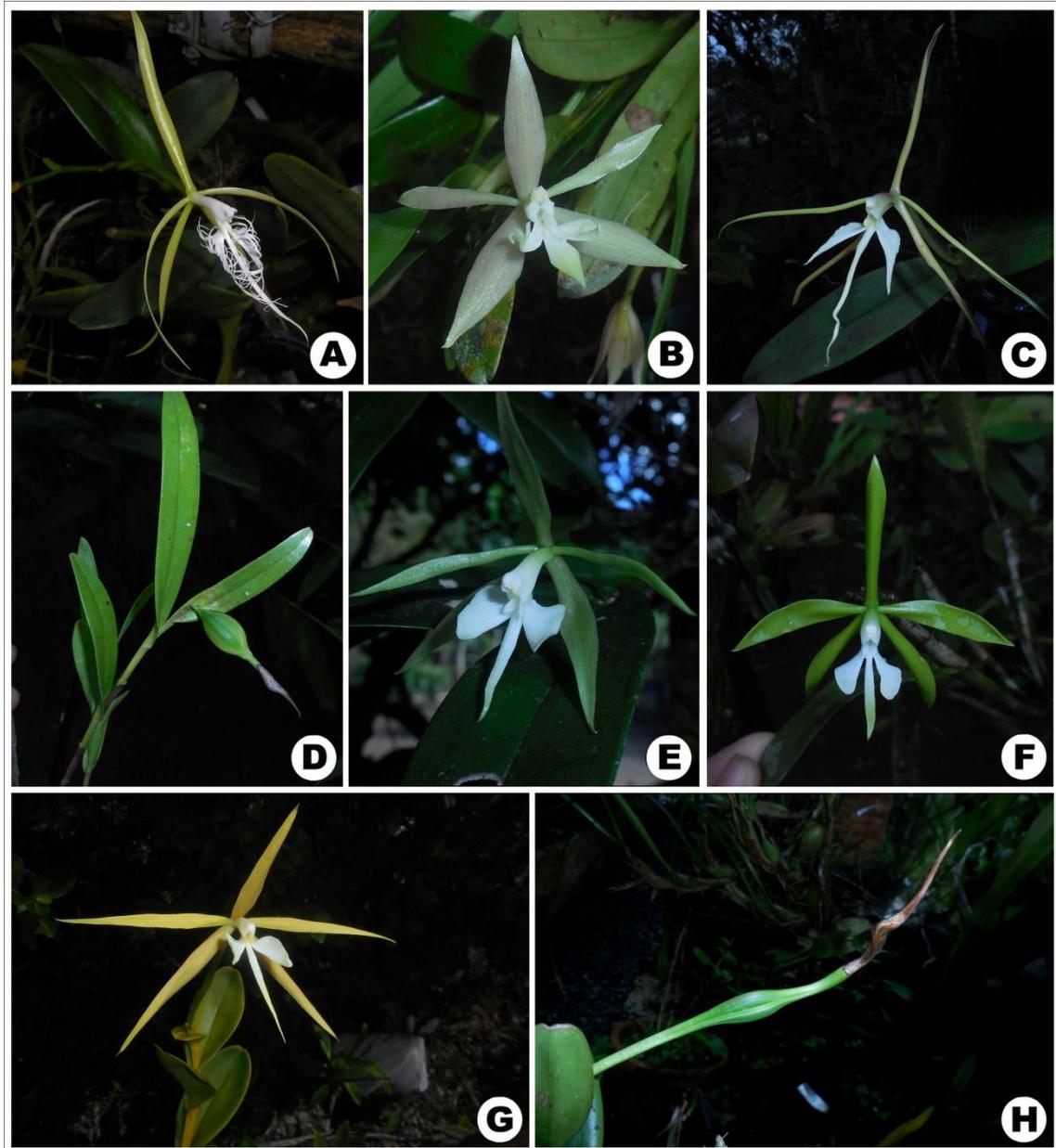


Figura 1. Espécies da aliança *Epidendrum nocturnum* analisadas. A. *Epidendrum ciliare*, B. *E. bahiense*, C. *E. carpophorum*, D. *E. minus* (fruto), E. *E. nocturnum*, F. *E. aff. nocturnum*, G-H. *E. tumuc-humaciense*, G. flor, H. fruto imaturo. Em D e H observa-se a formação de frutos por cleistogamia.

Tabela 1. Lista de espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum” analisadas, incluindo *E. ciliare*, e seus respectivos vouchers, local de coleta, número cromossômico, bandas heterocromáticas e tamanho do genoma (2C DNA). Legenda: Vouchers - JMPC (Joel Maciel Pereira Cordeiro), EMA (Erton Mendonça de Almeida), LPF (Leonardo Pessoa Felix); Local de coleta - Estados brasileiros: AM (Amazonas), CE (Ceará), BA (Bahia), MT (Mato Grosso), PB (Paraíba), PE (Pernambuco), RO (Rondônia), RR (Roraima); Bandas heterocromáticas - Pr (Proximais), Ter (Terminais). DP - Desvio Padrão.

Espécie	Voucher	Procedência	2n	Tamanho cromossômico	Bandas Heterocromáticas	2C DNA (µg)*** e DP
<i>Epidendrum bahiense</i> Rchb.f.*	JMPC - 1125	Manaus, AM**	80	Min. 1,79 µm Máx. 2,89 µm Méd. 2,15 µm	2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter ca. 78 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	5,89 ^b ± 0,22
<i>E. carpophorum</i> Barb. Rodr.*	JMPC - 1118 EMA - 1439 EMA - 1453 LPF - 15713	Manaus, AM** Una, BA** Una, BA Bonito, PE**	80	Min. 1,97 µm Máx. 2,93 µm Méd. 2,30 µm	4 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter ca. 76 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	6,08 ^b ± 0,12
<i>E. ciliare</i> L.	JMPC - 447	Prainha, CE**	40	Min. 1,43 µm Máx. 2,47 µm Méd. 1,84 µm	2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter	6,28 ^{b,c} ± 0,15
<i>E. minus</i> (Cogn.) Hágsater*	JMPC - 1123	Manaus, AM**	80	Min. 1,40 µm Máx. 1,72 µm Méd. 1,56 µm	2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter ca. 78 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	6,67 ^c ± 0,18
<i>E. nocturnum</i> Jacq.	JMPC - 1330	Areia, PB**	80	Min. 1,34 µm	4 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter	6,05 ^b ± 0,11

	LPF - 15122	Pico Alto, CE		Máx. 3,03 μm	ca. 76 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	
	LPF - 15603	Serra da Jiboia, BA**		Méd. 2,06 μm		
	LPF - 15604	Serra da Jiboia, BA				
	LPF - 15605	Serra da Jiboia, BA**				
<i>E. aff. nocturnum</i>	LPF - 16435	Comodoro, MT**	40	Mín. 1,72 μm	2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter	2,91 ^a \pm 0,15
	LPF - 16457	Santa Luzia, RO		Máx. 3,63 μm Méd. 2,52 μm	38 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	
<i>E. tumuc-humaciense</i> (Veyret) Carnevali & G.A.Romero*	LPF - 16247	Gran Sabana, Venezuela	120	Mín. 1,80 μm	6 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Ter	8,92 ^d \pm 0,16
	LPF - 16275	Tepequém, RR**		Máx. 2,78 μm Méd. 2,26 μm	ca. 114 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	

* Novos registros cromossômicos

** Indivíduos amostrados para a quantificação do DNA nuclear

*** Para o tamanho do genoma, médias seguidas da mesma letra sobrescrita não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

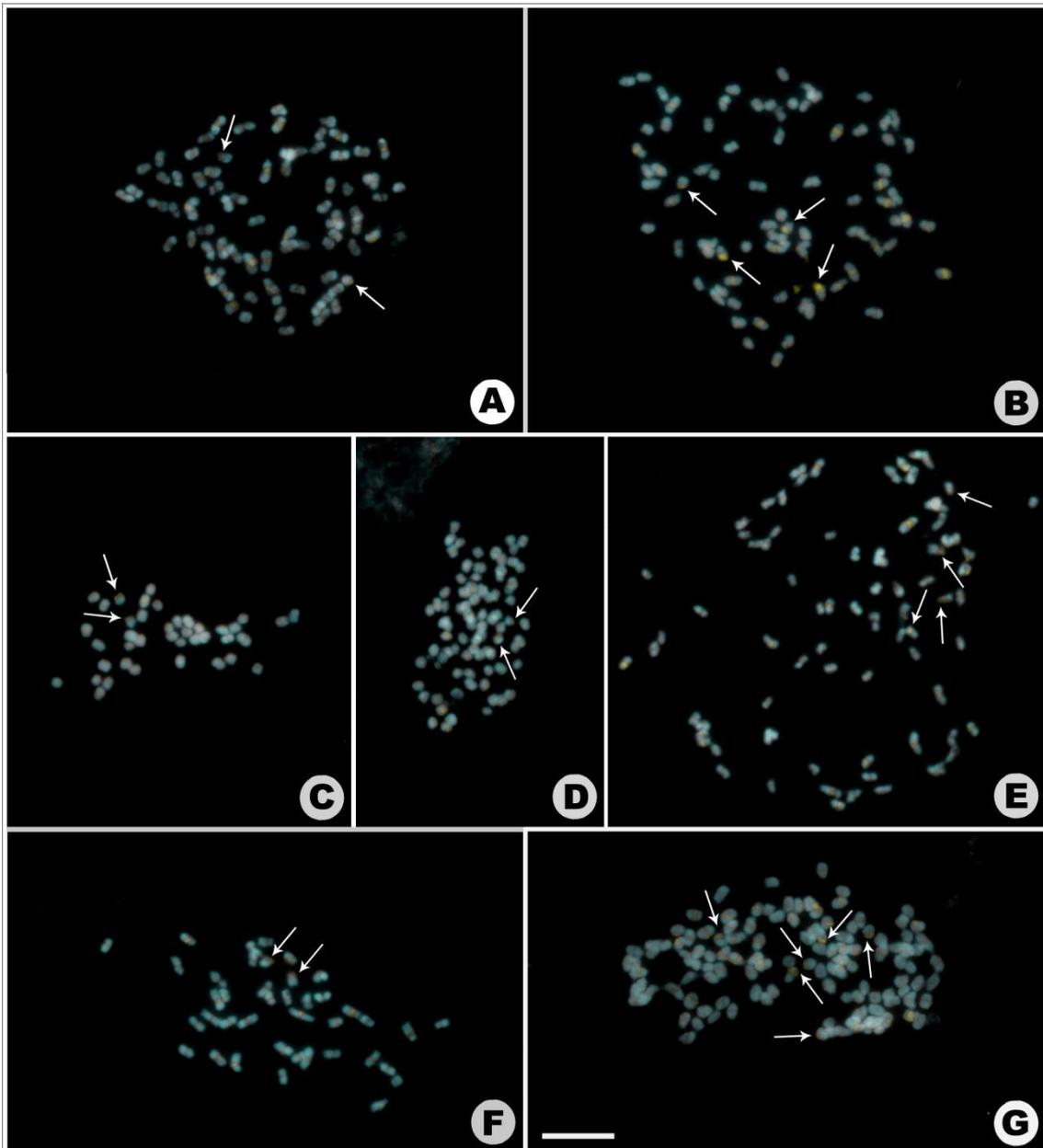


Figura 2. Metáfases mitóticas em espécies de *Epidendrum* “grupo Nocturnum”. A. *Epidendrum bahiense* ($2n = 80$), B. *E. carpophorum* ($2n = 80$), C. *E. ciliare* ($2n = 40$), D. *E. minus* ($2n = 80$), E. *E. nocturnum* ($2n = 80$), F. *E. aff. nocturnum* ($2n = 40$), G. *E. tumuc-humaciense* ($2n = 120$). Setas indicam bandas CMA⁺ terminais. Barra em G corresponde a 10 μm .

Tamanho do genoma

O conteúdo de DNA nuclear ($2C$) na aliança *Epidendrum nocturnum* variou significativamente entre as espécies analisadas ($F = 465,649$; $P < 0,0001$), com valores que vão de 2,91 μg em *E. aff. nocturnum* a 8,92 μg em *E. tumuc-humaciense* (Tabela 1), representando uma variação de 3,06 vezes no tamanho do genoma entre as espécies.

Esta variação foi distribuída em quatro grupos, três dos quais correlacionados com o nível de ploidia das espécies: *E. aff. nocturnum* ($2n = 40$) apresentou o menor tamanho do genoma ($2C = 2x = 2,91 \text{ pg}$); *E. bahiense*, *E. carpophorum* e *E. nocturnum*, assim como *E. minus*, com $2n = 80$, obtiveram tamanho do genoma próximos ($2C = 4x \sim 6,00 \text{ pg}$); e *E. tumuc-humaciense* ($2n = 120$) foi a espécie com o maior tamanho do genoma ($2C = 6x = 8,92 \text{ pg}$) (Figura 3). Por outro lado, *E. ciliare*, com $2n = 40$, apresentou um padrão dessemelhante, especialmente por ser uma espécie diploide com conteúdo de DNA próximo as espécies tetraploides do grupo ($2C = 2x = 6,28 \text{ pg}$).

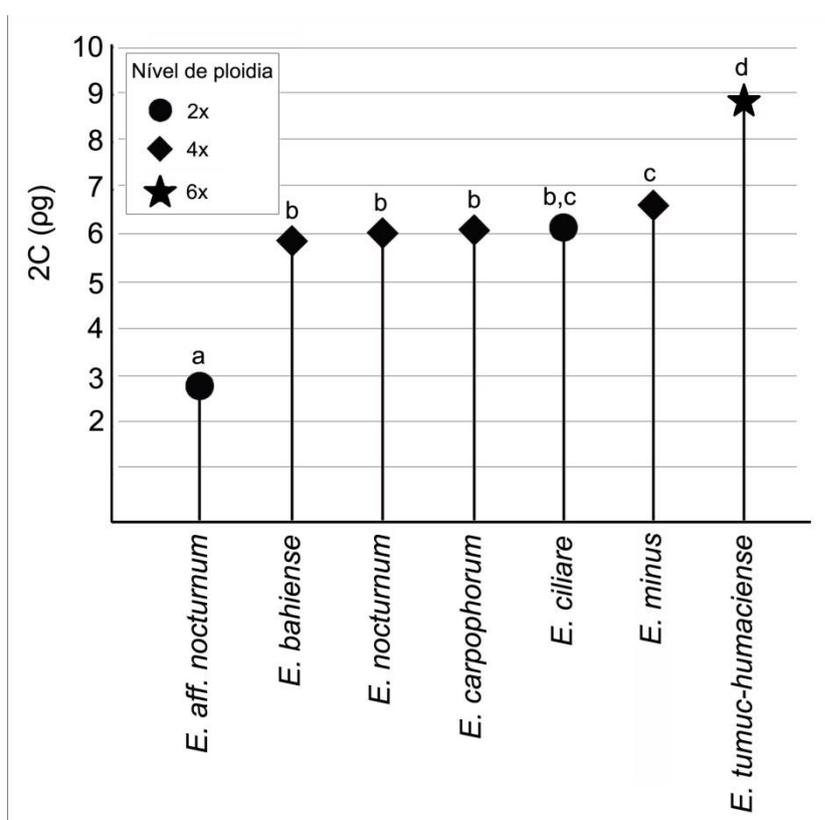


Figura 3. Distribuição do conteúdo de DNA ($2C$) entre as espécies de *Epidendrum* grupo Nocturnum e seus respectivos níveis de ploidia. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Discussão

Número cromossômico e poliploidia

Entre as sete espécies analisadas, duas delas foram diploides (*E. ciliare* e *E. aff. nocturnum*; $2n = 40$), quatro foram tetraploides (*E. bahiense*, *E. carpophorum*, *E. minus* e *E. nocturnum*; $2n = 80$) e uma espécie foi hexaploide (*E. tumuc-humaciense*; $2n =$

120). Diferente de outros grupos de *Epidendrum* onde ocorre o predomínio de $2n = 40$ (FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013; ver, além disso, Capítulo 3), a aliança *Epidendrum nocturnum* é marcada pela ocorrência de poliploidia na maioria das espécies até então analisadas. A poliploidia é um dos principais fenômenos cariológicos ocorrentes entre os diversos grupos vegetais, com importante função na evolução das plantas (JIAO et al., 2011; WENDEL, 2015; SOLTIS et al., 2015). Indivíduos poliploides comumente diferem morfológicamente em relação aos progenitores diploides, ocupam distintos nichos ecológicos e podem apresentar isolamento reprodutivo (COMAI, 2005; MADLUNG, 2013; RAMSEY & RAMSEY, 2014), o que, por vezes, repercute em adaptações e origens de novos táxons (RIESEBERG & WILLIS, 2007; SOLTIS et al., 2016; CORDEIRO et al., 2018).

Para o grupo Nocturnum verifica-se que os registros de poliploidia parecem estar relacionados a eventos de especiação e diversificação. *Epidendrum tumuc-humaciense* com $2n = 120$, por exemplo, uma robusta planta terrestre com até 2 m de altura, cresce em ambientes ensolarados sobre matéria orgânica acumulada em afloramentos de arenito, enquanto as demais espécies com $2n = 40$ e 80 são plantas epífitas de até 30 cm de altura, que ocorrem em florestas úmidas (CARNEVALI & ROMERO, 1996). A única espécie diploide estudada, *Epidendrum* aff. *nocturnum* ($2n = 40$), foi exclusiva do contato entre vegetação de Cerrado e Floresta Amazônica, enquanto os indivíduos de *E. nocturnum* com $2n = 80$ foram oriundos de regiões de florestas úmidas do Nordeste do Brasil. Diferenças no número cromossômico em espécies do complexo *E. nocturnum* podem estar relacionadas a eventos de poliploidia intraespecífica, conforme se observa em registros prévios de $2n = 40$ e 80 (TANAKA & KAMEMOTO, 1984). Entretanto, análises morfológicas preliminares demonstram que *Epidendrum* aff. *nocturnum* pode tratar-se de um novo táxon (Eric Hágsater, comunicação pessoal), e a diferença no nível de ploidia entre as espécies pode ser considerada um carácter diagnóstico auxiliar para sua segregação como espécie distinta.

Além da especiação, a poliploidia pode apresentar correlações diretas com o sistema reprodutivo das espécies da aliança *Epidendrum nocturnum*. Estudos envolvendo sistema reprodutivo neste grupo (BRIEGER & BICALHO, 1977; VEYRET, 1982; STORT & PAVANELLI, 1986) revelam a ocorrência de cleistogamia, onde ocorre a formação de frutos antes da antese floral (ver Figura 1D e H), o que pode estar associado à apomixia e poliembrionia em *E. nocturnum* (STORT & PAVANELLI, 1985, 1986). Em alguns grupos de plantas a poliploidia tem sido frequentemente

associada à apomixia e poliembrionia, como em *Anemopaegma* Mart. ex Meisn. e *Handroanthus* Mattos entre as Bignoniaceae (FIRETTI-LEGGIERI et al., 2013; MENDES et al., 2018) e no gênero *Amelanchier* Medik. da família Rosaceae (BURGESS et al., 2014). Esses mecanismos podem proporcionar determinadas vantagens a estas espécies, especialmente para a propagação de plantas com problemas de reprodução sexual, como híbridos e poliploides (COMAI, 2005; HOJSGAARD & HÖRANDL, 2019).

Apesar da existência de supostos híbridos naturais entre espécies da aliança *E. nocturnum*, como *Epidendrum* × *dorotheae*, um suposto híbrido entre *E. nocturnum* e *E. ciliare* (HÁGSATER & SALDAÑA, 2008), a ocorrência de poliploidia no grupo parece estar relacionada a eventos de autopoliploidia. A maioria das espécies da aliança *E. nocturnum* ocorre de forma parapátrica ou simpátrica, mas, neste último caso, geralmente ocupam micro-habitats distintos, sem evidências de integração (CARNEVALI & ROMERO, 1996). A investigação de indivíduos provenientes de diferentes populações (por exemplo, *E. carpophorum*, Tabela 1) ou de uma mesma população (por exemplo, *E. nocturnum*, Tabela 1) não revelou variações intraespecíficas no nível de ploidia, reforçando eventos de autopoliploidia nestes indivíduos. Além disso, no gênero *Epidendrum*, a comparação de cariótipos de híbridos interespecíficos revela a ocorrência de dois conjuntos cromossômicos morfologicamente distintos, conforme verificado em híbridos naturais envolvendo *E. fulgens* Brongn. e *E. puniceoluteum* F.Pinheiro & F.Barros (MORAES et al., 2013). Entretanto, em grupos como *Amphyglottis* as variações cromossômicas numéricas podem ser decorrente de hibridizações antigas (ASSIS et al., 2013), o que não descarta uma origem aloploide ancestral que pode ter repercutido na diversificação do grupo *Nocturnum*.

Heterocromatina

O padrão de bandas heterocromáticas nas espécies do grupo *Nocturnum* foi marcado por um número variável de bandas terminais ricas em GC correspondentes as RONS, além de bandas CMA⁺ proximais na maioria dos cromossomos. Contudo, *E. ciliare* divergiu das demais espécies por não apresentar bandas CMA proximais. *Epidendrum ciliare* é considerado por alguns autores como correlacionado ao grupo *E. nocturnum* por compartilhar semelhanças na morfologia floral, o mesmo grupo de fragrâncias e os mesmos agentes polinizadores (mariposas da família Sphingidae)

(DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985), além de formar possíveis híbridos naturais com *E. nocturnum* (HÁGSATER & SALDAÑA, 2008). Por outro lado, as evidências cromossômicas observadas aqui não suportam uma afinidade estreita entre *E. ciliare* e o grupo *E. nocturnum*. O padrão de bandas CMA/DAPI observado para *E. ciliare* apresenta-se relativamente distinto das demais espécies da aliança *E. nocturnum*, especialmente pela ausência de bandas CMA proximais, corroborando com o posicionamento desta espécie em um grupo a parte. Além disso, estudos filogenéticos confirmam que ambas as espécies constituem linhagens monofiléticas distintas (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005a; CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018). A existência de híbridos interespecíficos envolvendo *E. ciliare* e *E. nocturnum* pode ser justificada pela ampla capacidade da família Orchidaceae em realizar hibridizações envolvendo espécies distantemente relacionadas, seja de um mesmo gênero ou de diferentes gêneros (ARDITTI, 1985). Também se explica pelo fato de todas as espécies de *Epidendrum* com flores em forma de estrela possuírem a mesma síndrome de polinização por mariposas Sphingidae, independente do posicionamento filogenético (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005b).

Excluindo *E. ciliare*, as demais espécies da aliança *Epidendrum nocturnum* apresentaram distribuição de bandas heterocromáticas similares. Grupos de plantas estáveis quanto ao padrão de distribuição de heterocromatina são conhecidos. Os gêneros *Lycium* L. (Solanaceae; STIEFKENS et al., 2010), *Pereskia* Mill., (Cactaceae; CASTRO et al., 2016) e *Ceiba* Mill. (Malvaceae; FIGUEREDO et al., 2016), por exemplo, possuem padrões de bandas notavelmente estáveis e característicos. As diferenças na distribuição e composição das regiões heterocromáticas no cariótipo de diferentes grupos de plantas geralmente são associadas a variações nos sítios de DNA ribossomal, DNAs satélites, elementos transponíveis ou arranjos repetidos em tandem (BARROS E SILVA et al., 2010; EVTUSHENKO et al., 2016). Para a aliança *E. nocturnum* a presença e localização de regiões heterocromáticas similares nos cariótipos das seis espécies analisadas pode estar relacionada a natureza estável na composição e distribuição destes elementos no genoma do grupo. Assim, confirma-se que o grupo infragênérico “Nocturnum” é morfologicamente e cariologicamente bem caracterizado dentro do gênero *Epidendrum*.

Conteúdo de DNA nuclear

Em nossa análise, excluindo *E. ciliare*, a variação do tamanho de genoma foi relativamente correlacionada ao nível de ploidia. Embora seja teoricamente esperado que genomas que sofreram duplicação tenham igualmente duplicado seu conteúdo de DNA, observa-se que mesmo espécies que passaram por vários ciclos de duplicação genômica apresentam quantidades de DNA nuclear incompatíveis com esses eventos de duplicação (LEITCH & BENNETT, 2004; SOLTIS et al., 2015). Tanto poliploides naturais como sintéticos podem experimentar rápida perda de DNA homeólogo e reestruturação do genoma após o evento de poliploidização (SOLTIS et al., 2015; SOLTIS et al., 2016). No grupo Nocturnum, entretanto, houve alterações pouco significativas na quantidade de DNA após os eventos de poliploidia que ocorreram nas seis espécies analisadas. Essa correlação positiva e estreita entre nível de ploidia e tamanho do genoma também tem sido observada em outros gêneros de Orchidaceae, como *Paphiopedilum* Pfitzer (LEITCH et al., 2009), *Bifrenaria* Lindl. (MORAES et al., 2017) e *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (BORY et al., 2008) e em espécies de *Epidendrum* do subgênero *Amphiglottium* (ASSIS, 2013).

Entre as espécies analisadas, *E. ciliare* apresentou dessemelhança no padrão de conteúdo de DNA por ser uma espécie diploide ($2n = 40$) com valores de $2C$ próximos as espécies tetraploides do grupo (6,28 μg). *Epidendrum ciliare* constitui uma espécie de maiores proporções de tamanho em relação às espécies do grupo Nocturnum, além de apresentar folhas largas e presença de pseudobulbo alongado (HÁGSATER & SALDAÑA, 2010). Em Orchidaceae, gêneros como *Bifrenaria* apresentam espécies de tamanhos maiores com respectivos maiores tamanhos do genoma, apesar de apresentarem o mesmo número cromossômico ($2n = 38$) (MORAES et al., 2017). Embora *E. ciliare* apresente determinadas relações com a aliança *E. nocturnum* (flores em forma de estrela, o mesmo grupo de fragrâncias, os mesmos agentes polinizadores) (DRESSLER, 1984; HÁGSATER, 1985), as informações obtidas pelos valores de conteúdo de DNA e distribuição de heterocromatina suportariam a segregação e o posicionamento desta espécie em um grupo distinto, conforme proposto por autores como Pabst e Dungts (1975), Brieger (1977) e Hágsater e Saldaña (2010). Além disso, estes resultados demonstram que caracteres florais, síndromes de polinização e formação de híbridos intraespecíficos envolvem linhagens distintas em *Epidendrum*.

Variações interespecíficas

Embora por muito tempo se tenha considerado *Epidendrum nocturnum* como uma espécie altamente polimórfica e de ampla distribuição geográfica (BRIEGER & BICALHO, 1977; VEYRET, 1982), as informações cariológicas e de conteúdo de DNA confirmam que a mesma se trata de espécies distintas. Apesar de algumas espécies apresentarem semelhanças em relação ao número cromossômico, padrão de heterocromatina e conteúdo de DNA, a conciliação destas informações permite diferenciar a maioria das espécies do grupo Nocturnum analisadas.

Em relação ao número cromossômico, *E. tumuc-humaciense* difere das demais por apresentar hexaploidia ($2n = 120$) e *E. aff. nocturnum* por ser uma espécie diploide ($2n = 40$). Entre as espécies tetraploides ($2n = 80$), *E. bahiense* e *E. minus* apresentaram o mesmo padrão de heterocromatina (duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais e cerca de 78 CMA⁺/DAPI⁻ proximais), contudo apresentam conteúdo de DNA significativamente diferentes entre si (5,89 µg e 6,67 µg, respectivamente).

Apenas *E. nocturnum* e *E. carpophorum* apresentaram-se similares em todas as análises, ambas com número cromossômico $2n = 80$, quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais e cerca de 76 CMA⁺/DAPI⁻ proximais, e conteúdo de DNA sem diferenças significativas (6,08 µg e 6,05 µg, respectivamente). Apesar destas duas espécies serem morfologicamente distintas (CARNEVALI & ROMERO, 1996; HÁGSATER & SALDAÑA, 2010) o cariótipo e tamanho do genoma não apresentou diferenças notáveis entre elas.

Conclusão

A poliploidia aparece como importante fenômeno da evolução e especiação do grupo Nocturnum, tendo em vista que das sete espécies analisadas, quatro delas (*E. bahiense*, *E. carpophorum*, *E. minus* e *E. nocturnum*) foram tetraploides ($2n = 80$) e uma espécie (*E. tumuc-humaciense*) foi hexaploide ($2n = 120$).

A distribuição de heterocromatina é marcada especialmente pela ocorrência de regiões ricas em pares de base GC (CMA⁺) localizado preferencialmente na região proximal da maioria dos cromossomos, e na região terminal em número variável de 2-6 cromossomos. O conteúdo de DNA nuclear aparece correlacionado ao nível de ploidia,

onde uma espécie diploide apresentou $2C = 2,91 \mu\text{g}$, espécies tetraploides apresentaram $2C \sim 6,00 \mu\text{g}$ e uma espécie hexaploide apresentou $2C = 8,92 \mu\text{g}$.

Epidendrum ciliare apresentou padrões de distribuição de heterocromatina diferente das espécies do grupo Nocturnum analisadas (duas bandas CMA^+ terminais), além de ser diploide ($2n = 40$) com conteúdo de DNA próximo às espécies tetraploides do grupo Nocturnum ($2C = 6,28 \mu\text{g}$). A conciliação destas informações reforça o posicionamento de *E. ciliare* em um grupo infragênérico distinto e demonstra que caracteres florais, síndromes de polinização e formação de híbridos intraespecíficos envolvem linhagens distintas em *Epidendrum*.

Referências

ARDITTI, J. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 89, p. 359-381, 1985.

ASSIS, F. N. M. **Mecanismos de evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Tese. Doutorado em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil, 2013.

ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; BARROS E SILVA, A. E.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, n. 3, p. 329-344, 2013.

BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A.; SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosome Research**, v. 18, n. 4, p. 503-514, 2010.

BFG – The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BORY, S.; CATRICE, O.; BROWN, S.; LEITCH, I. J.; GIGANT, R.; CHIROLEU, F.; GRISONI, M.; DUVAI, M.; BESSE, P. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). **Genome**, v. 51, n. 10, p. 816-826, 2008.

BRIEGER, F. G. Gattungsreihe Epidendra. In: BRIEGER, F. G.; MAATSCH, R. & SENGHAS, K. (eds). **Schlechter Die Orchideen**, 3rd edn. Paul Parey, Berlin, pp. 509-549, 1977.

BRIEGER, F. G.; BICALHO, H. D. Observações taxonômicas no *Epidendrum nocturnum* Jacq. **Relatorio Cientifico**, v. 11, p. 23-28, 1977.

BURCHARDT, P.; SOUZA-CHIES, T. T.; CHAUVEAU, O.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BRISOLARA-CORRÊA, L.; INÁCIO, C. D.; EGGERS, L.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; CAMPOS, J. M. S.; KALTCHUK-SANTOS, E. Cytological and genome size data analyzed in a phylogenetic frame: evolutionary implications concerning *Sisyrinchium* taxa (Iridaceae: Iridoideae). **Genetics and Molecular Biology**, v, 41, n.1, p. 288-307, 2018.

BURGESS, M. B.; CUSHMAN, K. R.; DOUCETTE, E. T.; TALENT, N.; FRYE, C. T.; CAMPBELL, C. S. Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in *Amelanchier* (Rosaceae). **American Journal of Botany**, v. 101, p. 1375-1387, 2014.

CARDOSO-GUSTAVSON, P.; SAKA, M. N.; PESSOA, E. M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Unidirectional transitions in nectar gain and loss suggest food deception is a stable evolutionary strategy in *Epidendrum* (Orchidaceae): insights from anatomical and molecular evidence. **BMC Plant Biology**, v. 18, p. 179-191, 2018.

CARNEVALI, G.; ROMERO, G. A. Orchidaceae Dunstervillorum VII: the *Epidendrum nocturnum* alliance in the Venezuelan Guayana and the Guianas. **Lindleyana**, v. 11, p. 239-249, 1996.

CASTRO, J. P.; MEDEIROS-NETO, E.; SOUZA, G.; ALVES, L. I. F.; BATISTA, F. R. C.; FELIX, L. P. CMA band variability and physical mapping of 5S and 45S rDNA sites in Brazilian Cactaceae: Pereskioideae and Opuntioideae. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 613-620, 2016.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 836, 2005.

- CORDEIRO, J. M. P.; KAEHLER, M.; SOUZA, G.; FELIX, L. F. Karyotype analysis in Bignoniaceae (Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2697-2706, 2017.
- CORDEIRO, J. M. P.; NOLLET, F.; BURIL, M. T.; CHASE, M. W.; FELIX, L. P. A new species of *Gomesa* (Oncidiinae, Orchidaceae) from inselbergs in Brazilian caatinga: morphological and karyological evidence. **Phytotaxa**, v. 374, n. 2, p. 147-154, 2018.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82, n. supl. 1, p. 17-26, 1998.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.
- DRESSLER, R. L. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. **Orquídea (México City.)**, v. 9, p. 277-290, 1984.
- EVTUSHENKO, E. V.; LEVITSKY, V. G.; ELISAFENKO, E. A.; GUNBIN, K. V.; BELOUSOV, A. I.; ŠAFÁŘ, J.; DOLEŽEL, J.; VERSHININ, A. V. The expansion of heterochromatin blocks in rye reflects the co-amplification of tandem repeats and adjacent transposable elements. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 337, 2016.
- FELIX, L. P.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 163, p. 234-278, 2010.
- FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, Lavras, MG, 2000.
- FIGUEREDO, A.; OLIVEIRA, Á. W. L.; CARVALHO-SOBRINHO, J. G.; SOUZA, G. Karyotypic stability in the paleopolyploid genus *Ceiba* Mill. (Bombacoideae, Malvaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1087-1093, 2016.
- FIRETTI-LEGGIERI, F.; LOHMANN, L. G.; ALCANTARA, S.; COSTA, I. R.; SEMIR, J. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 26, p. 43-53, 2013.

GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 741-743, 1986.

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

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC-Editora, Ribeirão Preto, São Paulo, 2002.

HÁGSATER, E. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: TAN, K. W. (ed.). **Proceedings of the eleventh World Orchid Conference**. Miami, 1985, pp. 195-201.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 7. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 11**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2008, 234p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 9. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 13**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2010, 228p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2015, 148p.

HÁGSATER, E.; SANTIAGO, E. The genus *Epidendrum*, Part 12. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 16(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2018a, 144p.

HÁGSATER, E.; SANTIAGO, E. The genus *Epidendrum*, Part 12. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 16(2)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2018b, 76p.

HÁGSATER, E.; SOTO, M. Orchids of Mexico, Part 2 and 3. **Icones Orchidacearum 5 and 6**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2003, 426p.

HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A. *Epidendrum*. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASSMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum: 4. Epidendroideae (part one)**. Oxford University Press, Oxford, 2005a, pp. 236-251.

HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A. **Presentation, 18th World Orchid Conference**, Dijon, France, 2005b.

HOJSGAARD, D.; HÖRANDL, E. The rise of apomixis in natural plant populations. **Frontiers in Plant Science**, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00358.

JIAO, Y.; WICKETT, N. J.; AYYAMPALAYAM, S.; CHANDERBALI, A. S.; LANDHERR, L.; RALPH, P. E.; TOMSHO, L. P.; HU, Y.; LIANG, H.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; CLIFTON, S. W.; SCHLARBAUM, S. E.; SCHUSTER, S. C.; MA, H.; LEEBENS-MACK, J.; dePAMPHILIS, C. W. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 97, 2011.

KOLANOWSKA, M.; MYSTKOWSKA, K. A new species of *Epidendrum* (Orchidaceae) from Panama. **Polish Botanical Journal**, v. 59, n. 2, p. 181-183, 2014.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 38, p. 847-876, 2007.

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.; 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, n. 3, p. 469-481, 2009.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 875-888, 2007.

MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. **Heredity**, v. 110, n. 2, p. 99, 2013.

MARQUES, I.; DRAPR, 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, n. 1, p. 20-34, 2014.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; VIANA, A. J. C. Karyomorphology and GC-rich heterochromatin pattern in *Passiflora* (Passifloraceae) wild species from *Decaloba* and *Passiflora* subgenera. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 11, p. 620-631, 2014.

MENDES, M. G.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, P. E.; BONETTI, A. M.; SAMPAIO, D. S. Sexual, apomictic and mixed populations in *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) polyploid complex. **Plant Systematics and Evolution**, v. 304, p. 817-829, 2018.

MORAES, A. P.; GUERRA, M. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 287, p. 113-118, 2010.

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

MORAES, A. P.; KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; GOMES, S. S. L.; VICCINI, L. F.; BARROS, F.; FELIX, L. P.; GUERRA, M.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. **Plant Biology**, v. 19, n. 2, p. 298-308, 2017.

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

PESSOA, E.; FELIX, L. P.; ALVES, M. A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. **Brittonia**, v. 66, n. 4, p. 347-352, 2014.

RAMSEY, J.; RAMSEY, T. S. Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1648, p. 20130352, 2014.

- RIESEBERG, L. H.; WILLIS, J. H. Plant speciation. **Science**, v. 317, p. 910-914, 2007.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.
- SOLTIS, P. S.; MARCHANR, D. B.; VAN DE PEER, Y.; SOLTIS, D. E. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 119-125, 2015.
- SOLTIS, D. E.; VISGER, C. J.; MERCHANT, D. B.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: pitfalls and paths to a paradigm. **American Journal of Botany**, v. 103, n. 7, p. 1146-1166, 2016.
- STIEFKENS, L.; LAS PEÑHAS, M. L.; BERNARDELLO, G.; LEVIN, R. A.; MILLER, J. S. Karyotypes and fluorescent chromosome banding patterns in southern African *Lycium* (Solanaceae). **Caryologia**, v. 63, n. 1, p. 50-61, 2010.
- STORT, M. N. S. & PAVANELLI, E. A. S. Formation of multiple or adventive embryos in *Epidendrum nocturnum* Jacq (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 55, n. 3, p. 331-336, 1985.
- STORT, M. N. S. & PAVANELLI, E. A. S. Crossing systems in *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 34, n. 1, p. 59-62, 1986.
- TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. (ed.) **Orchid biology: reviews and Prspectives III**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1984, pp. 324-410.
- TRÁVNÍČEK, P.; JERSÁKOVÁ, J.; KUBÁTOVÁ, B.; KREJČÍKOVÁ, J.; BATEMAN, R. M.; LUČANOVÁ, M.; KRAJNÍKOVÁ, E.; TĚŠITELOVÁ, T.; STÍPKOVÁ, Z.; AMARDEILH, J.; BRZOSKO, E.; JERMAKOWICZ, E.; CABANNE, O.; DURKA, W.; EFIMOV, P.; HEDRÉN, M.; HERMOSILLA, C. E.; KREUTZ, K.; KULL, T.; TALI, K.; MARCHAND, O.; REY, M.; SCHIESTL, F. P.; CURN, V.; SUDA, J. Minority cytotypes in European populations of the *Gymnadenia conopsea* complex (Orchidaceae) greatly increase intraspecific and intrapopulation diversity. **Annals of Botany**, v. 110, n. 5, p. 977-986, 2012.

VEYRET, Y. Apomixie et variation chez *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Bulletin of the Museum National of History Natural, Paris, section B, Adansonia**, v. 4, n. 3-4, p. 183-192, 1982.

WENDEL, J. F. The wondrous cycles of polyploidy in plants. **American Journal of Botany**, v. 102, p. 1753-1756, 2015.

Capítulo II

Análises cariotípicas e de tamanho do genoma contribuem para a organização taxonômica de *Epidendrum* L. “grupo Difforme” (Laeliinae, Orchidaceae)

Análises cariotípicas e de tamanho do genoma contribuem para a organização taxonômica de *Epidendrum* L. “grupo Difforme” (Laeliinae, Orchidaceae)

Joel M. P. Cordeiro¹, Edlley Pessoa², Lucas Costa³, Gustavo Souza³, Erton Mendonça de Almeida³, Cássio van den Berg⁴; Leonardo P. Felix¹

Resumo

Em *Epidendrum*, o grupo infragenérico “Difforme” apresenta espécies morfológicamente semelhantes e relativamente difíceis de serem identificadas em campo ou mesmo em materiais herborizados. Desta forma, o uso de outras abordagens além da morfologia é importante para esclarecer seus limites interespecíficos. O presente trabalho tem como objetivo analisar o cariótipo (número cromossômico e bandas heterocromáticas CMA/DAPI) e tamanho do genoma (2C DNA) em espécies brasileiras do grupo “Difforme”. Foram analisadas nove espécies e 30 indivíduos de diferentes populações. Todas as espécies apresentaram $2n = 40$ e números variáveis de bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais (0-4) ou proximais (8-16). O conteúdo de DNA nuclear variou de 3,99 µg em *E. campaccii* Hágsater & L.Sánchez a 5,68 µg em *E. althausenii* A.D.Hawkes. Ao conciliar as informações de número e distribuição de heterocromatina, tamanho do genoma diploide, análises filogenéticas e caracteres morfológicos das espécies, novas considerações taxonômicas são propostas. Dentre elas, *E. latilabre* Lindl. pode corresponder a duas espécies distintas e *E. campaccii* e *E. pseudodifforme* Hoehne & Schltr. podem constituir um mesmo táxon. Correlações entre bandas heterocromáticas e conteúdo de DNA, ou entre conteúdo de DNA e filogenia foram pouco expressivas. Pequenas correlações podem ser vistas ao comparar número e distribuição de bandas heterocromáticas com o posicionamento filogenético dos clados e entre conteúdo de DNA e distribuição geográfica das espécies.

Palavras-chave: 2C DNA; CMA/DAPI; Complexo taxonômico; Heterocromatina.

Introdução

Em *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae), o grupo infragenérico “Difforme” se distingue morfológicamente pela inflorescência corimbosa ou com flores solitárias, flores verdes a amarelo-esverdeadas, com presença do clinândrio eroso, denticulado ou franjado (SALDAÑA & HÁGSATER, 1996; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018). Inicialmente, o número de espécies do grupo era estimado em 55 representantes (HÁGSATER, 1985), mas atualmente o número de táxons pode ultrapassar 100

¹ Universidade Federal da Paraíba

² Universidade Federal do Mato Grosso

³ Universidade Federal de Pernambuco

⁴ Universidade Estadual de Feira de Santana

espécies (HÁGSATER & SALDAÑA, 2009, 2013, 2015, 2016; PESSOA et al., 2014; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018). O grupo tem ampla distribuição, ocorrendo em florestas úmidas desde a Florida (EUA), México, América Central e Caribe, até a Bolívia na América do Sul (SALDAÑA & HÁGSATER, 1996). Para o Brasil, são mencionadas 10 espécies, oito destas ocorrem no domínio da Mata Atlântica e duas na Amazônia (PESSOA et al., 2014; BFG, 2015).

A maioria das espécies do grupo *Difforme* encontrada em cultivo ou depositada em herbários sé tradicionalmente identificada como “*Epidendrum difforme* Jacq.” (HÁGSATER, 1985; SALDAÑA & HÁGSATER, 1996). Uma maior atenção taxonômica ao grupo foi dada a partir de meados da década de 1990 e novas espécies vêm sendo frequentemente descritas (CHRISTENSON, 1994; SALDAÑA & HÁGSATER, 1996; HÁGSATER & SALDAÑA, 2009, 2013, 2015, 2016; PESSOA et al., 2014; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018). Contudo, as espécies brasileiras são morfológicamente semelhantes (PESSOA et al., 2014) e apresentam significativa variabilidade e complexidade morfológica em diferentes condições de campo e em materiais herborizados, o que reforça a importância de outras abordagens além da morfologia para esclarecer seus limites interespecíficos.

Neste contexto, as análises cariotípicas aparecem como importante ferramenta no entendimento de relações complexas entre espécies de um mesmo gênero (ver por exemplo, FIRETTI-LEGGIERI et al., 2011; GRABIELE et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016). Para o grupo *Difforme* existem registros cromossômicos para apenas quatro espécies, estas apresentando cariótipos estáveis quanto ao número ($2n = 40$), relativamente simétricos em relação ao tamanho ($\sim 2 \mu\text{m}$) e morfologia predominantemente metacêntrica (ASSIS et al., 2013; FELIX & GUERRA, 2010). Contudo, a análise da distribuição da heterocromatina com uso dos fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA) e 4´6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) tem se mostrado bastante eficaz na diferenciação citotaxonômica de suas espécies, auxiliando, inclusive, na descrição de novos táxons (PESSOA et al., 2014).

Além da análise cariotípica, o tamanho do genoma (2C DNA) tem se mostrado uma importante ferramenta para o estudo de complexos de espécies (TRÁVNÍČEK et al., 2012; PRANČL et al., 2014; SOSA et al., 2016; BURCHARDT et al., 2018). Através da citometria de fluxo é possível obter uma rápida caracterização dos componentes celulares dentro de indivíduos, populações e comunidades (VRÁNA et al., 2014). A técnica tem sido aplicada para análises em larga escala da evolução do

tamanho do genoma, identificações e delimitações taxonômicas, estudos de poliploides e biologia reprodutiva (DOLEŽEL et al., 2007; KRON et al., 2007; VRÁNA et al., 2014). Em Orchidaceae, estudos sobre variações no tamanho do genoma têm sido melhor discutidos nos últimos anos, permitindo estabelecer correlações importantes entre subfamílias, tribos e subtribos (JONES et al., 1998; LEITCH et al., 2009; TRÁVNÍČEK et al., 2015; MORAES et al., 2017), além de contribuir para a delimitação de grupos complexos (TRÁVNÍČEK et al., 2012). Para *Epidendrum* em particular, tais análises têm permitido discutir diferentes hipóteses envolvendo híbridos naturais e variações intraespecíficas do número cromossômico (ASSIS, 2013; MARQUES et al., 2004).

O presente trabalho tem como objetivo analisar o cariótipo (número cromossômico e bandas heterocromáticas CMA/DAPI) e tamanho do genoma (2C DNA) em espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme” (Laeliinae, Orchidaceae) e correlacionar tais informações com reconstruções filogenéticas do grupo. A conciliação destas análises será usada para auxiliar na delimitação taxonômica do grupo, assim como entender aspectos da evolução cromossômica, do tamanho do genoma e distribuição geográfica das espécies.

Materiais e Método

Material vegetal

A análise cariotípica e o tamanho do genoma em *Epidendrum* “grupo Difforme” envolveu 10 espécies, incluindo um morfotipo de *Epidendrum latilabre* Lindl. (Figura 1, Tabela 1), totalizando 30 indivíduos de diferentes populações do Brasil (Figura 2). Nome dos táxons, vouchers e local de coleta são apresentados na Tabela 1. Entre as espécies, *E. amapaense* Hágsater & L.Sánchez e *E. althausenii* A.D.Hawkes ocorrem em áreas restritas da floresta Amazônica. As demais espécies são distribuídas pela Mata Atlântica, sendo *Epidendrum latilabre*, *E. campaccii* Hágsater & L.Sánchez e *E. pseudodifforme* Hoehne & Schltr. amplamente distribuídos, enquanto *E. sanchezii* E.Pessoa & L.P.Felix, *E. anatipedium* L.M.Sánchez & Hágsater, *E. pessoae* Hágsater & L.Sánchez e *Epidendrum garciae* Pabst de distribuição restrita (Figura 2). Todo material foi coletado em campo e cultivado no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFPB. Exsiccatas com material testemunha foram depositadas no herbário EAN. A identificação das espécies foi

baseada em Saldaña e Hágsater (1996), Pessoa et al. (2014) e Hágsater e Saldaña (2009, 2013, 2015, 2016).



Figura 1. Espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme” analisadas. A. *E. althausenii*, B. *E. amapaense*, C. *E. anatipedium*, D. *E. campaccii*, E. *E. garciae*, F. *E. latilabre*, G. *E. aff. latilabre*, H. *E. pessoae*, I. *E. pseudodiforme*, J. *E. sanchezii*.

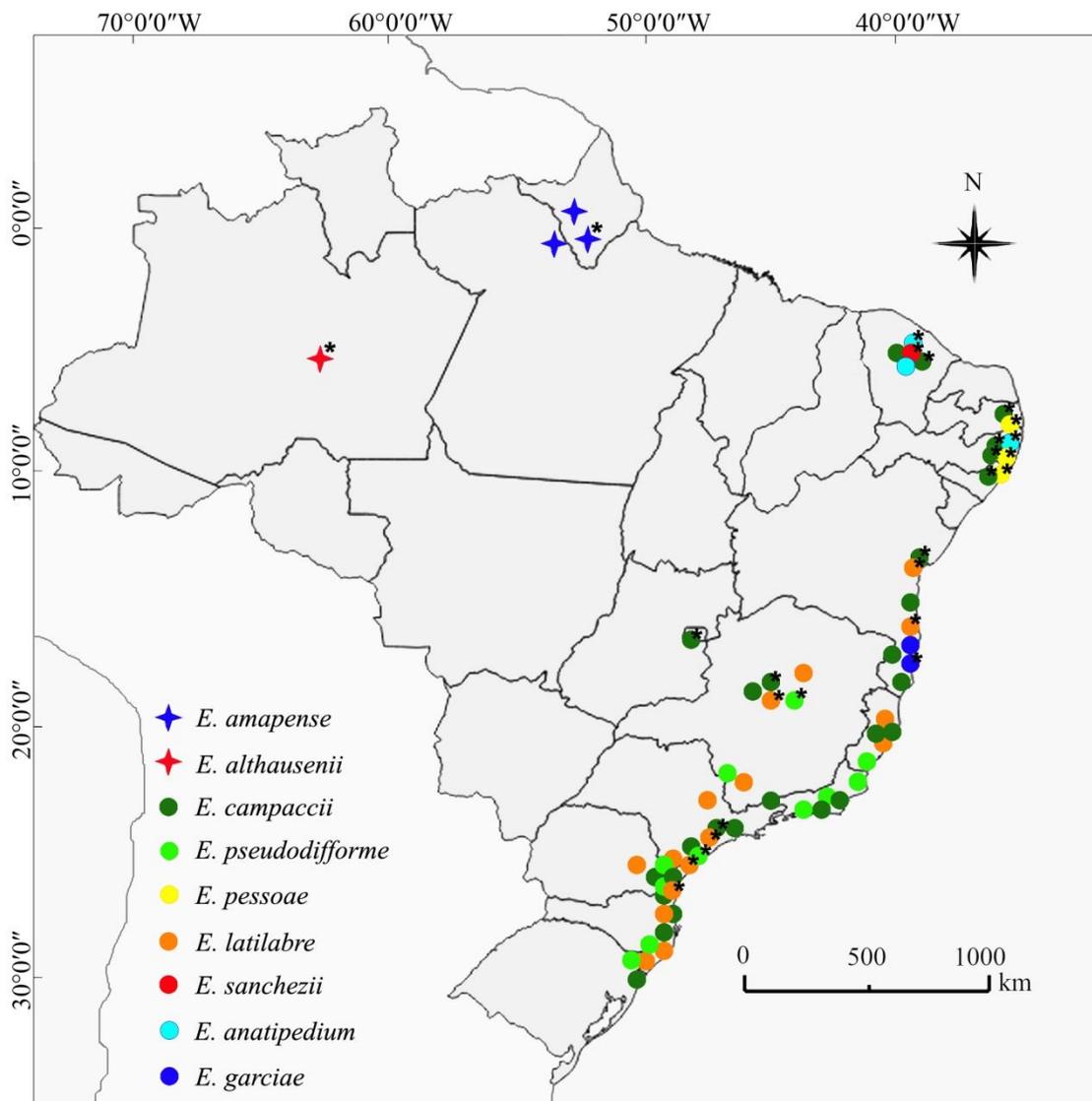


Figura 2. Distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme”. Fonte: gbif.org, BFG (2015) e coletas de campo realizados pelos autores. Asterisco (*) indicam populações analisadas.

Análise citogenética

Pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2 mM a 10°C por 24 horas, fixadas em etanol absoluto/ácido acético glacial (3:1, v/v) por 2 horas e estocadas em freezer a -20°C. Para o preparo das lâminas as raízes foram digeridas em solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) (w/v) a 37°C por 60 minutos. O material foi esmagado em ácido acético 60% e congelado em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. Para a seleção das melhores lâminas, estas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/mL):glicerol (1:1, v/v) e analisadas ao microscópio de fluorescência.

Subsequentemente, as lâminas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 minutos e mantidas em etanol absoluto a temperatura ambiente por duas horas (GUERRA & SOUZA, 2002).

Para a coloração com os fluorocromos CMA/DAPI as lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e posteriormente coradas por uma hora com 10 µL de CMA (0,1 mg/ml) e depois com 10 µL de DAPI (1 µg/ml) por meia hora, montadas em glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v) e estocadas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos (GUERRA & SOUZA, 2002).

As células foram analisadas e as melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision[®] v.4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). As imagens foram editadas (sobreposição e otimização de brilho e contraste) com o uso do software Adobe Photoshop CS3 Extended Version 10.0. As medições cromossômicas foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ 1.51k (SCHNEIDER et al., 2012) e a morfologia cromossômica estabelecida conforme Guerra (1986).

Tamanho do genoma

O conteúdo de DNA nuclear das espécies de *Epidendrum* grupo *Difforme* foi determinada por citometria de fluxo conforme protocolo adaptado de Doležel et al. (2007). Folhas frescas de diferentes indivíduos de cada espécie foram coletadas para a preparação das amostras. Foram analisados indivíduos de 1-3 populações, com três repetições para cada indivíduo amostrado. Utilizou-se como padrão interno *Zea mays* L. ‘CE-777’ (2C = 5,43 µg) e *Glycine max* Merr. ‘Polanka’ (2C = 2,50 µg) (DOLEŽEL et al., 1998). Aproximadamente 25-50 mg de tecido foliar de cada amostra + tecido foliar padrão foi macerado com uma lâmina de aço em uma placa de Petri contendo 1 ml de tampão de isolamento WPB (LOUREIRO et al., 2007). A solução foi completamente filtrada com um filtro de malha de 30 µm e misturada com 20 µl de iodeto de propídeo (1 mg/ml). A quantificação do DNA por citometria de fluxo foi realizada usando PARTEC Cyflow Space (Müster, Germany) equipado com laser canon 488-nm. O histograma de fluorescência relativa foi analisado usando o software FloMax 2.3 e os picos com um coeficiente de variação (C.V.) maior que 5% foram descartados. O conteúdo de DNA (µg) das amostras foi calculado usando a equação “DNA da amostra (µg) = (G1 da amostra / G1 padrão) × DNA padrão (µg)”, onde: G1 da

amostra corresponde à posição do pico G1 da amostra; G1 padrão corresponde à posição do pico G1 do padrão; e DNA padrão corresponde à quantidade de DNA nuclear (μg) previamente conhecido do padrão usado em cada medição. Os resultados do tamanho do genoma para cada grupo de espécie amostrada foram comparados estatisticamente usando Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, utilizando o programa SISVAR[®] versão 5.6 (FERREIRA, 2000).

Filogenia e evolução cariotípica e de tamanho do genoma

Os valores do tamanho do genoma, assim como o padrão de distribuição de heterocromatina, foram apresentados junto a análises filogenéticas preliminares para as espécies brasileiras do grupo *Difforme* (PESSOA et al., in prep.). A árvore filogenética foi gerada através de uma matriz de consenso envolvendo oito marcadores: dois nucleares (ITS e EAT5) e seis plastidiais (*atpi-atph*, *matK*, *rpl32-trnL*, *rps16-trnK*, *rps16-trnQ* e *trnL-F*). Além das espécies brasileiras, *E. pseudobarbeyanum* Pupulin & Karremans (espécies centro-americana) foi incluída e usada como outgroup.

Resultados

As espécies de *Epidendrum* “grupo *Difforme*” apresentaram número cromossômico constante ($2n = 40$), cariótipos relativamente simétricos, com cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos, de tamanho médio aproximado de $1,8 \mu\text{m}$ (Tabela 1). Novos registros cromossômicos foram descritos para *E. althausenii*, *E. amapaense*, *E. anatipedium*, *E. garciae* e *E. pessoae* ($2n = 40$).

O padrão de bandas heterocromáticas foi marcado pela presença de regiões ricas em GC ($\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$) localizada nas regiões terminais ou proximais dos cromossomos (Figura 3). O número de bandas terminais variou de zero a quatro, enquanto as bandas proximais mais evidentes variaram de oito a 16 (Tabela 1). Cromossomos heteromórficos foram visualizados em *E. althausenii* (Figura 3A, cabeça de seta) e *E. aff. latilabre* (Figura 3G, cabeça de seta).

O conteúdo de DNA nuclear ($2C$ DNA) nas espécies de *Epidendrum* “grupo *Difforme*” variou estatisticamente entre as espécies analisadas ($F = 18,766$; $P < 0,0001$), com valores que vão desde $3,99 \pm 0,15 \mu\text{g}$ em *E. campaccii* a $5,68 \pm 0,25 \mu\text{g}$ em *E. althausenii* (Tabela 1). A variação no tamanho do genoma foi de 1,42 vezes, mas de

forma geral os valores foram aproximados entre a maioria das espécies, devido, sobretudo, ao número cromossômico constante no grupo ($2n = 40$).

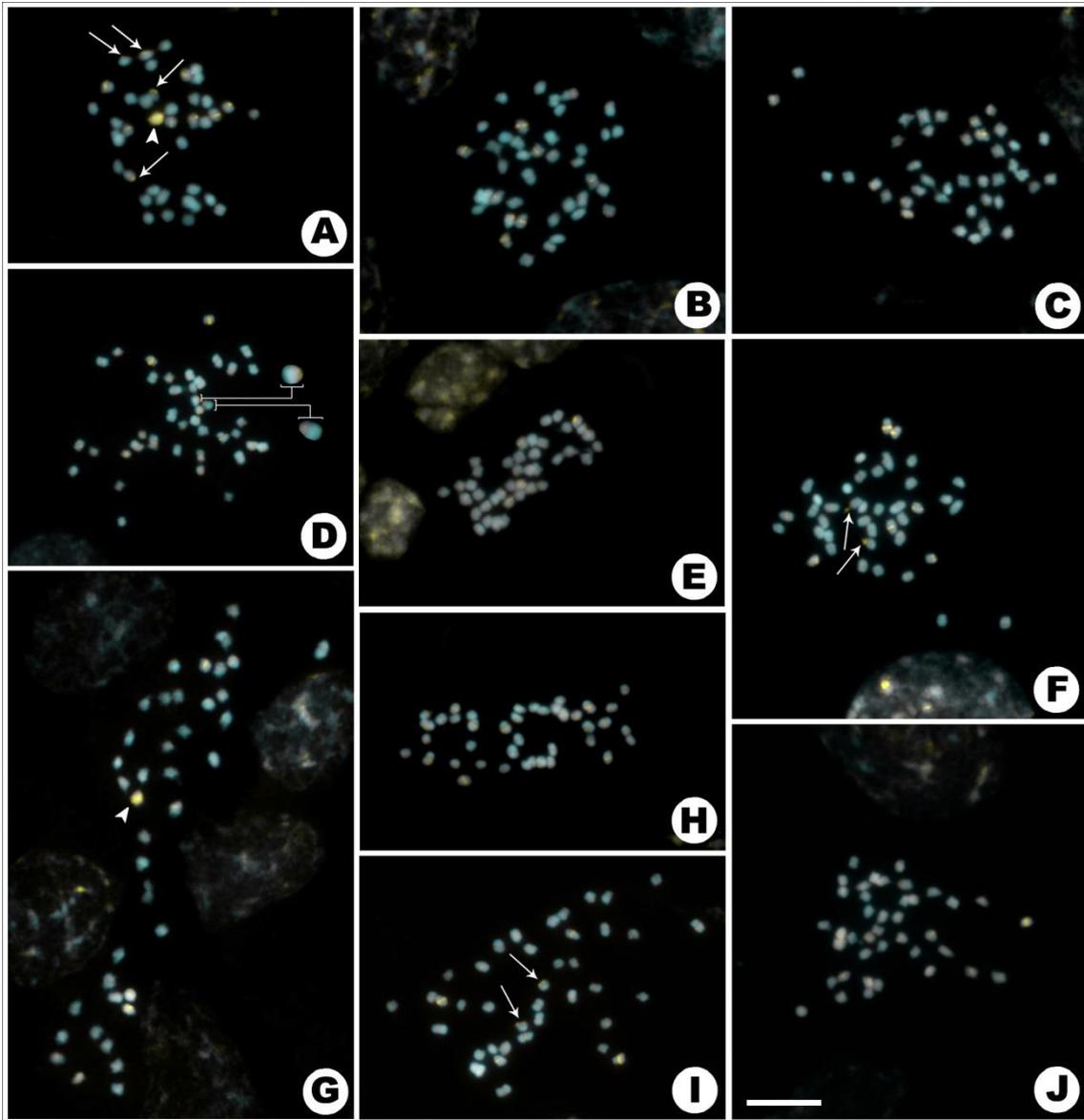


Figura 3. Metáfases mitóticas em espécies de *Epidendrum* “grupo Difforme”. A. *E. althausenii* ($2n = 40$), B. *E. amapaense* ($2n = 40$), C. *E. anatipedium* ($2n = 40$), D. *E. campaccii* ($2n = 40$), E. *E. garciae* ($2n = 40$), F. *E. latilabre* ($2n = 40$), G. *E. aff. latilabre* ($2n = 40$), H. *E. pessoae* ($2n = 40$), I. *E. pseudodiforme* ($2n = 40$), J. *E. sanchezii* ($2n = 40$). Insetos em D evidenciam bandas CMA⁺ terminais inconspícuas. Setas em A, F e I mostram bandas CMA⁺ terminais. Cabeças de setas em A e G mostram cromossomos heteromórficos. Barra em J corresponde a 10 μ m.

Tabela 1. Lista de espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme” analisadas e seus respectivos vouchers, procedência, número cromossômico, bandas heterocromáticas e tamanho do genoma (2C DNA). Legenda: Vouchers - JMPC (Joel Maciel Pereira Cordeiro), EMA (Erton Mendonça de Almeida), LPF (Leonardo Pessoa Felix), EP (Edlley Pessoa); Procedência - AM (Amazonas), AP (Amapá), PE (Pernambuco), CE (Ceará), PB (Paraíba), BA (Bahia), DF (Distrito Federal), AL (Alagoas), MG (Minas Gerais), SP (São Paulo), PR (Paraná), estados brasileiros; Bandas heterocromáticas - Pr (Proximais), Ter (Terminais). DP - Desvio padrão.

Espécie	Voucher	Procedência	2n	Tamanho cromossômico	Bandas Heterocromáticas (CMA ⁺ /DAPI ⁻)	2C DNA*** (µg) Média ± DP
<i>E. althausenii</i> A.D.Hawkes*	JMPC - 1124	Manaus, AM**	40	Min. 1,32 µm Máx. 2,16 µm Méd. 1,72 µm	4 Ter, 11 Pr, 1 Pr heteromórfico	5,68 ^d ± 0,25
<i>E. amapaense</i> Hágsater & L.Sánchez*	JMPC - 1329	Macapá, AP**	40	Min. 1,63 µm Máx. 2,39 µm Méd. 2,05 µm	12 Pr	4,82 ^{b,c} ± 0,16
<i>E. anatipedium</i> L.M.Sánchez & Hágsater*	LPF - 15103 EMA - 2079	Pacotí, CE** Jaqueira, PE**	40	Min. 1,52 µm Máx. 2,27 µm Méd. 1,84 µm	10 Pr	4,26 ^{a,b} ± 0,29
<i>E. campaccii</i> Hágsater & L. Sánchez	EMA - 1233 EMA - 1493 EMA - 1566 EMA - 1568 EMA - 1691 JMPC - 477 JMPC - 967 LPF - 15069 LPF - 16855 EP - 1342	Areia, PB** Cruz das Almas, BA São Caetano, PE Aguas Belas, PE Maraial, PE Un. dos Palmares, AL Pains, MG** Meruoca, CE Cubatão, SP Brasília, DF**	40	Min. 1,46 µm Máx. 2,53 µm Méd. 1,88 µm	2 Ter, 14 Pr	3,99 ^a ± 0,15
<i>E. garciae</i> Pabst*	EP - 1146	Ilhéus, BA**	40	Min. 1,35 µm Máx. 2,13 µm Méd. 1,59 µm	8 Pr	4,66 ^{b,c} ± 0,23

<i>E. latilabre</i> Lindl.	EP - 1344	Curitiba, PR**	40	Min. 1,46 µm	2 Ter, 10 Pr	4,50 ^{a,b} ± 0,09
	EMA - 1493	Cruz das Almas, BA**		Máx. 2,34 µm		
	JMPC - 1084	São Paulo, SP**		Méd. 1,90 µm		
	LPF - 16993	Ubatuba, SP				
<i>Epidendrum aff. latilabre</i>	LPF - 15264C	Vargem Bonita, MG**	40	Min. 1,63 µm	8 Pr, 1 Pr heteromórfico	4,37 ^{a,b} ± 0,15
	LPF - 16166	Vit. da Conquista, BA**		Máx. 2,51 µm Méd. 1,99 µm		
<i>E. pessoae</i> Hágsater & L.Sánchez*	EMA - 1561	Gurinhém, PB**	40	Min. 1,25 µm	16 Pr	4,72 ^{b,c} ± 0,08
	EMA - 1649	Taq. do Norte, PE		Máx. 2,31 µm		
	EMA - 2132	Areia, PB**		Méd. 1,76 µm		
	EMA - 2194	Recife, PE				
	LPF - 15998	Taq. do Norte, PE				
<i>E. pseudodiforme</i> Hoehne & Schltr.	JMPC - 1085	São Paulo, SP**	40	Min. 1,49 µm	2 Ter, 14 Pr	4,45 ^{a,b} ± 0,04
	LPF - 15250	São Roq. de Minas, MG		Máx. 3,37 µm Méd. 2,14 µm		
<i>E. sanchezii</i> E.Pessoa & L.P.Felix	LPF - 15117	Pacotí, CE**	40	Min. 1,38 µm Máx. 2,53 µm Méd. 1,74 µm	8 Pr	5,10 ^c ± 0,18

* Novos registros cromossômicos

** Espécies usadas na análise de conteúdo de DNA

*** Para o tamanho do genoma, médias seguidas da mesma letra sobrescrita não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P > 0,05).

As espécies brasileiras do grupo Difforme formam um grupo monofilético e são agrupadas em três cladogramas distintos: clado A com *E. sanchezii*; clado B envolve *E. althausenii*, *E. garciae*, *E. latilabre* e *E. anatipedium*; e clado C composto por *E. amapaense*, *E. pessoae*, *E. pseudodifforme* e *E. campaccii* (Figura 4).

A distribuição de heterocromatina, apesar de semelhante entre as espécies, pode apresentar padrões próprios de cada clado. O clado A (*Epidendrum sanchezii*) apresenta a menor quantidade de bandas heterocromáticas: oito bandas CMA⁺/DAPI⁻ nas regiões proximais; O clado B apresenta-se bastante diverso em termos de distribuição de bandas CMA⁺/DAPI⁻: 0-4 terminais, 8-11 proximais e ocorrência de cromossomos heteromórficos; O clado C é caracterizado pelo maior número de bandas CMA⁺/DAPI⁻ proximais (12-16).

Os valores de tamanho do genoma, por sua vez, são distribuídos de forma mais aleatória, tendo em vista que as espécies com maiores conteúdo de DNA (*E. althausenii*, *E. sanchezii* e *E. amapaense*) assim como aquelas com menores tamanhos do genoma (*E. campaccii* e *E. anatipedium*) não estão agrupadas por estas características.

Discussão

O número cromossômico ($2n = 40$), tamanho médio (~1,8 μm) e morfologia predominante metacêntrica a submetacêntrica registrado para as espécies brasileiras do grupo Difforme é comumente encontrado na maioria dos grupos infragenéricos de *Epidendrum* (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; FELIX & GUERRA, 2010), com exceção apenas do grupo Schistochilum (= Amphyglottis), que exibe considerável variação no número, tamanho e morfologia dos cromossomos (PINHEIRO et al., 2009; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013). Fenômenos cariotípicos de poliploidia e disploidia registrados em diferentes grupos de Orchidaceae e para alguns grupos infragenéricos de *Epidendrum* (grupos Nocturnum, Schistochilum, Coilostylis e Smaragdinum; TANAKA & KAMEMOTO, 1984; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013) não foram observados entre as espécies ou indivíduos das diferentes populações analisadas. Embora a poliploidia e a disploidia sejam fenômenos amplamente distribuídos (FELIX

& GUERRA, 2000, 2005, 2010), aparentemente não tiveram importância para a evolução do grupo *Difforme*.

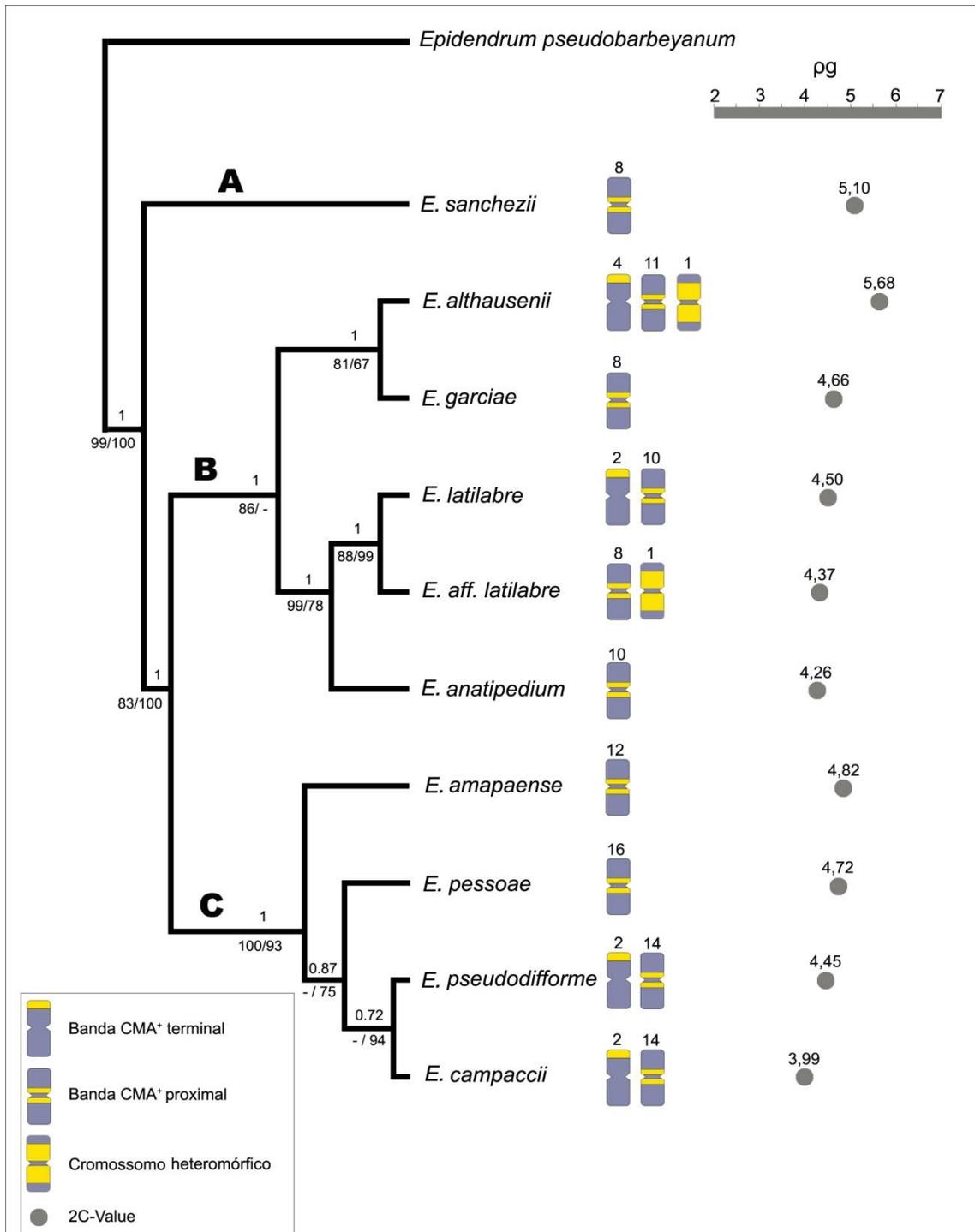


Figura 4. Filogenia, bandas heterocromáticas e tamanho do genoma em espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo *Difforme*”. Valores acima dos ramos indicam probabilidade posterior, abaixo indicam máxima verossimilhança/bootstrap. Árvore filogenética adaptada de Pessoa et al. (in prep.).

Os valores referentes ao tamanho do genoma encontrados para o grupo Difforme foram semelhantes aos encontrados em outras espécies diploides do gênero *Epidendrum*, como *E. flammeum* E.Pessoa & M.Alves ($2C = 5,04 \text{ } \mu\text{g}$), *E. xanthinum* Lindl. ($2C = 4,48 \text{ } \mu\text{g}$), *E. secundum* Jacq. ($2C \sim 4,00 \text{ } \mu\text{g}$) (ASSIS, 2013) e *E. falcisepalum* F.Lehm. & Kraenzl. ($2C = 4,08 \text{ } \mu\text{g}$) (MARQUES et al., 2014). De acordo com as categorias de tamanho do genoma propostas por Leitch et al. (2005), todas as espécies analisadas são classificadas como contendo “genomas pequenos” ($2C > 2,8$ e $\leq 7 \text{ } \mu\text{g}$). Os valores de conteúdo de DNA em determinados grupos vegetais podem variar em decorrência de diversos fenômenos cariotípicos, especialmente poliploidia, aneuploidia ou mesmo disploidia (KRON et al., 2007; SOSA et al., 2016; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2017; GOMES et al., 2018). Existem ainda correlações significativas entre tamanho do genoma e assimetria cariotípica (BURCHARDT et al., 2018), padrões de heterocromatina (VAN-LUME & SOUZA, 2018) ou posicionamento filogenético das espécies (CHUNG et al., 2012; MORAES et al., 2017). Para o grupo Difforme, contudo, os valores estatísticos não demonstram correlações notáveis entre conteúdo de DNA e distribuição de heterocromatina (comparar, por exemplo, *E. sanchezii*, *E. anatipedium* e *E. althausenii*) ou posicionamento filogenético (comparar, por exemplo, *E. amapaense*, *E. sanchezii* e *E. althausenii*). Isto pode ser justificado pela ocorrência de um único número cromossômico ($2n = 40$), simetria cariotípica e semelhança no padrão de heterocromatina entre as espécies. Grupos vegetais com o mesmo número cromossômico, cariótipos simétricos e com padrões de heterocromatina similares podem apresentar tamanho do genoma relativamente próximos (CAROVIĆ-STANKO et al., 2010; VAN-LUME & SOUZA, 2018). Fatores como latitude, distribuição geográfica e ecologia das espécies vegetais também podem estar associados à variação no tamanho do genoma (VEGA & DEMATTEIS, 2015; ŠTUBŇOVÁ et al., 2017; SOUZA et al., 2019). Em relação à distribuição geográfica, *E. althausenii* (5,68 μg) e *E. amapaense* (4,82 μg), ambas de distribuição amazônica, aparecem entre as três espécies com maiores tamanhos do genoma. Todavia, os valores de conteúdo de DNA de *E. amapaense* são estatisticamente próximos a muitas espécies com ocorrência nas Matas úmidas do leste brasileiro, não se estabelecendo correlações significativas entre tamanho do genoma e a distribuição geográfica do grupo.

A distribuição de heterocromatina (0-4 terminais e 8-16 proximais CMA⁺) confirma o padrão previamente reportado para espécies do grupo Difforme (PESSOA et al., 2014). Este padrão de bandas CMA/DAPI pode ser característico para o grupo

Difforme, tendo em vista que espécies de outros grupos infragenéricos de *Epidendrum* apresentam padrões diferentes, com ocorrências de bandas DAPI⁺ ou um pequeno número de bandas proximais (ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013; ver Capítulo 3). No nível interespecífico, a maioria das espécies se mostrou relativamente semelhante em relação ao número e localização de regiões heterocromáticas. Informações do padrão de bandas heterocromáticas junto com valores de conteúdo de DNA e análises filogenéticas podem ser agrupadas e relações interespecíficas no grupo Difforme podem ser melhor interpretadas.

Dois grupos de plantas morfologicamente distintas, mas classificadas como *E. latilabre* (*E. latilabre* e *E. aff. latilabre*) apresentaram padrões de bandas heterocromáticas distintos. *Epidendrum aff. latilabre* apresentou oito bandas CMA⁺/DAPI⁻ proximais e um bloco heterocromático CMA⁺/DAPI⁻ ocupando a maior parte de um cromossomo heteromórfico. *Epidendrum latilabre*, por outro lado, apresentou duas bandas terminais e 10 bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻, mas não foram verificados blocos heterocromáticos em cromossomos heteromórficos. Valores relativos ao conteúdo de DNA, por outro lado, não revelaram diferenças significativas entre as duas espécies e a análise filogenética demonstra que ambas as espécies são relacionadas. A descrição original de *E. latilabre* (LINDLEY, 1841) define a espécie como uma planta epífita, semelhante a *E. umbellatum* Sw., mas com labelo quatro vezes maior em largura que em comprimento e curvado para baixo, lembrando um “avental engomado”. Entretanto, o autor não apresentou nenhuma ilustração ou citou qualquer material tipo para a espécie. *Epidendrum aff. latilabre* apresenta labelo aberto a pouco curvo, com lobos laterais destacados e lobo médio bipartido. Desta forma, duas considerações podem ser propostas para estes táxons: a) *E. latilabre* pode apresentar uma ampla variedade morfológica e cariotípica ao longo de sua distribuição geográfica e b) *E. latilabre* pode constituir duas espécies distintas.

Situação oposta pode ser verificada em *E. campaccii* e *E. pseudodifforme*. As espécies apresentaram padrões de distribuição de heterocromatina semelhantes (duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais e 14 proximais). A análise filogenética revelou que as mesmas são relacionadas e valores de conteúdo de DNA demonstraram uma diferença pouco significativa entre as duas espécies. Para Hágsater & Saldaña (2015) *E. campaccii* pode ser diferenciada de *E. pseudodifforme* por serem “plantas maiores, com folhas mais largas, sépalas largas, labelo com margem inteira e coluna longa”. Contudo, estas espécies são morfologicamente semelhantes sob as mesmas condições de cultivo.

Elas podem diferir em campo dependendo das condições ambientais de estresse da planta, além de apresentarem variações na inflorescência, onde as primeiras e últimas flores exibem deformação no labelo (PESSOA et al., in prep.). Desta forma, *E. campaccii* e *E. pseudodifforme* podem se tratar de um mesmo táxon, descrito de forma equivocada diante da variabilidade morfológica floral própria da espécie. Uma terceira espécie, *E. thiagoi* Hágsater & L.Sánchez (HÁGSATER & SALDAÑA, 2010), morfológicamente semelhante às duas anteriores, foi recentemente revisada e sinonimizada como *E. campaccii* (BFG, 2015). O cariótipo de uma população de *E. campaccii* proveniente de Brasília-DF e correspondente a descrição de *E. thiagoi* foi similar aos demais indivíduos de diferentes populações de *E. campaccii* analisadas, corroborando sua sinonimização.

Castro-Neto e Menezes (2009) descreveram uma nova espécie do grupo Difforme para o estado de Pernambuco, denominada *E. amarajiense* V.P.Castro & L.C.Menezes. Contudo, análise de diferentes materiais desta espécie provenientes do estado de Pernambuco e Ceará revelou tratar-se de um sinônimo de *E. anatipedium* (BFG, 2015). Ambas apresentaram o mesmo padrão de heterocromatina (10 CMA⁺/DAPI⁻ proximais) e conteúdo de DNA próximos, corroborando a afirmação de que se trata de um mesmo táxon.

As espécies do grupo Difforme que ocorrem no Brasil, e também a maior parte daquelas que ocorrem na América do Sul, exibem um padrão semelhante na morfologia da flor por apresentar labelo trilobado (SALDAÑA & HÁGSATER, 1996). *Epidendrum sanchezii*, contudo, apresenta labelo inteiro, se assemelhando a muitas espécies que ocorrem na América Central (SALDAÑA & HÁGSATER, 1996). Estudos filogenéticos preliminares (PESSOA et al., in prep.) indicam esta espécie como a mais basal do grupo no Brasil. Assim, análises filogenéticas combinadas com a morfologia da flor sugerem uma possível origem e diversificação das espécies brasileiras a partir de grupos provenientes da América Central. A espécie apresentou oito bandas CMA⁺/DAPI⁻ proximais, diferindo das demais espécies analisadas (com exceção de *E. garciae*). Isto presume que as espécies mais basais do grupo Difforme poderiam apresentar um padrão semelhante, com ausência (ou pouca evidência) de bandas CMA⁺ terminais e um número menor de bandas proximais.

De forma geral, as espécies brasileiras de *Epidendrum* “grupo Difforme” apresentam correlações pouco expressivas entre padrões de bandas heterocromáticas e conteúdo de DNA, ou entre conteúdo de DNA e filogenia. Por outro lado, relações

notáveis podem ser vistas ao comparar bandas heterocromáticas com o posicionamento filogenético dos clados e entre conteúdo de DNA e distribuição geográfica das espécies. Em alguns grupos vegetais, a acumulação de diferentes tipos de elementos repetitivos (transposons, DNAs satélites, retroelementos) pode causar variações no tamanho do genoma (BENNETZEN et al., 2005; LEITCH & LEITCH, 2012; PELLICER et al., 2018), assim como na distribuição da heterocromatina (LAMB et al., 2007; BARROS E SILVA et al., 2010; EVTUSHENKO et al. 2016; ALLSHIRE & MADHANI, 2017). Assim, alguns destes elementos podem ter atuado na configuração do genoma e repercutido na aleatoriedade dos valores de conteúdo de DNA e padrões de bandas heterocromáticas ao longo da evolução das espécies do grupo *Difforme*. A ampla variação morfológica aliada à baixa ocorrência de padrões específicos para as espécies faz do grupo *Difforme* um dos maiores desafios e um excelente modelo para estudos evolutivos do gênero *Epidendrum* nos Neotrópicos.

Conclusão

O padrão de distribuição de heterocromatina foi marcado pela ocorrência de número variável de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ proximais (8-16) ou terminais (0-4). Contudo, o número desses blocos algumas vezes variou entre espécies proximamente relacionadas, como em *E. latilabre* e *E. aff. latilabre* ou foi constante como em *E. pseudodiforme* e *E. campaccii*.

Os valores de conteúdo de DNA variaram discretamente entre as espécies (variação de 1,42 vezes no tamanho do genoma), devido, sobretudo, ao número cromossômico constante no grupo ($2n = 40$). Não houve correlações expressivas entre tamanho do genoma e bandas heterocromáticas ou posicionamento filogenético das espécies, embora tenha havido uma pequena correlação nos valores médios entre as espécies amazônicas (*E. althausenii* e *E. amapaense*).

Novas considerações taxonômicas são propostas com base no padrão de heterocromatina, valor de 2C, análises filogenéticas e caracteres morfológicos das espécies. Entre elas, *Epidendrum latilabre* e *E. aff. latilabre* podem constituir em duas espécies distintas, enquanto *E. campaccii* e *E. pseudodiforme* podem corresponder a uma única espécie.

Referências

ALLSHIRE, R. C. & MADHANI, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. **Molecular cell biology**, 2017. DOI: 10.1038/nrm.2017.119

ALMEIDA, E. M.; WANDERLEY, A. M.; NOLLET, F.; COSTA F. R.; SOUZA, L. G. R. & FELIX, L. P. A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. **Systematic Botany**, v. 41, n. 2, p. 423-429, 2016.

ASSIS, F. N. M. **Mecanismos de evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Tese. Doutorado em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil, 2013.

ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; BARROS E SILVA, A. E.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, n. 3, p. 329-344, 2013.

BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A.; SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosome Research**, v. 18, n. 4, p. 503-514, 2010.

BENNETZEN, J. L. The many hues of plant heterochromatin. **Genome Biology**, 2000. DOI: <http://genomebiology.com/2000/1/1/reviews/107>.

BFG (Brazilian Flora Group). Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BURCHARDT, P.; SOUZA-CHIES, T. T.; CHAUVEAU, O.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BRISOLARA-CORRÊA, L.; INÁCIO, C. D.; EGGERS, L.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; CAMPOS, J. M. S.; KALTCHUK-SANTOS, E. Cytological and genome size data analyzed in a phylogenetic frame: evolutionary implications concerning *Sisyrinchium* taxa (Iridaceae: Iridoideae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. supl. 1, p. 288-307, 2018.

CAROVIĆ-STANKO, K.; LIBER, Z.; BESENDORFER, V.; JAVORNIK, B.; BOHANEC, 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, n. 1-2, p. 13-22, 2010.

CASTRO NETO, V. P.; MENEZES, L. C. Uma nova espécie de *Epidendrum* do Pernambuco. **Boletim CAOB**, v. 75, p. 35-38, 2009.

CHRISTENSON, E. A. A new orchid from Saül, French Guiana: *Epidendrum oldemanii*. **Brittonia**, v. 46, p. 54-56, 1994.

CHUNG, K.; HIPPI, A. L.; ROALSON, E. H. Chromosome number evolves independently of genome size in a clade with nonlocalized centromeres (*Carex*: Cyperaceae). **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2708-2772, 2012.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82, n. supl. 1, p. 17-26, 1998.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.

EVTUSHENKO, E. V.; LEVITSKY, V. G.; ELISAFENKO, E. A.; GUNBIN, K. V.; BELOUSOV, A. I.; ŠAFÁŘ, J.; DOLEŽEL, J.; VERSHININ, A. V. The expansion of heterochromatin blocks in rye reflects the co-amplification of tandem repeats and adjacent transposable elements. **BMC Genomics**, v. 17, p. 337-352, 2016.

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

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

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

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, Lavras, MG, 2000.

FIRETTI-LEGGIERI, F.; COSTA, I. R.; LOHMANN, L. G.; SEMIR, J.; MARTINS, E. R. F. Chromosome studies in Bignoniaceae (Bignoniaceae): the first record of polyploidy in *Anemopaegma*. **Cytologia**, v. 76, n. 2, p. 185-191, 2011.

GOMES, S. S. L.; VIDAL, J. D.; NEVES, C. S.; ZORZATTO, C.; CAMPACCI, T. V. S.; LIMA, A. K.; KOEHLER, S.; VICCINI, L. F. Genome size and climate segregation suggest distinct colonization histories of an orchid species from Neotropical high-elevation rocky complexes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 3, p. 456-465, 2018

GRABIELE, M.; DAVIÑA, J. R.; HONFI, A. I. Cytogenetic analyses as clarifying tools for taxonomy of the genus *Callisia* Loeffl. (Commelinaceae). **Gayana Botanica**, v. 72, n. 1, p. 34-41, 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC-Editora, Ribeirão Preto, São Paulo, 2002.

HÁGSATER, E. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: TAN, K. W. (ed.). **Proceedings of the eleventh World Orchid Conference**. Miami, 1985, pp. 195-201.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 8. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 12**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2009, 210p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 9. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 13**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2010, 228p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 10. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 14**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2013, 209p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2015, 148p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(2)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2016, 72p.

HÁGSATER, E.; SANTIAGO, E. The genus *Epidendrum*, Part 12. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 16(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2018, 144p.

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, n. 2, p. 189-194, 1998.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 38, p. 847-876, 2007.

LAMB, J. C.; YU, W.; HAN, F.; BIRCHLER, J. A. Plant chromosomes from end to end: telomeres, heterochromatin and centromeres. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 2, p. 116-122, 2007.

LEITCH, I. J.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; BENNETT, M. D. Evolution of DNA Amounts Across Land Plants (Embryophyta). **Annals of Botany**, v. 95, p. 207-217, 2005.

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, n. 3, p. 469-481, 2009.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Ecological and genetic factors linked to contrasting genome dynamics in seed plants. **New Phytologist**, n. 194, p. 629-646, 2012.

LINDLEY, J. *Epidendrum* (Euepidendrum) *latilabrum*. **Edwards's Botanical Register**, v. 4, 1841.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 875-888, 2007.

- 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, n. 1, p. 20-34, 2014.
- MORAES, A. P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* × *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). **Ecology and evolution**, v. 3, n. 11, p. 3824-3837, 2013.
- MORAES, A. P.; KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; GOMES, S. S. L.; VICCINI, L. F.; BARROS, F.; FELIX, L. P.; GUERRA, M.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. **Plant Biology**, v. 19, n. 2, p. 298-308, 2017.
- PELLICER, J.; HIDALGO, O.; DODSWORTH, S.; LEITCH, I. J. Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 88-101, 2018.
- PESSOA, E.; FELIX, L. P.; ALVES, M. A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. **Brittonia**, v. 66, n. 4, p. 347-352, 2014.
- PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, p. 165-177, 2009.
- PRANČL, J.; KAPLAN, Z.; TRÁVNÍČEK, P.; JAROLÍMOVÁ, V. Genome size as a key to evolutionary complex aquatic plants: polyploidy and hybridization in *Callitriche* (Plantaginaceae). **Plos One**, v. 9, n. 9, p. e105997, 2014.
- SALDAÑA, L. M. S.; HÁGSATER, E. Taxonomic study of *Epidendrum difforme* group (Orchidaceae). In: PEREIRA, C. E. B. (ed.) **Proceedings of the 15th World Orchid Conference**. Naturalia Publications, Rio de Janeiro, 1996, p. 235-244.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.

SILJAK-YAKOVLEV, S.; GODELLE, B.; ZOLDOS, V.; VALLÈS, J.; GARNATJE, T.; HIDALGO, O. Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: a case study in *Reichardia* genus. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. e0182318, 2017.

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

SOUZA, G.; COSTA, L.; GUIGNARD, M. S.; VAN-LUME, B.; PELICCIER, J.; GAGNON, E.; LEITCH, I. J.; LEWIS, G. P. Do tropical plants have smaller genomes? Correlation between genome size and climatic variables in the Caesalpinia Group (Caesalpinioideae, Leguminosae). **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 38, p. 13-23, 2019.

ŠTUBŇOVÁ, E.; HODÁLOVÁ, I.; KUČERA, J.; MÁRTONFIOVÁ, L.; SVITOK, M.; SLOVÁK, M. Karyological patterns in the European endemic genus *Soldanella* L.: absolute genome size variation uncorrelated with cytotype chromosome numbers. **American Journal of Botany**, v. 104, n.8, p. 1241-1253, 2017.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. (ed.) **Orchid biology: reviews and Perspectives III**. Ithaca, NY: Cornell University Press, pp. 324–410.

TRÁVNÍČEK, P.; JERSÁKOVÁ, J.; KUBÁTOVÁ, B.; KREJČÍKOVÁ, J.; BATEMAN, R. M.; LUČANOVÁ, M.; KRAJNÍKOVÁ, E.; TĚŠITELOVÁ, T.; STÍPKOVÁ, Z.; AMARDEILH, J.; BRZOSKO, E.; JERMAKOWICZ, E.; CABANNE, O.; DURKA, W.; EFIMOV, P.; HEDRÉN, M.; HERMOSILLA, C. E.; KREUTZ, K.; KULL, T.; TALI, K.; MARCHAND, O.; REY, M.; SCHIESTL, F. P.; CURN, V.; SUDA, J. Minority cytotypes in European populations of the *Gymnadenia conopsea* complex (Orchidaceae) greatly increase intraspecific and intrapopulation diversity. **Annals of Botany**, v. 110, n. 5, p. 977-986, 2012.

TRÁVNÍČEK, P.; PONERT, J.; URFUS, T.; JERSÁKOVÁ, J.; VRÁNA, J.; HŘIBOVÁ, 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**, v. 87, n. 10, p. 958-966, 2015.

VAN-LUME, B.; SOUZA, G. Cytomolecular analysis of species in the Peltophorum clade (Caesalpinioideae, Leguminosae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 385-392, 2018.

VEGA, A. J.; DEMATTEIS, M. DNA content in species of *Vernonia* and *Vernonanthura* from South America: an approach to systematics and evolution of the Vernonieae (Asteraceae). **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 151, n. 1, p. 131-138, 2017.

VRÁNA, J.; CÁPAL, P.; BEDNÁŘOVÁ, M.; DOLEŽEL, J. Flow cytometry in plant research: a success story. In: NICK, P.; OPATRŇÝ, Z. (eds.). **Applied Plant Cell Biology**. Plant Cell Monographs 22, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2014. pp. 395-430.

Capítulo III

Discutindo grupos infragênicos de *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae) com base em números cromossômicos e distribuição de heterocromatina

Discutindo grupos infragenéricos de *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae) com base em números cromossômicos e distribuição de heterocromatina

Joel M. P. Cordeiro¹, Felipe Nollet², Erton Mendonça de Almeida³, Eric Hágsater⁴,
Mark W. Chase⁵, Leonardo P. Felix¹

Resumo

O gênero *Epidendrum* L. (Laeliinae, Orchidaceae) abrange cerca de 1.800 espécies distribuídas pelas regiões neotropicais. A classificação infragenérica mais aceita atualmente divide o gênero em cerca de 80 grupos informais com base em combinações de caracteres morfológicos. Entretanto, suas espécies apresentam alto grau de variação morfológica, interações ecológicas e diversidade no número cromossômico, o que, por vezes, dificulta a organização taxonômica no gênero. O presente trabalho tem como objetivo descrever o número cromossômico e a distribuição de regiões heterocromáticas com o uso dos fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4'6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) em espécies de distintos grupos infragenéricos de *Epidendrum*. Foram analisadas 47 espécies pertencentes a 20 diferentes grupos infragenéricos. Novos registros foram apresentados para 14 espécies e novos citótipos foram descritos para quatro espécies. A maioria dos grupos apresentou espécies com $2n = 40$ e regiões heterocromáticas ricas em pares de bases GC (CMA⁺/DAPI). Entretanto, no grupo *Schistochilum* quase todas as espécies apresentaram $2n \neq 40$, além da comum ocorrência de regiões ricas em AT (DAPI⁺/CMA⁻). O número básico ancestral $x = 20$ é confirmado para *Epidendrum*. As variações no número cromossômico aliadas à distribuição de heterocromatina parecem seguir um padrão específico para a maioria dos grupos analisados. Fatores ecológicos como hábito e hábitat das plantas podem também estar correlacionados com a distribuição de bandas CMA/DAPI, embora estas hipóteses mereçam estudos mais detalhados.

Palavras-chave: Citotaxonomia, CMA/DAPI, Epidendroideae, Variação cariotípica.

Introdução

O gênero *Epidendrum* L. é representado por aproximadamente 1.800 espécies que aparecem distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos, toda a América Central até o norte da Argentina (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO et al., 2009; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a). O gênero ocorre em uma extensa variedade de habitats, como florestas úmidas e áreas ciliares, *tepuys*, vegetações sobre dunas e afloramentos rochosos em regiões semiáridas (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013). Suas espécies apresentam ampla variação

¹ Universidade Federal da Paraíba

² Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ Universidade Federal de Pernambuco

⁴ Herbário AMO, México

⁵ Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido

morfológica inter e intraespecífica, especialmente em relação ao hábito (epífita, terrestre, rupícola) e cor, tamanho e morfologia das flores (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013; NÓBREGA et al., 2017). Economicamente, diversas espécies apresentam considerável valor ornamental e outras, como *E. secundum* Jacq., podem ser usadas em cruzamentos para geração de híbridos artificiais (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005).

Análises filogenéticas em Laeliinae demonstram que *Epidendrum* é monofilético e relacionado aos gêneros *Barkeria* Knowles & Westc., *Caularthron* Raf., *Myrmecophila* Rolfe, e *Orleanesia* Barb. Rodr. (van den BERG et al., 2009; FREUDENSTEIN & CHASE, 2015). No nível infragenérico, determinadas classificações em *Epidendrum* foram propostas com base exclusivamente em caracteres morfológicos (LINDLEY, 1852-1859; PABST & DUNGS, 1975; BRIEGER, 1976-1977; DRESSLER, 1984). Contudo, são difíceis de serem interpretadas em decorrência da ampla variação dos caracteres morfológicos nos grupos e por não serem correlacionados com bases filogenéticas do gênero (HÁGSATER, 1985; HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005). Hágsater (1985) propôs classificar o gênero *Epidendrum* conforme as afinidades morfológicas das espécies, sendo descritos 40 grupos informais. Análises filogenéticas preliminares confirmam o monofiletismo da maioria destes grupos (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO et al., 2009; CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018), além de apontar uma correlação entre distribuição geográfica e ecologia das espécies. Nos últimos anos estes grupos têm sido atualizados e ampliados conforme novas espécies têm sido descritas (HÁGSATER & SALDAÑA, 2013, 2015, 2016; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a,b), compondo atualmente mais de 80 grupos.

Na citogenética, *Epidendrum* apresenta diferentes registros de números cromossômicos que podem variar entre $2n = 24$ (*E. fulgens* Brongn., ASSIS et al., 2013; MORAES et al., 2013) a $2n = 240$ (*E. cinnabarinum* Salzm., FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013), mas com predomínio de $2n = 40$ em cerca de 65% das espécies registradas (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Além das variações interespecíficas, observa-se ainda que determinadas espécies apresentam ampla variação intraespecífica, conforme verificado em *E. secundum* ($2n = 28, 30, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 68, 80$ e 84 ; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013), *E. radicans* Pav. ex Lindl. ($2n = 40, 60, 62, 64$ e 70 ; TANAKA &

KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009) e *E. ibaguense* Kunth ($2n = 58, 70, 72$ e 76 ; PINHEIRO et al., 2009; NÓBREGA et al., 2017). As variações numéricas ocorrentes em *Epidendrum* são marcadas especialmente por eventos de dispoloidia e poliploidia ao longo da evolução do gênero (FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Além disso, parte das variações cromossômicas em *Epidendrum* pode ser decorrente de hibridizações, tendo em vista que muitas espécies ocorrem em zonas simpátricas, apresentam baixas barreiras reprodutivas e compartilham os mesmos agentes polinizadores (PINHEIRO et al., 2009; ASSIS et al., 2013; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013; MORAES et al., 2013; MARQUES et al., 2014).

Nos eucariotos, a heterocromatina aparece como uma porção do genoma formada por sequências diversas, tais como elementos transponíveis, sequências repetidas em tandem e DNA satélite (LIPPMAN et al., 2004; LAMB et al., 2007; ALLSHIRE & MADHANI, 2017). Embora apresente baixa composição de genes, sua função está relacionada à regulação da expressão gênica e proteção da integridade dos cromossomos (GREWAL & MOAZED, 2003; MEHROTRA & GOYAL, 2014; ALLSHIRE & MADHANI, 2017). Diferentes métodos de análises cariotípicas permitem que a heterocromatina se apresente com coloração diferenciada em relação às regiões eucromáticas, a qual geralmente varia em número, tamanho e localização nos cromossomos (HENNIG, 1999; BENNETZEN, 2000; GUERRA, 2000). Esta variabilidade da heterocromatina é bastante empregada na diferenciação citotaxonômica, especialmente em grupos que apresentam número, tamanho e morfologia dos cromossomos estáveis (CARVALHO et al., 2005; CORDEIRO et al., 2017; MARINHO et al., 2018; MARTINS et al., 2018). Estudos citogenéticos em *Epidendrum* envolvendo a distribuição de heterocromatina são poucos discutidos (apenas 0,13% das espécies; ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013; PESSOA et al., 2014). Mesmo assim, a análise do padrão de heterocromatina demonstrou-se importante para discussão de hipóteses envolvendo híbridos naturais (ASSIS, 2013; MORAES et al., 2013), descrições de novas espécies (PESSOA et al., 2014) e diferenciação citotaxonômica em espécies de distintos grupos infragenéricos (ASSIS, 2013).

A presente pesquisa teve como objetivo discutir a classificação infragenérica de *Epidendrum* (conforme proposta de HÁGSATER, 1985) com base em números cromossômicos e distribuição de heterocromatina com o uso dos fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4'-diaminidino-2-fenilindol (DAPI). O presente estudo discute as seguintes questões: a) As variações de número cromossômico em

Epidendrum são distribuídas aleatoriamente entre os grupos? b) A distribuição de heterocromatina (bandas CMA/DAPI) apresenta um padrão específico para cada grupo em *Epidendrum*? c) As informações de número cromossômico e padrão de heterocromatina podem ser correlacionadas com fatores ecológicos em *Epidendrum*?

Material e Métodos

Amostragem

Para descrição do número cromossômico e distribuição de heterocromatina foram analisadas 47 espécies distribuídas em 20 grupos infragenéricos de *Epidendrum* (Tabela 1, Figura 1). Vouchers foram depositados no herbário EAN. As espécies foram cultivadas no jardim experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Entre um a cinco indivíduos de cada espécie foram analisados. Quando as raízes das plantas alcançavam aproximadamente 2 cm de comprimento, as mesmas eram extraídas e analisadas (3-8 raízes por indivíduo).

Análise citogenética

Pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2 mM a 10°C por 24 horas, fixadas em etanol absoluto/ácido acético glacial (3:1, v/v) por 2 horas e estocadas em freezer a -20°C. Para o preparo das lâminas as raízes foram digeridas em solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) (w/v) a 37°C por 60 minutos. O material foi esmagado em ácido acético 60% e congelado em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. Para a seleção das melhores lâminas, estas foram coradas com uma solução DAPI (2µg/mL):glicerol (1:1, v/v) e analisadas ao microscópio de fluorescência. Subsequentemente, as lâminas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 minutos e mantidas em etanol absoluto a temperatura ambiente por duas horas (GUERRA & SOUZA, 2002).

Tabela 1. Lista de espécies de *Epidendrum* analisadas, distribuídas em seus respectivos grupos infragenéricos e suas principais características conforme Hágsater (1985), Hágsater e Saldaña (2013, 2015, 2016) e Hágsater e Santiago (2018a,b).

Grupos infragenéricos	Principais características	Espécies analisadas
Alpiculum	Ramos simples, caniculados, 1-2 brácteas espatáceas na base da inflorescência; inflorescência do tipo "rabo de rapoza" com flores pequenas de labelo carnudo; lobo médio do labelo triangular; clinândrio proeminente, inteiro e emarginado	<i>E. armeniacum</i> Lindl.
Amblostoma	Hábito cespitoso, com caules fusiformes; inflorescência geralmente grande, em panícula apical, com flores amarela-esverdeada a branca; ovário e sépalas geralmente de dorso pubescentes e labelo 3-lobado	<i>E. tridactylum</i> Lindl.
Amblostomioides	Hábito cespitoso, com caules um pouco fusiformes; inflorescência paniculada, com flores geralmente rosadas; ovário ou flores frequentemente pubescentes e labelo 3-lobado	<i>E. rondoniense</i> L.C.Menezes
Aquaticum	Hábito monopodial, ramificado; inflorescência ereta com flores carnudas, com disco do labelo ou nectário frequentemente piloso	<i>E. alsum</i> Ridl. Ex Oliv.
Campestre	Plantas com pseudobulbo periforme e afunilado, com folhas apicais rígidas; inflorescência apical racemosa; flores de labelo trilobado	<i>E. campestre</i> Lindl.

Coilostylis	Plantas simpodiais, caespitosas, com caule formando um pseudobulbo fusiforme; inflorescência apical, racemosa, distica, com pedúnculo coberto por grandes brácteas (mas não brácteas espatáceas); flores grandes, em forma de estrela, com sépalas e pétalas longas e estreitas	<i>E. ciliare</i> L <i>E. purpurascens</i> Focke <i>E. viviparum</i> Lindl.
Compressum	Caule dilatado e comprimido em direção ao ápice; inflorescências grande, paniculada, com flores espaçadas; labelo carnoso, de lobo médio triangular	<i>E. compressum</i> Griseb.
Coronatum	Plantas relativamente grandes, com caules que carregam muitas folhas e florescem em uma inflorescência racemosa apical, sem brácteas espatáceas; grandes flores cerosas; labelo 3-lobado apresentando bicalosidade na base	<i>E. warasii</i> Pabst
Difforme	Plantas de hábito cespitoso, simpodial, de ramos carnudos; inflorescência corimbosa ou com flores solitárias; flores verdes a amarelo-esverdeadas, com presença do clinândrio eroso, denticulado ou franjado	<i>E. althausenii</i> A.D.Hawkes <i>E. amapaense</i> Hágsater & L.Sánchez <i>E. anatipedium</i> L.M.Sánchez & Hágsater <i>E. campaccii</i> Hágsater & L. Sánchez <i>E. garciae</i> Pabst <i>E. latilabre</i> Lindl. <i>E. aff. latilabre</i> <i>E. pessoae</i> Hágsater & L.Sánchez <i>E. pseudodiforme</i> Hoehne & Schltr. <i>E. sanchezii</i> E.Pessoa & L.P.Felix

Incomptum	Ramos com sucessivos crescimentos laterais produzidos a partir da metade dos ramos anteriores; inflorescência apical curta, com flores carnosas, esverdeadas a verde-violeta, com ovários curtos e labelo inteiro a 3-lobado	<i>E. obergii</i> Hawkes <i>E. proligerum</i> Barb. Rodr.
Lanium	Plantas rizomatosas, com ramos do tipo caniculado ou com pseudobulbos que geralmente se agregam em direção ao ápice; flores não ressupinadas, mais ou menos pubescentes	<i>E. avicula</i> Lindl.
Loefgrenii	Plantas cespitosas, simpodiais; inflorescência terminal subumbeliforme subtendida por brácteas proeminentes, largas, truncadas, espatáceas; ovário com nectário inflado que forma uma vesícula.	<i>E. vesicatum</i> Lindl.
Nanodes	Plantas cespitosas, simpodiais, rastejantes, com ramos curtos, completamente envolvidos pela base de folhas não-articuladas, carnudas e imbricadas; inflorescência séssil, com poucas flores	<i>E. longirepens</i> (C.Schweinf.) C.Schweinf. <i>E. uleinanodes</i> Hágsater
Nocturnum	Ramos caniculados; inflorescência com flores sucessivas de racemos curtos, sem espata, flores em forma de estrela, com pétalas e sépalas longas e estreitas, de cores brancas e fragrantas à noite	<i>E. bahiense</i> Rchb.f. <i>E. carpophorum</i> Barb. Rodr. <i>E. minus</i> (Cogn.) Hágsater <i>E. nocturnum</i> Jacq. <i>E. aff. nocturnum</i> <i>E. tumuc-humaciense</i> (Veyret) Carnevali & G.A.Romero
Pseudepidendrum	Hábito cespitoso, ramos do tipo caniculado; inflorescência apical paniculada,	<i>E. paniculatum</i> Ruiz & Pav.

	formada por flores com pétalas filiformes; labelo 3-lobado com lobo apical frequentemente bifurcado; polínias do tipo "asa de pássaro"	
Ramosum	Ramos repentes a eretos, ramificados; inflorescência distíca e labelo com um único calo	<i>E. paranaense</i> Barb.Rodr. <i>E. ramosum</i> Jacq. <i>E. strobiliferum</i> Rchb.f.
Schistochilum = Amphyglottis	Hábito cespitoso; numerosas folhas coriáceas; pedúnculo alongado e inflorescência pluriracemosa; flores de cores vivas, geralmente polinizadas por beija-flores; caudículos do polinário granuloso.	<i>E. cinnabarinum</i> Salzm <i>E. ibaguense</i> Kunth <i>E. flammeum</i> E. Pessoa & M. Alves <i>E. holstii</i> Hágsater & Carnevali <i>E. macrocarpum</i> Rich. <i>E. secundum</i> Jacq. <i>E. xanthinum</i> Lindl.
Setiferum	Ramos eretos, cilíndricos, tipo canaliculado, ligeiramente comprimido em direção ao ápice; inflorescência terminal ereta, densa, com flores esverdeadas; labelo inteiro a levemente trilobado	<i>E. martianum</i> Lindl.
Smaragdinum	Hábito cespitoso, simpodial; caule transportando muitas folhas das quais a superfície é parecida com pergaminho quando seca; raque espessa, carregando pequenas flores sucessivas, basicamente verdes	<i>E. smaragdinum</i> Lindl. <i>E. orchidiflorum</i> (Salzm.) Lindl.
Spathiger	Hábito simpodial, folhas coriáceas; inflorescência racemosa e distíca, com flores carnosas verdes a arroxeadas	<i>E. rigidum</i> Jacq.

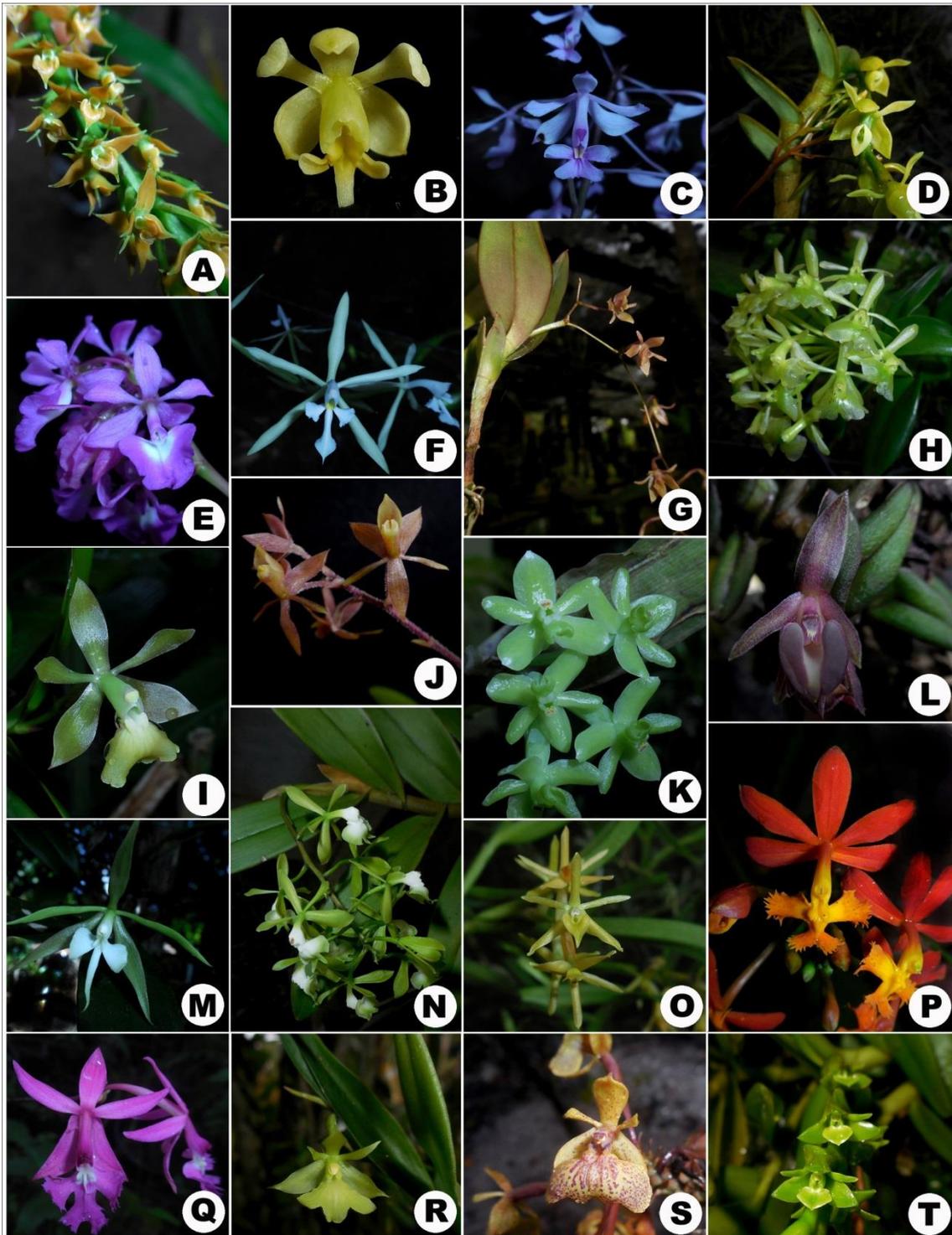


Figura 1. Espécies de distintos grupos infragenéricos de *Epidendrum* (Orchidaceae). A. *E. armeniacum* (Grupo Alpicolum); B. *E. tridactylum* (Grupo Amblostoma); C. *E. rondoniense* (Grupo Amblostomioides); D. *E. alsum* (Grupo Aquaticum); E. *E. campestre* (Grupo Campestre); F. *E. viviparum* (Grupo Coilostylis); G. *E. compressum* (Grupo Compressum); H. *E. campaccii* (Grupo Difforme); I. *E. obergii* (Grupo Incomptum); J. *E. avicola* (Grupo Lanium); K. *E. vesicatum* (Grupo Loeffgrenii); L. *E. uleinanodes* (Grupo Nanodes); M. *E. nocturnum* (Grupo Nocturnum); N. *E. paniculatum* (Grupo Pseudepidendrum); O. *E. ramosum* (Grupo Ramosum); P. *E. flammeum* e Q. *E. ibaguense* (Grupo Schistochilum); R. *E. smaragdinum* e S. *E. orchodiflorum* (Grupo Smaragdinum); S. *E. rigidum* (Grupo Spathiger).

Para a coloração com os fluorocromos CMA/DAPI as lâminas foram envelhecidas por três dias a temperatura ambiente e posteriormente coradas por uma hora com 10µL de CMA (0,1 mg/ml) e depois com 10µL de DAPI (1µg/ml) por meia hora, montadas em glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v) e estocadas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos (GUERRA & SOUZA, 2002).

As metáfases foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision[®] v.4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). As imagens foram editadas (sobreposição e otimização de brilho e contraste) com o uso do software Adobe Photoshop CS3 Extended Version 10.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA).

Resultados e Discussão

Número cromossômico e distribuição de heterocromatina em distintos grupos infragenéricos de Epidendrum

O número cromossômico em *Epidendrum* variou de $2n = 28$ em *E. xanthinum* Lindl. a $2n = 220$ em *E. cinnabarinum* Salzm, mas com predomínio de $2n = 40$ na maioria das espécies analisadas (64,7%) (Tabela 2, Figura 2-6). Poliploidia foi observada em *E. cinnabarinum* ($2n = 220$), *E. orchidiflorum* (Salzm.) Lindl. ($2n = 114$, ca. 190), *E. tumuc-humaciense* (Veyret) Carnevali & G.A.Romero ($2n = 120$), e *E. viviparum* Lindl., *E. bahiense* Rchb.f., *E. carpophorum* Barb. Rodr., *E. minus* (Cogn.) Hágsater, *E. nocturnum* Jacq. e *E. martianum* Lindl., estes com $2n = 80$. Variações intraespecíficas foram registradas em *E. viviparum* ($2n = 40, 80$), *E. orchidiflorum* ($2n = 120$, ca.190) e *E. secundum* ($2n = 28, 56, 58$).

Novos registros cromossômicos foram descritos para 14 espécies de *Epidendrum*, enquanto novos citótipos foram descritos para *E. orchidiflorum* [$2n = 114$ e ca. 190; diferente de $2n = 112$ (ASSIS et al., 2013) e $2n =$ ca. 120 (ASSIS, 2013)], *E. viviparum* [$2n = 80$; diferente de $2n = 40$ (ASSIS et al., 2013)], *E. strobiliferum* Rchb.f. [$2n = 40$; diferente de $2n = 24$ (TANAKA & KAMEMOTO, 1984)] e *E. cinnabarinum* [$2n = 220$; diferente de $2n = 240$ (FELIX & GUERRA, 2010) e $2n = 224$ (ASSIS, 2013)] (Tabela 2). As demais espécies confirmaram registros prévios descritos na literatura (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013).

Tabela 2. Espécies de *Epidendrum* analisadas e seus respectivos Vouchers, Hábito/Habitat e principais informações citológicas. A classificação das espécies em seus grupos foi estabelecida conforme Hágsater (1985) e atualizadas segundo Hágsater & Saldaña (2013, 2015, 2016) e Hágsater & Santiago (2018a,b). Sigla dos Vouchers: LPF (Leonardo Pessoa Felix), JMPC (Joel Maciel Pereira Cordeiro), EMA (Erton Mendonça de Almeida), EP (Edlley Pessoa), IBT (Instituto de Botânica de São Paulo), SN (Sarah Nascimento), JPC (Juliana Pereira Castro). Abreviações na distribuição de heterocromatina: Pr (Proximal), Ter (Terminal).

Grupo / Espécie	Voucher	Hábito e Habitat	2n	Distribuição de heterocromatina	Figuras
Grupo Alpicolum					
<i>E. armeniacum</i>	LPF - 15112A	Epífita / Mata úmida	40	1 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1A, 2A
Grupo Amblostoma					
<i>E. tridactylum</i>	EMA-1662	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 10 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1B, 2B
Grupo Amblostomioides					
<i>E. rondoniense</i> *	LPF - 16470	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 2 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1C, 2C
Grupo Aquaticum					
<i>E. alsum</i> *	JMPC - 1101	Terrestre, rupícola / Áreas rochosas	40	2 Ter CMA ⁰ /DAPI ⁻ ; 38 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁰	1D, 2D
Grupo Campestre					
<i>E. campestre</i> *	JMPC - 1149	Terrestre, rupícola / Áreas rochosas	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1E, 2E
Grupo Coilostylis					
<i>E. ciliare</i>	JMPC - 447	Epífita / Dunas arenosas	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	2F

<i>E. purpurascens</i>	JMPC - 1116	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 36 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻ ; 2 Pr DAPI ⁺ /CMA ⁻	2G
<i>E. viviparum</i> ** (Manaus, Amazonas-BR)	JMPC - 1117	Epífita / Mata úmida	80	4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1F, 2H
<i>E. viviparum</i> (cultivado)	JMPC - 1402	Epífita / Mata úmida	40	2 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁰ ; 38 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻	2I
Grupo Compressum					
<i>E. compressum</i> *	LPF - 16306	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 2 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1G, 2J
Grupo Coronatum					
Subgrupo Mutelianum					
<i>E. warasii</i> *	LPF - 15459	Terrestre, rupícola / Áreas rochosas	40	1 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	2K
Grupo Difforme					
<i>E. althausenii</i>	JMPC - 1124	Epífita / Mata úmida	40	4 Ter + 11 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻ + 1 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻ heteromórfico	3A
<i>E. amapaense</i>	JMPC - 1329	Epífita / Mata úmida	40	12 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3B
<i>E. anatipedium</i>	EMA - 2079	Epífita / Mata úmida	40	10 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3C
<i>E. campaccii</i>	EMA - 1233	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 14 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1H, 3D
<i>E. garciae</i>	EP - 1146	Epífita / Mata úmida	40	8 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3E
<i>E. latilabre</i>	JMPC - 1084	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 10 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3F
<i>E. aff. latilabre</i>	LPF - 15264C	Epífita / Mata úmida	40	8 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻ + 1 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3G

				heteromórfico	
<i>E. pessoae</i>	LPF - 15998	Epífita / Mata úmida	40	16 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3H
<i>E. pseudodifforme</i>	JMPC - 1085	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 14 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3I
<i>E. sanchezii</i>	LPF - 15117	Epífita / Mata úmida	40	8 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3J
Grupo Incomptum					
Subgrupo Proligerum					
<i>E. oberгии*</i>	LPF - 15714	Epífita / Mata úmida	40	2 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 38 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻	1I, 3K
<i>E. proligerum</i>	LPF - 16537	Epífita / Mata úmida	40	8 Ter e Pr + 4 Ter DAPI ⁺ /CMA ⁻ ; 6 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	3L
Grupo Lanium					
<i>E. avicula</i>	LPF - 15917	Epífita / Mata úmida	40	12 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1J, 4A
Grupo Loefgrenii					
<i>E. vesicatum*</i>	LPF - 16574	Epífita / Mata úmida	40	14 Pr DAPI ⁺ /CMA ⁻	1K, 4B
Grupo Nanodes					
<i>E. longirepens*</i>	LPF - 16579	Epífita / Mata úmida	40	4 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 36 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻	4C
<i>E. uleinanodes*</i>	JMPC - 1121	Epífita / Mata úmida	40	40 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻	1L, 4D
Grupo Nocturnum					
<i>E. bahiense</i>	JMPC - 1125	Epífita / Mata úmida	80	2 Ter + 78 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	4E
<i>E. carpophorum</i>	EMA - 1453	Epífita / Mata úmida	80	4 Ter + 76 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	4F
<i>E. minus</i>	JMPC - 1123	Epífita / Mata úmida	80	2 Ter + ca.78 CMA ⁺ /DAPI ⁻ Pr	4G

<i>E. nocturnum</i>	EMA - 2182	Epífita / Mata úmida	80	4 Ter + ca.76 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1M, 4H
<i>E. aff. nocturnum</i>	LPF - 16457	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 38 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	4I
<i>E. tumuc-humaciense</i>	LPF - 16247	Terrestre, Rupícola / Áreas rochosas	120	6 Ter + ca.114 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	4J
Grupo Pseudepidendrum					
<i>E. paniculatum</i>	JMPC - 951	Epífita, Terrestre, Rupícola / Mata úmida, Áreas rochosas	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 8 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻ ; 8 Pr DAPI ⁺ /CMA ⁻	1N, 5A
Grupo Ramosum					
<i>E. paranaense</i> *	LPF - 17019	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter + 38 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	5B
<i>E. ramosum</i>	LPF - 14542	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1O, 5C
<i>E. strobiliferum</i> **	EMA - 2308	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 38 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁰	5D
Grupo Schistochilum = Amphyglottis					
Subgrupo Carinata					
<i>E. cinnabarinum</i> **	EMA - 756	Terrestre, Rupícola / Dunas arenosas, Inselbergs	220	20 Ter DAPI ⁺ /CMA ⁻ ; 4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	5F
<i>E. ibaguense</i>	LPF - 16235	Terrestre, rupícola /	76	8 Ter DAPI ⁺ /CMA ⁻ ; 4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1Q, 5E

Áreas rochosas					
Subgrupo Tuberculatum					
<i>E. flammeum</i>	SN - 93	Rupícola / Inselbergs	50	20 Ter DAPI ⁺ /CMA ⁻ ; 6 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1P, 5G
<i>E. holstii</i> *	JMPC - 1103	Terrestre, rupícola / Áreas rochosas	58	4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 6 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁰	5H
<i>E. macrocarpum</i> *	JMPC - 1462	Epífita / Mata úmida	40	4 Ter + 36 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻	5I
<i>E. secundum</i> Jacq. (Morro do Chapéu, Bahia, BR)	JPC - 114	Terrestre, Rupícola / Inselbergs	56	4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 6 Pr CMA ⁰ /DAPI ⁻	5J
<i>E. secundum</i> (Bolívia)	IBT - 18047	Terrestre, Rupícola / Áreas rochosas	28	4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 4 Ter DAPI ⁺ /CMA ⁻	6A
<i>E. secundum</i> (Cubatão, São Paulo, BR)	LPF - 16839	Epífita, terrestre, rupícola / Mata úmida, áreas rochosas	58	4 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	6B
<i>E. xanthinum</i>	IBT - 17671	Terrestre, rupícola / Mata úmida, áreas rochosas, inselbergs	28	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 4 Ter + 2 Pr DAPI ⁺ /CMA ⁻	6C
Grupo Setiferum					
<i>E. martianum</i> *	LPF - 15476A	Terrestre, rupícola / Áreas rochosas	80	2 Ter + 6 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻ ; 6 Ter DAPI ⁺ /CMA ⁻	6D

Grupo Smaragdinum

<i>E. smaragdinum</i> *	LPF - 16382	Epífita / Mata úmida	38	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1R, 6E
<i>E. orchidiflorum</i> ** (Tepequém, Roraima, BR)	LPF - 16276	Terrestre / Mata úmida, áreas rochosas	114	4 Ter + 4 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	1S, 6F
<i>E. orchidiflorum</i> (Santa Rita, Paraíba, BR)**	LPF - 16205	Terrestre / Mata úmida	ca.190	4 Ter + 6 Pr CMA ⁺ /DAPI ⁻	6G

Grupo Spathiger

Subgrupo Rigidum

<i>E. rigidum</i>	LPF - 15067	Epífita / Mata úmida	40	2 Ter CMA ⁺ /DAPI ⁻	1T, 6H
-------------------	-------------	----------------------	----	---	--------

* Primeira contagem cromossômica para a espécie

** Novo citótipo para a espécie

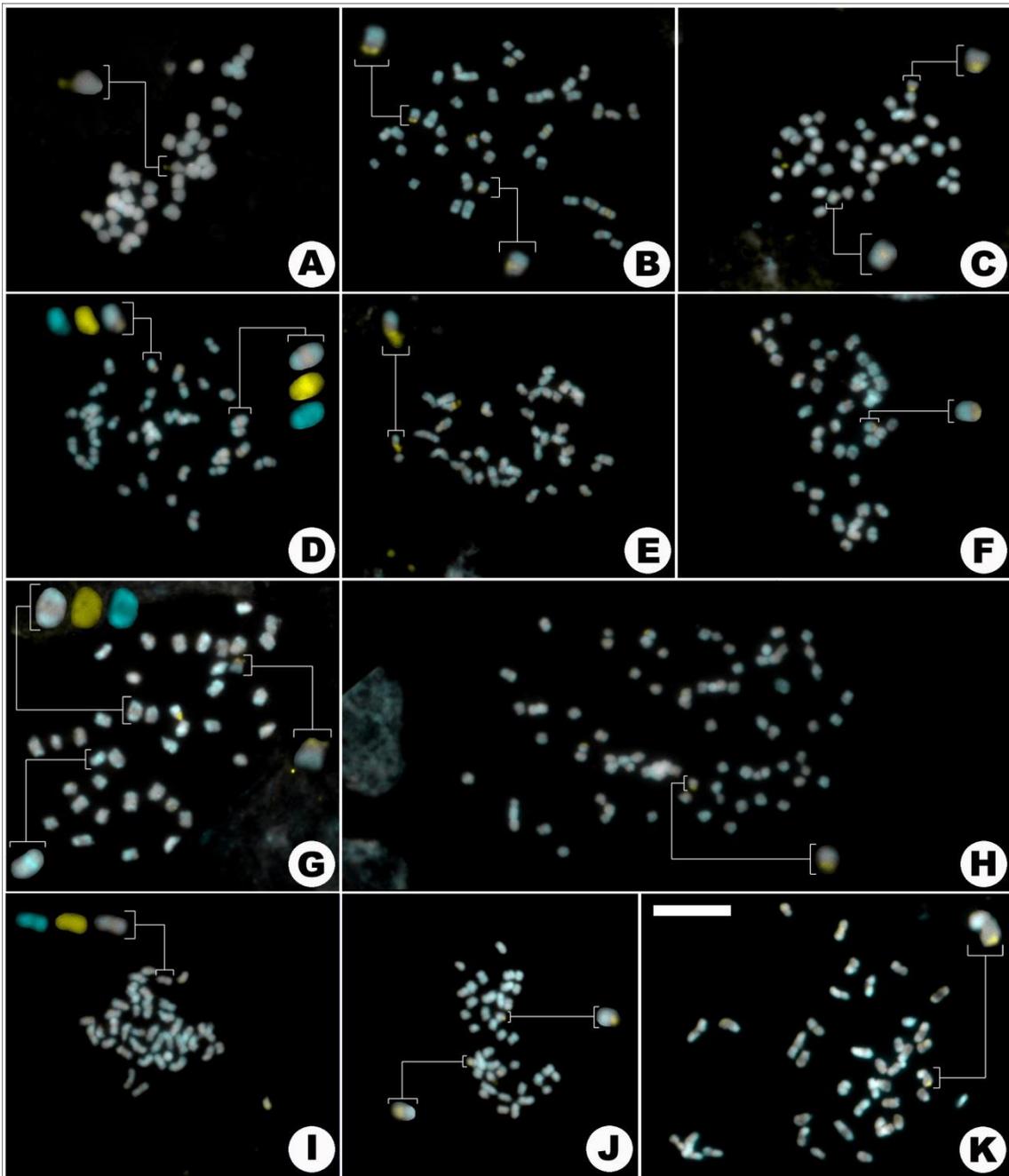


Figura 2. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae). A. Grupo Alpicolum: *E. armeniacum* ($2n = 40$); B. Grupo Amblostoma: *E. tridactylum* ($2n = 40$); C. Grupo Amblostomioides: *E. rondoniense* ($2n = 40$); D. Grupo Aquaticum: *E. alsum* ($2n = 40$); E. Grupo Campestre: *E. campestre* ($2n = 40$); F-I. Grupo Coilostylis: F. *E. ciliare* ($2n = 40$), G. *E. purpurascens* ($2n = 40$), H. *E. viviparum* ($2n = 80$), I. *E. viviparum* ($2n = 40$); J. Grupo Compressum: *E. compressum* ($2n = 40$); K. Grupo Coronatum: *E. warasii* ($2n = 40$). Insertos simples mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁺ e DAPI⁺. Insertos com sobreposições mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁰/DAPI⁻ (D, G, I) ou bandas CMA⁺/DAPI⁰ (D, I). Barra de escala em K corresponde à 10µm.

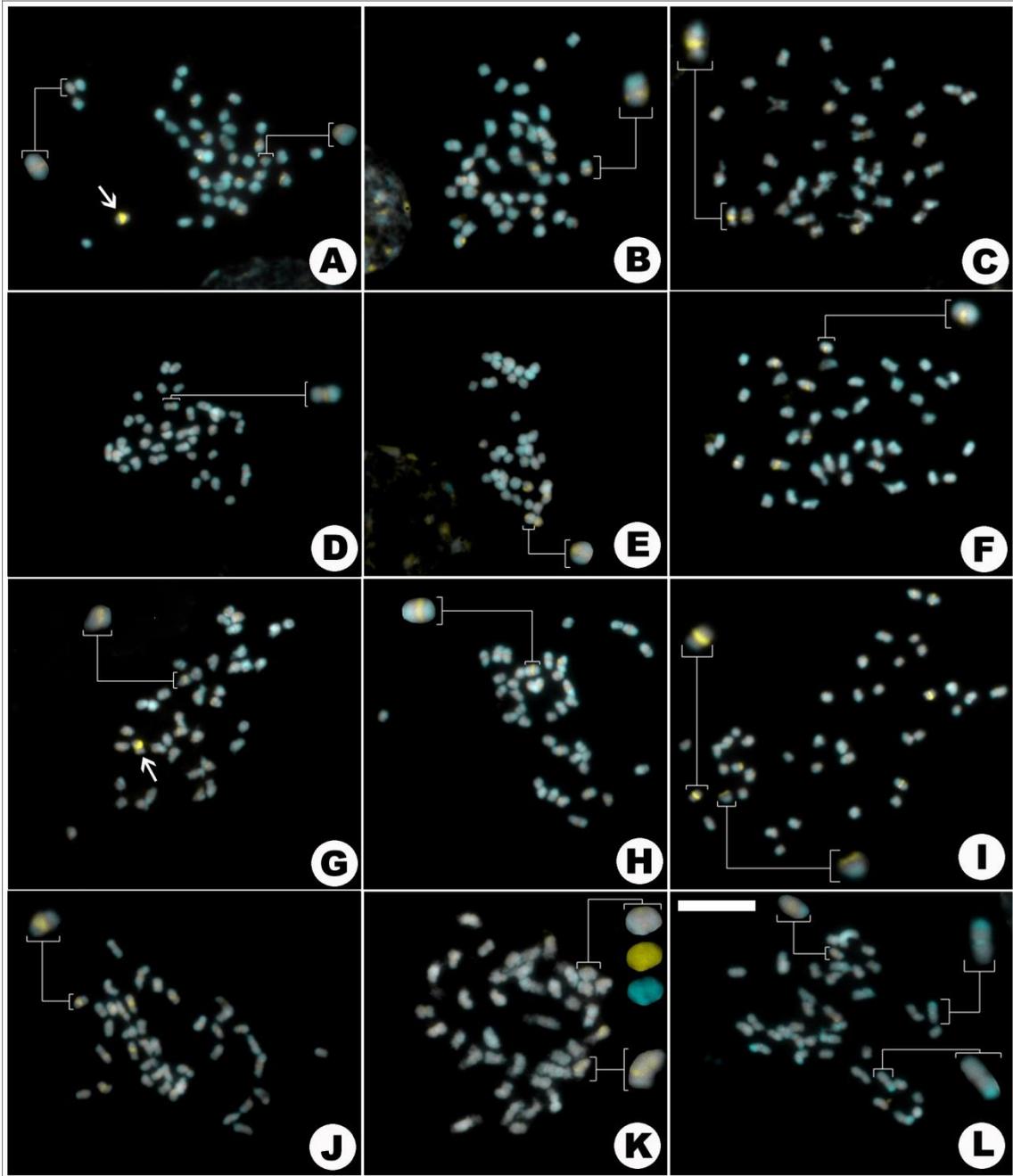


Figura 3. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae). A-J. Grupo Difforme: A. *E. althausenii* ($2n = 40$), B. *E. amapaense* ($2n = 40$), C. *E. anatipedium* ($2n = 40$), D. *E. campaccii* ($2n = 40$), E. *E. garciae* ($2n = 40$), F. *E. latilabre* ($2n = 40$), G. *E. aff. latilabre* ($2n = 40$), H. *E. pessoae* ($2n = 40$), I. *E. pseudodifforme* ($2n = 40$), J. *E. sanchezii* ($2n = 40$); K-L. Grupo Incomptum: K. *E. obergii* ($2n = 40$), L. *E. proligerum* ($2n = 40$). Insetos simples mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁺ e DAPI⁺. Insetos com sobreposições (K) mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁰/DAPI⁺. Setas em A e G indicam cromossomos heteromórficos. Barra de escala em L corresponde à 10 μ m.

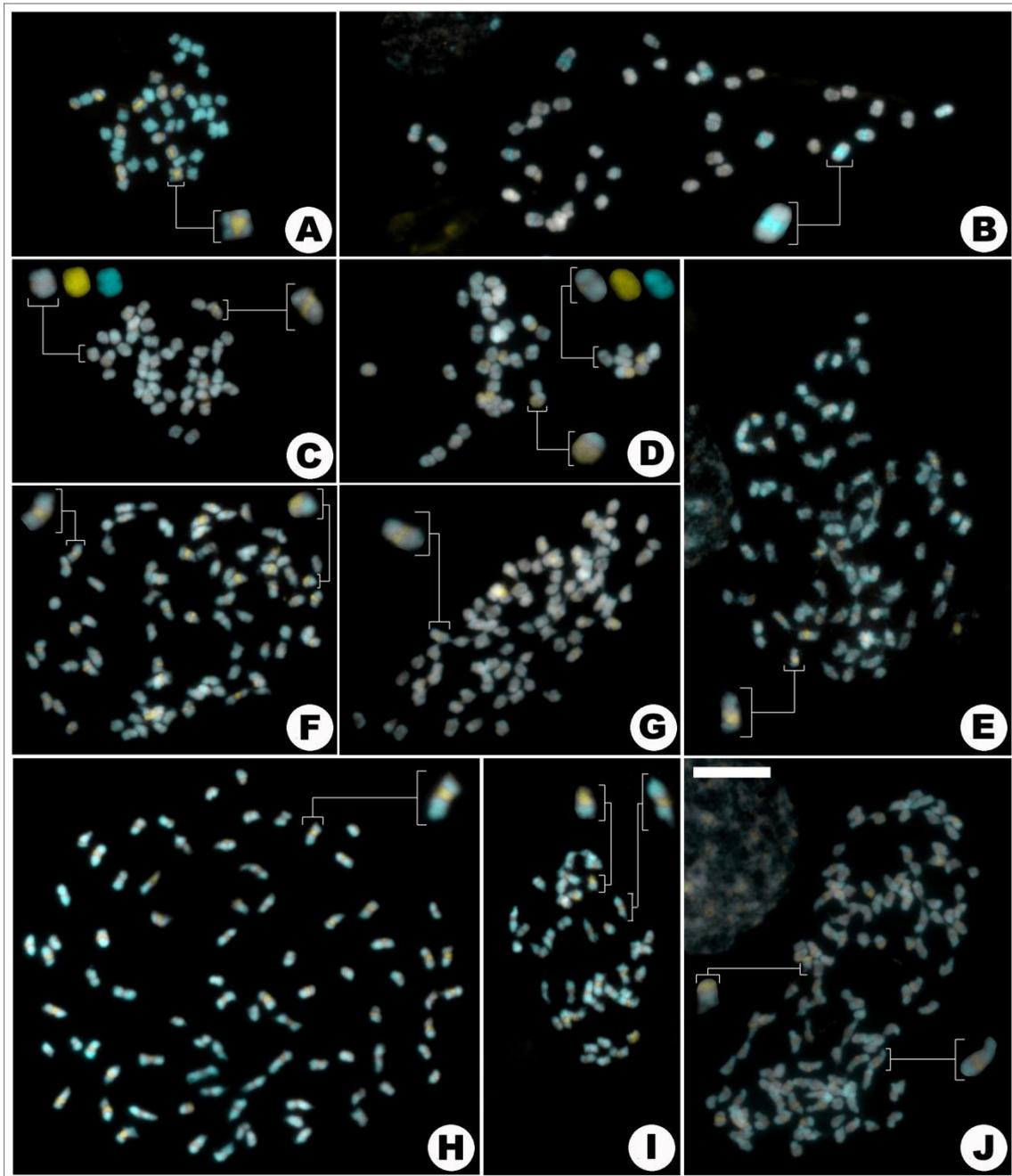


Figura 4. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae). A. Grupo Lanium: *E. avicula* ($2n = 40$); B. Grupo Loefgrenii: *E. vesicatum* ($2n = 40$); C-D. Grupo Nanodes: C. *E. longirepens* ($2n = 40$), D. *E. uleinanodes* ($2n = 40$); E-J. Grupo Nocturnum: E. *E. bahiense* ($2n = 80$), F. *E. carpophorum* ($2n = 80$), G. *E. minus* ($2n = 80$), H. *E. nocturnum* ($2n = 80$), I. *E. aff. nocturnum* ($2n = 40$), J. *E. tumuc-humaciense* ($2n = 120$). Insertos simples mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁺ e DAPI⁺. Insertos com sobreposições (C, D) mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁰/DAPI. Barra de escala em J corresponde à 10 μ m.

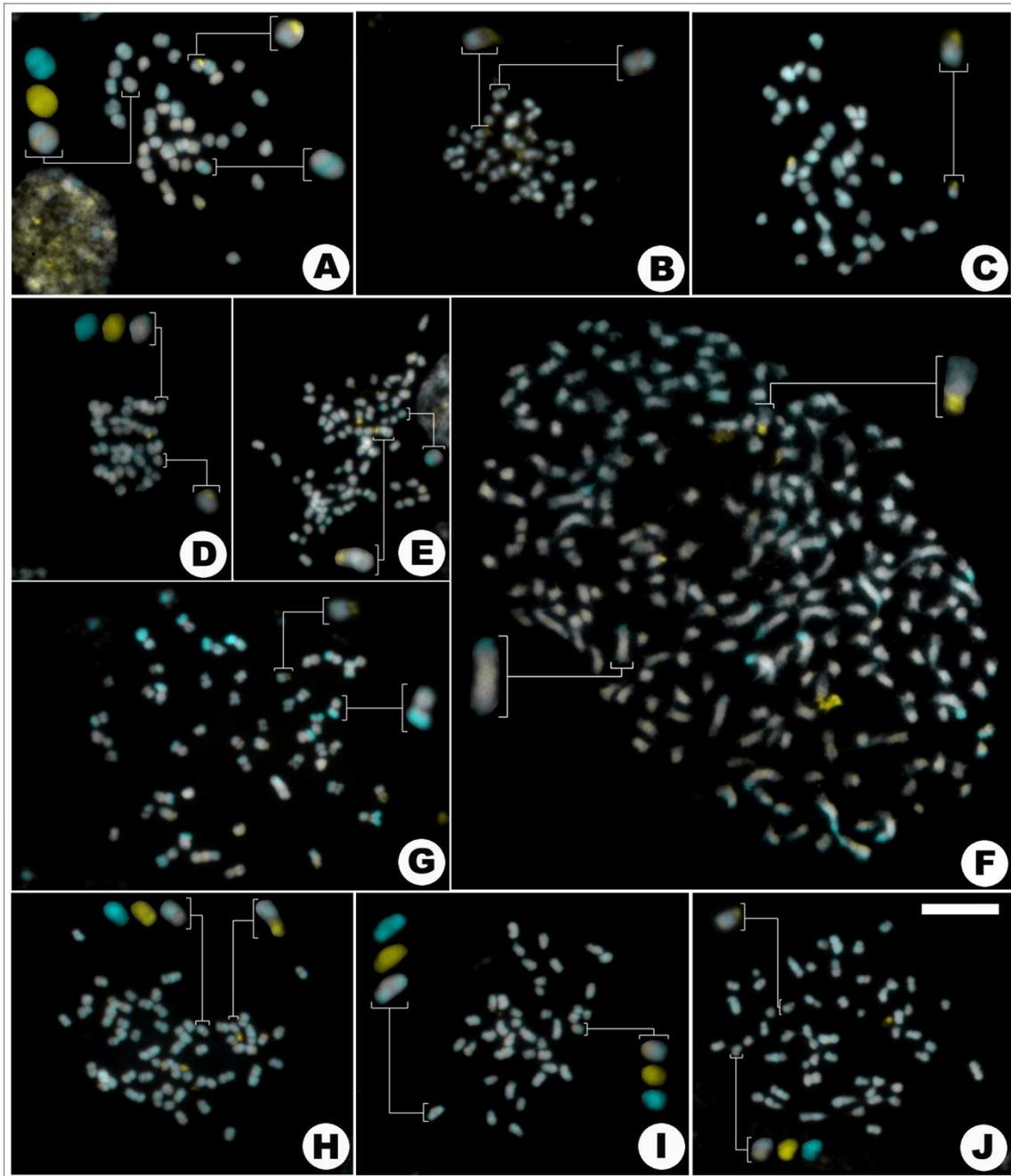


Figura 5. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae). A. Grupo Pseudepidendrum: *E. paniculatum* ($2n = 40$); B-D. Grupo Ramosum: B. *E. paranaense* ($2n = 40$), C. *E. ramosum* ($2n = 40$), D. *E. strobiliferum* ($2n = 40$); E-J. Grupo Schistochilum: E. *E. ibaguense* ($2n = 76$), F. *E. cinnabarinum* ($2n = 220$), G. *E. flammeum* ($2n = 50$), H. *E. holstii* ($2n = 58$), I. *E. macrocarpum* ($2n = 40$), J. *E. secundum* (Morro do Chapéu, Bahia, BR; $2n = 56$). Insertos simples mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁺ e DAPI⁺. Insertos com sobreposições mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁰/DAPI⁺ (A, I, J) ou CMA⁺/DAPI⁰ (D, H). Barra de escala em J corresponde à 10µm.

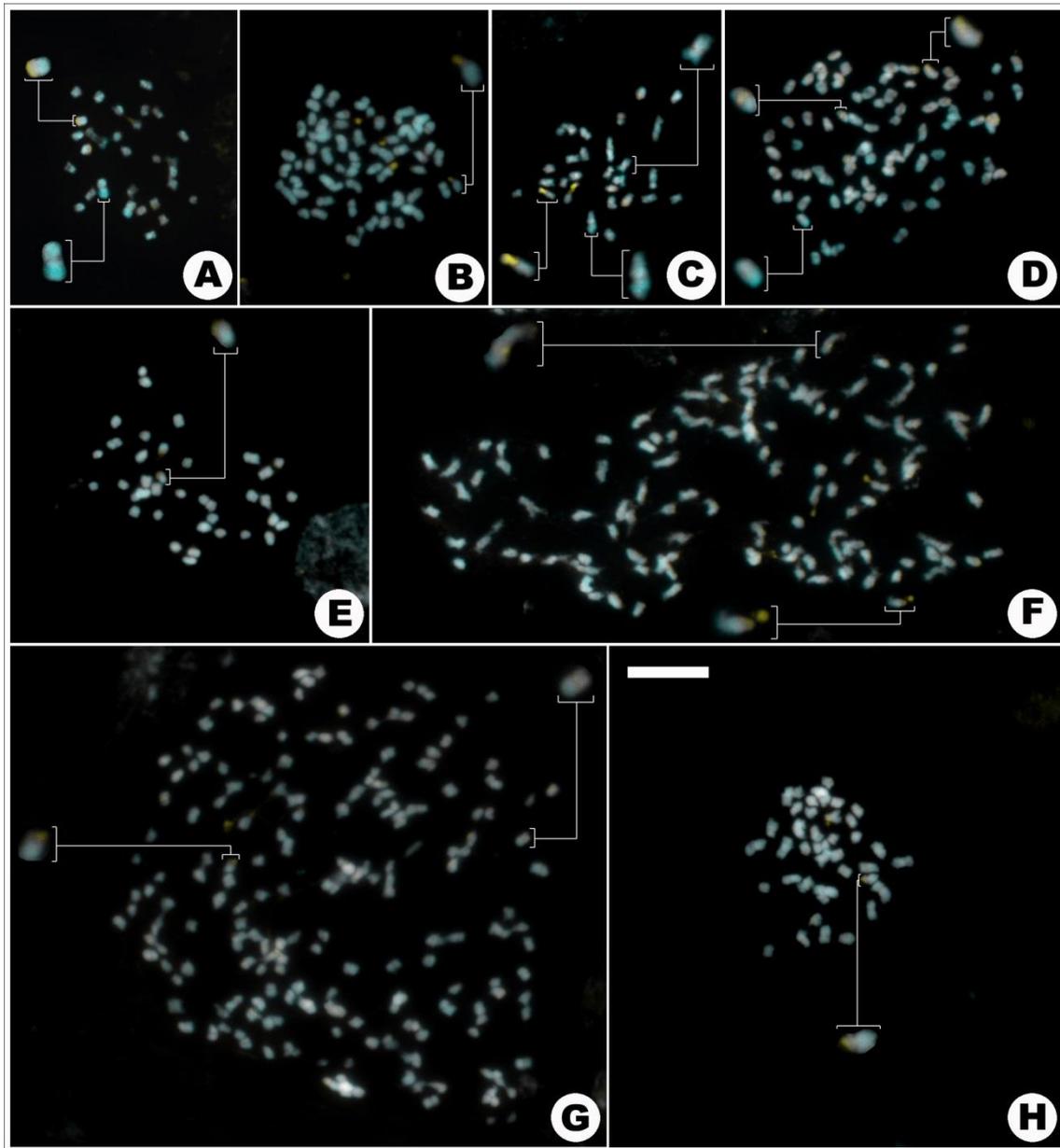


Figura 6. Metáfases mitóticas em *Epidendrum* (Orchidaceae). A-C. Grupo Schistochilum: A. *E. secundum* (Bolívia; $2n = 28$), B. *E. secundum* (Cubatão, São Paulo, BR; $2n = 58$), C. *E. xanthinum* ($2n = 28$); D. Grupo Setiferum: *E. martianum* ($2n = 80$); E-G. Grupo Smaragdinum: E. *E. smaragdinum* ($2n = 38$), F. *E. orchidiflorum* (Tepequém, Roraima, BR; $2n = 114$), G. *E. orchidiflorum* (Santa Rita, Paraíba, BR; $2n = \text{ca.}190$); H. Grupo Spathiger: *E. rigidum* ($2n = 40$). Insetos mostram exemplos de cromossomos com bandas CMA⁺ e DAPI⁺. Barra de escala em H corresponde à 10 μm .

O padrão de heterocromatina nas espécies foi marcado especialmente pela presença de regiões ricas em GC (CMA⁺/DAPI⁻) localizadas nas regiões terminais e proximais dos cromossomos. Embora em menor frequência, bandas heterocromáticas ricas em AT (DAPI⁺/CMA⁻) foram observados em 10 espécies. Algumas espécies (por exemplo, *E. alsum* Ridl. ex Oliv., *E. purpurascens* Focke, *E. obergii* Hawkes, *E.*

uleinanodes Hágsater e *E. holstii* Hágsater & Carnevali) exibiram regiões heterocromáticas de coloração pálida, estes classificados como bandas CMA⁰ ou DAPI⁰ (ver Material Suplementar S1).

O número cromossômico e a distribuição de regiões heterocromáticas das espécies apresentaram determinadas correlações entre os grupos de *Epidendrum* propostos por Hágsater (1985) e atualizados por Hágsater & Saldaña (2013, 2015, 2016) e Hágsater & Santiago (2018a,b) (ver Material Suplementar S2). O grupo *Schistochilum* (= *Amphyglottis*) diferiu dos demais grupos por apresentar ampla variação no número cromossômico ($2n = 28, 40, 50, 56, 58, 76, 220$), registros de dispoloidia e poliploidia, além de poucas espécies apresentarem $2n = 40$, o número cromossômico mais frequente no gênero *Epidendrum* (PINHEIRO et al., 2009; ASSIS et al., 2013). A composição de pares de base AT/GC, da mesma forma, também foi bastante variável, com bandas CMA⁺/DAPI⁻, DAPI⁺/CMA⁻, CMA⁺/DAPI⁰ ou CMA⁰/DAPI⁻. Em *Schistochilum* se encontram ainda os principais registros de híbridos naturais em *Epidendrum* (FERNÁNDEZ-CONCHA & RAMÍREZ-MORILLO, 2003; MORAES et al., 2013; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013; ASSIS, 2013), o que juntamente com a poliploidia, dispoloidia, hibridizações e introgressões podem ser responsáveis pela ampla variação no número cromossômico e distribuição de heterocromatina no grupo.

Para o grupo *Nocturnum* os números cromossômicos variaram desde $2n = 40$ em *E. aff. nocturnum*, $2n = 80$ em quatro espécies e $2n = 120$ em *E. tumuc-humaciense*, além de um número variável de heterocromatina CMA⁺/DAPI⁻ na região terminal (zero a seis bandas) e na região proximal da maioria dos cromossomos. O considerável registro de poliploidia para o grupo (5 das 6 espécies analisadas) indica que eventos de duplicação completa do genoma tiveram um importante papel na sua evolução e diversificação, podendo também estar correlacionados com cleistogamia, apomixia e sementes poliembriônicas (STORT & PAVANELLI, 1985, 1986; ver Capítulo 1). Há registros de pelo menos um híbrido natural descrito, *Epidendrum* × *dorotheae* P.H.Allen, supostamente oriundo do cruzamento entre *E. nocturnum* e *E. ciliare* (grupo *Coilostylis*) (HÁGSATER & SALDAÑA, 2008).

Outros três grupos também apresentaram ocorrência de poliploidia: *Smaragdinum*, *Setiferum* e *Coilostylis* (Tabela 2). No grupo *Smaragdinum*, o registro cromossômico de $2n = 38$ em *E. smaragdinum* Lindl. indica provável evento de dispoloidia na origem do grupo e $2n = 114$ e ca. 190 em *E. orchidiflorum* confirma uma série poliploide oriunda de $n = 19$ ($2n = 6x$ e $10x$, respectivamente). As regiões

heterocromáticas no grupo *Smaragdinum* foram pouco evidentes em *E. smaragdinum* (duas bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻) e formaram quatro bandas terminais e quatro a seis bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ em *E. orchidiflorum* (Figura 6E-G). O grupo *Coilostylis*, apesar de comumente apresentar $2n = 40$ em suas espécies (Figura 2F, G e I), pode também apresentar variação intraespecífica no nível de ploidia, conforme verificado em *E. viviparum* (Figura 2H-I) com registros de $2n = 40$ e 80, e *E. ciliare* com registros prévios também de $2n = 40$, 80 e 160 (TANAKA & KAMEMOTO, 1984). A heterocromatina é representada por 2-4 bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais em todas as espécies, mas com bandas adicionais variáveis em número e composição para algumas espécies, como 36-38 bandas pálidas proximais CMA⁰/DAPI⁻ em *E. viviparum* e duas bandas DAPI⁺/CMA⁻ proximais em *E. purpurascens*. *Epidendrum martianum* Lindl. (grupo *Setiferum*) também apresentou registro de poliploidia ($2n = 80$), mas com bandas heterocromáticas mais diversificadas: 2 terminais + 6 proximais CMA⁺/DAPI⁻ e 6 terminais DAPI⁺/CMA⁻ (Figura 6D). Pabst e Dungs (1975) sugeriram incluir *E. martianum* em *Amphiglottium* e, de fato, o padrão de heterocromatina para esta espécie se assemelha ao encontrado nas espécies deste grupo (comparar Figuras 6D × 5E-J, 6A-C; ver Material Suplementar S2). Todavia, caracteres morfológicos, como inflorescência pendente e labelo levemente trilobado com lobo médio arredondado, suportam a separação de *E. martianum* do grupo *Amphyglottis* (Eric Hágsater, comunicação pessoal).

As espécies dos demais grupos de *Epidendrum* apresentaram sempre $2n = 40$. Entretanto, alguns destes grupos apresentaram padrões de heterocromatina consideravelmente particulares. O grupo *Difforme* apresentou bandas CMA⁺/DAPI⁻ localizadas nas regiões terminais (0-4) ou proximais (8-16) (Figura 3A-J). O grupo *Difforme* recebeu maior atenção apenas nas décadas mais recentes e novas espécies constantemente vêm sendo descritas (HÁGSATER & SALDAÑA, 2013, 2015, 2016; PESSOA et al., 2014; HÁGSATER & SANTIAGO, 2018a). Nesta pesquisa, dois grupos de plantas morfológicamente distintas, mas classificadas como *E. latilabre* (*E. latilabre* e *E. aff. latilabre*) apresentaram padrões de bandas heterocromáticas distintas: *Epidendrum aff. latilabre* apresentou cromossomos com bandas heteromórficas ausentes em *E. latilabre*. A análise da distribuição de heterocromatina tem auxiliado na descrição de novas espécies do grupo, como *E. sanchezii* E.Pessoa & L.P.Felix (PESSOA et al., 2014). Da mesma forma, a variação morfológica e cariológica

observada em *E. latilabre* (e provavelmente outras espécies do grupo) merece ser melhor estudada para finalidades taxonômicas.

Entre os demais grupos que apresentaram padrões de heterocromatina consideravelmente distintos podem ser mencionados os grupos Loefgrenii, Lanium e Pseudepidendrum. O grupo Loefgrenii (*Epidendrum vesicatum* Lindl.), apresentou apenas regiões ricas em pares de base AT (DAPI⁺/CMA⁻) proximais (Figura 4B), enquanto o grupo Lanium (*E. avicula* Lindl.) apresentou 12 bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais bastante evidentes (Figura 4A). O grupo Pseudepidendrum apresentou em *E. paniculatum* Ruiz & Pav. blocos CMA⁺/DAPI⁻, CMA⁰/DAPI⁻ e DAPI⁺/CMA⁻ em distintos cromossomos (Figura 5A).

Regiões heterocromáticas do tipo CMA⁰/DAPI⁻ proximais foram encontradas especialmente no grupo Nanodes (Figura 4C-D). Além do grupo Nanodes, *E. purpurascens* (grupo Coilostylis, Figura 2F-G) e *E. obergii* Hawkes (grupo Incomptum, Figura 3K) também apresentaram cariótipo com predomínio de bandas CMA⁰/DAPI⁻. Regiões heterocromáticas semelhantes também foram verificadas em *E. strobiliferum* Rchb.f. (grupo Ramosum, Figura 5D), *E. alsum* Ridl. ex Oliv. (grupo Aquaticum, Figura 2D) e *E. holstii* Hágsater & Carnevali (grupo Schistochilum, Figura 5H), mas estas classificadas como CMA⁺/DAPI⁰.

As espécies do grupo Incomptum apresentaram distintas composições de blocos CMA/DAPI, onde se observou 38 bandas proximais CMA⁰/DAPI⁻ e duas bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ em *E. obergii* Hawkes (Figura 3K), enquanto *E. proligerum* Barb. Rodr. exibiu 8 bandas terminais e proximais + 4 bandas terminais DAPI⁺/CMA⁻ e 6 bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ (Figura 3L). A diferença na composição de heterocromatina nas duas espécies analisadas revela a importância da análise do padrão de bandas CMA/DAPI para distinção citotaxonômica do grupo. O grupo Ramosum apresentou bandas heterocromáticas pouco evidentes, sendo verificadas duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais em todas as espécies e bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ em *E. paranaense* Barb.Rodr., (Figura 5B) e bandas CMA⁺/DAPI⁰ em *E. strobiliferum* (Figura 5D). Da mesma forma, em alguns grupos como Alpicolium (*E. armeniacum* Lindl., Figura 2A), Amblostomioides (*E. rondoniense* L.C.Menezes, Figura 2C), Coronatum (*E. warasii* Pabst, Figura 2K), Campestre (*E. campestre* Lindl., Figura 2E), Compressum (*E. compressum* Griseb., Figura 2J) e Spathiger (*E. rigidum* Jacq., Figura 6H), além de poucas espécies amostradas (1 espécie cada), os cariótipos apresentaram

1-4 pequenas bandas CMA⁺/DAPI terminais ou proximais, estas pouco expressivas para se estabelecerem correlações significativas entre os grupos.

A variação no padrão de heterocromatina nos eucariotos pode ser decorrente de diferentes dinâmicas estruturais, geralmente associadas a fatores epigenéticos, modificações de histonas, modificações de cromatina, retroelementos, DNAs satélites e co-amplificação de repetições em tandem (LAMB et al., 2007; EVTUSHENKO et al. 2016; ALLSHIRE & MADHANI, 2017). Em alguns grupos vegetais, como *Citrus* L. (BARROS E SILVA et al., 2010), *Pereskia* Mill. (CASTRO et al., 2016), *Jacaranda* Juss. (CORDEIRO et al., 2016), *Solanum* L. sect. *Acanthophora* (CHIARINI et al., 2013) e o grupo Caesalpinia (VAN-LUME et al., 2017) a distribuição de heterocromatina nas espécies tende a apresentar um padrão específico, seja ele cariotípico ou evolutivo. Em outros grupos, como Bignonieae (CORDEIRO et al., 2017), *Spondias* L. (ALMEIDA et al., 2007), *Jatropha* L. (MARINHO et al., 2018), *Acianthera* Scheidw. (OLIVEIRA et al., 2015) e *Capsicum* L. (SCALDAFERRO et al., 2012) a distribuição de heterocromatina aparece bastante variável entre as espécies e aparentemente segue um padrão de distribuição aleatório. Os grupos com maiores amostragens de *Epidendrum* (*Schistochilum*, *Difforme*, *Nocturnum*) seguem um padrão semelhante na distribuição de heterocromatina e no número cromossômico. Por outro lado, a dessemelhança na distribuição de bandas CMA/DAPI observado nas espécies do grupo *Incomptum* (Figura 3K-L) questiona a existência de padrões específicos para os demais grupos de *Epidendrum*. Assim, os grupos com menores amostragens (1-2 espécies) necessitam de análises mais abrangentes para confirmar se o número e distribuição de regiões heterocromáticas segue um padrão específico nos cariótipos das espécies.

Número básico ancestral de Epidendrum

Reunindo informações de contagens prévias para *Epidendrum* (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS, 2013; ASSIS et al., 2013) com os dados da presente pesquisa (Tabela 2), um total de 67 espécies do gênero tiveram seus registros cromossômicos contabilizados (ver Material Suplementar S2). Para a família Epidendroideae e subtribo Laeliinae, Felix e Guerra (2010) propõem $x = 20$ como número básico ancestral. O gênero *Epidendrum*, apesar de apresentar distintas contagens cromossômicas em muitas de suas espécies, tem o

número cromossômico $2n = 40$ como predominante (69% dos registros cariológicos), além de longas séries poliploides 40-80-120-160-240, corroborando com $x = 20$ como provável número básico (PINHEIRO et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; ASSIS et al., 2013). Em análises filogenéticas para *Epidendrum* (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005), o clado mais basal comporta espécies de distribuição mexicano-mesoamericana. Neste clado existem registros cromossomos para duas espécies: *E. magnoliae* Muhl. (grupo Magnoliae) e *E. diffusum* Sw. (grupo Seraphyta), ambas com $2n = 40$ (TANAKA & KAMEMOTO, 1984). *Schistochilum*, que apresenta a maior variação cromossômica para *Epidendrum*, ocupa um clado de origem mais recente na evolução do gênero (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018). Além disso, a maioria dos grupos próximos dentro da tribo Laeliinae, como *Caularthron* Rafin, *Brassavola* R.Br., *Encyclia* Hook. e *Dimerandra* Schltr., também apresenta $x = 20$ como provável número básico ancestral (FELIX & GUERRA, 2010).

De forma geral, a poliploidia e a disploidia são enfatizados como fenômenos cariotípicos importantes na evolução de *Epidendrum* (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO et al., 2009; ASSIS et al., 2013). Contudo, tais variações numéricas parecem estar concentradas especialmente nos grupos *Schistochilum*, *Nocturnum*, *Setiferum*, *Smaragdinum* e *Coilostylis* (5/20 grupos analisados). Nestes casos, apenas *Schistochilum* e *Smaragdinum* parecem apresentar número básico ancestral $x \neq 20$. Em *Smaragdinum*, uma possível disploidia descendente ($n = 20 \rightarrow n = 19$) pode justificar os registros de $2n = 38$ em *E. smaragdinum* e $2n = 114$ e ca. 190 em *E. orchidiflorum*. Para *Schistochilum*, Assis et al. (2013) sugere $x = 12$ como o mais provável número básico ancestral do grupo. A ampla variação no número cromossômico aliada à ocorrência de cariótipos bimodais e distintas composições de regiões heterocromáticas confirmam a ocorrência de eventos de poliploidia, disploidia, hibridizações e introgressões nas espécies deste grupo (PINHEIRO et al., 2009; ASSIS et al., 2013). Estes fenômenos podem, inclusive, ter atuado nas linhagens mais primitivas e serem responsáveis pela diversificação e variedade cariológica nas demais espécies de *Schistochilum* ao longo de sua evolução (PINHEIRO et al., 2009; ASSIS et al., 2013). Excluindo as variações cromossômicas registradas quase exclusivamente para *Schistochilum*, nos demais grupos de *Epidendrum* prevalecem $n = 20$, o que confirma a hipótese de $x = 20$ como o mais provável ancestral do gênero.

Citogenética e aspectos ecológicos em *Epidendrum*

Entre as espécies analisadas, 37 delas (72,5%) são exclusivamente epífitas, enquanto 13 delas são terrestres e/ou rupícolas e duas delas podem ser terrestre/rupícola, mas também epífitas (Tabela 2). Entre as 15 espécies que podem apresentar hábito terrestre/rupícola, sete são poliploides e incluem os citótipos com maiores registros cromossômicos para *Epidendrum*, $2n = 240$ (*E. cinnabarinum*), $2n = 114$, 120 e ca.190 (*E. orchidiflorum*) e $2n = 120$ (*E. tumuc-humaciense*). Em outros grupos de Epidendroideae, como Maxilariinae e *Gomesa* R.Br., esta correlação entre poliploidia e hábito terrestre/rupícola também é registrada (FELIX & GUERRA, 2010; MORAES et al., 2017; CORDEIRO et al., 2018). Diversos fatores podem ter favorecido a adaptação destas plantas poliploides ao hábito terrestres/rupícola, especialmente à disponibilidade de nutrientes. Maiores células (como nos poliploides) requerem respectivamente uma maior quantidade de nutrientes, principalmente nitratos e fosfatos (LEITCH & LEITCH, 2008). Esta disponibilidade de nutrientes nem sempre está disponível para as plantas epífitas, mas podem ser obtidos em áreas ricas em matéria orgânica, como fendas de rochas em afloramentos rochosos (LEITCH et al. 2009; MORAES et al., 2017). Entretanto, em *Epidendrum* se observa ainda que diversas espécies poliploides podem apresentar hábito epífita (grupo Nocturnum e *E. viviparum*, por exemplo), bem como espécies diploides podem ser terrestres/rupícolas (*E. warasii*, *E. campestre*, *E. alsum*, *E. paniculatum*, *E. xanthinum*), sugerindo que a poliploidia pode ocorrer sem correlação ao hábito em alguns grupos e que a mesma pode ser correlacionada a outros mecanismos independentes da ocupação de distintos nichos ecológicos.

Em relação à distribuição de heterocromatina, existem diversos fatores ambientais que muitas vezes são correlacionados com o padrão cariotípico das espécies, especialmente distribuição geográfica, variação nos níveis de altitude e nichos ecológicos (VOSA, 1996; ACOSTA et al., 2016; MORAES et al., 2017; MENEZES et al., 2017; VAN-LUME et al., 2017). Entre os indivíduos de *Epidendrum* analisados foram verificadas regiões ricas em pares de base AT (DAPI⁺) em 10 espécies. Entre elas, cinco espécies (50%) ocupam preferencialmente habitats terrestre/rupícola (inselbergs, afloramentos rochosos, tepuys, solos pedregosos) e duas são terrestre/rupícola ou ocasionalmente epífitas (*E. secundum* e *E. paniculatum*), totalizando 70% das espécies com bandas DAPI⁺. As espécies tipicamente epífitas de Mata úmida (Floresta Amazônica, Mata Atlântica), tendem a apresentarem ausência de

blocos DAPI⁺ (com exceção de *E. vesicatum*, *E. proligerum* e *E. purpurascens*). Indivíduos que ocorrem em afloramentos rochosos estão geograficamente isolados e podem apresentar baixos níveis de fluxo gênico entre indivíduos de outras áreas (PALMA-SILVA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2014). Contudo, a ocorrência de fluxo gênico interespecífico e hibridizações entre espécies simpátricas dentro de afloramentos rochosos têm sido registradas (PALMA-SILVA et al., 2011; ASSIS, 2013; PINHEIRO et al., 2014; WANDERLEY et al., 2018). A análise comparada com ampla amostragem envolvendo espécies-chave que apresentam distintas ocupações de habitats (epífitas de mata úmida e terrestre/rupícola de afloramentos rochosos), como *E. secundum* e *E. paniculatum*, podem ajudar a testar estas hipóteses relacionadas ao padrão de heterocromatina e o hábito/habitat das espécies.

De forma geral, o gênero *Epidendrum* aparece como um importante modelo para estudos ecológicos e evolutivos nos neotrópicos, sobretudo pela sua ampla distribuição geográfica, alto grau de variação morfológica, interações ecológicas e diversidade no número cromossômico (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO & COZZOLINO, 2013). A distribuição de heterocromatina e variação no número cromossômico nos grupos de *Epidendrum* com maiores amostragens parece apresentar uma correlação significativa. A correlação entre fatores ecológicos, números cromossômicos e padrões de heterocromatina para *Epidendrum*, embora ainda incipiente, se inclui de forma promissora para se discutir distintas hipóteses biogeográficas, ecológicas e evolutivas no gênero.

Conclusão

Epidendrum apresenta predominância de $2n = 40$ no cariótipo de suas espécies. Séries poliploides no gênero ($2n = 80, 120, 160, 240$) e frequente registro de $2n = 40$ em grupos correlacionados ao gênero reforçam o número básico ancestral $x = 20$. Dois grupos, contudo, parecem ter uma origem diferente de $x = 20$: Smaragdinum (supostamente $x = 18$) e Schistochilum (provavelmente $x = 12$).

O padrão de heterocromatina da maioria dos grupos foi marcado por regiões ricas em pares de base GC (CMA⁺) localizadas nas regiões terminais e proximais dos cromossomos. Regiões ricas em pares de base AT (DAPI⁺) foram registradas especialmente nos grupos Schistochilum, Loefgrenii e Pseudepidendrum. Bandas heterocromáticas pálidas, classificadas como CMA⁰ ou DAPI⁰ foram encontradas

especialmente nos grupos Nanodes, Aquaticum e Coilostylis. Os grupos com maiores amostragens (Schistochilum, Nocturnum, Difforme) seguem um padrão semelhante de número cromossômico e de distribuição de heterocromatina. O grupo Incomptum, por sua vez, apresentou um padrão de bandas CMA/DAPI bastante distinto entre as duas espécies analisadas (*E. obergii* e *E. proligerum*), questionando a existência de padrões específicos para os demais grupos de *Epidendrum* com menores amostragens.

Em relação aos aspectos ecológicos, existe uma provável correlação entre poliploidia e hábito terrestre/rupícola nas espécies de *Epidendrum* com maiores números cromossômicos (*E. tumuc-humaciense*, $2n = 120$; *E. orchidiflorum*, $2n = 112$, 114 , ca.190; *E. cinnabarinum*, $2n = 220$, 240). Da mesma forma, regiões ricas em pares de base AT (DAPI⁺) são encontradas especialmente em espécies terrestres/rupícolas, enquanto as espécies tipicamente epífitas de Mata úmida tendem a apresentar ausência de bandas DAPI⁺ (com exceção apenas de *E. vesicatum*, *E. proligerum* e *E. purpurascens*).

Referências

ACOSTA, M. C.; MOSCONE, E. A.; COCUCCI, A. A. Using chromosomal data in the phylogenetic and molecular dating framework: karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaceae) influenced by historical changes in sea level. **Plant Biology**, v. 18, p. 514-526, 2016.

ALLSHIRE, R. C.; MADHANI, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. **Molecular cell biology**, 2017. DOI: 10.1038/nrm.2017.119

ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, P. C. L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 541-547, 2007.

ASSIS, F. N. M. **Mecanismos de evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 2013. 131p.

ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; BARROS E SILVA, A. E.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae:

Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, p. 329-344, 2013.

BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A. S.; KARLA, G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosome Research**, v. 18, p. 503-514, 2010.

BENNETZEN, J. L. The many hues of plant heterochromatin. **Genome Biology**, 2000. <http://genomebiology.com/2000/1/1/reviews/107>.

BRIEGER, F. G. Gattungsreihe Epidendra. In: BRIEGER, F. G.; MAATSCH, R.; SENGHAS, K. (eds). **Schlechter Die Orchideen, 3rd edn**. Paul Parey, Berlin, pp. 509-549, 1976-1977.

CARVALHO, R.; SOARES-FILHO, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 109, p. 276-282, 2005.

CASTRO, J. P.; MEDEIROS-NETO, E.; SOUZA, G.; ALVES, L. I. F.; BATISTA, F. R. C.; FELIX, L. P. CMA band variability and physical mapping of 5S and 45S rDNA sites in Brazilian Cactaceae: Pereskioideae and Opuntioideae. **Brazilian Journal of Botany**, 2016. DOI 10.1007/s40415-015-0248-5

CHIARINI, F. E.; SANTIÑAQUE, F. F.; URDAMPILLETA, J. D.; LAS PEÑAS, M. L. Genome size and karyotype diversity in *Solanum* sect. *Acanthophora* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 13-125, 2013.

CORDEIRO, J. M. P.; LIMA, S. A. A.; PAZ, S. N.; SANTOS, M. A. S.; FELIX, L. P. Karyotype evolution in the genus *Jacaranda* Juss. (Jacarandaeae, Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, gmr15048973, 2016.

CORDEIRO, J. M. P.; KAEHLER, M.; SOUZA, G.; FELIX, L. P. Karyotype analysis in Bignoniaceae (Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2697-2706, 2017.

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

DRESSLER, R.L. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. **Orquídea (Méx.)**, v. 9, p. 277-290, 1984.

EVTUSHENKO, E. V.; LEVITSKY, V. G.; ELISAFENKO, E. A.; GUNBIN, K. V.; BELOUSOV, A. I.; ŠAFÁŘ, J.; DOLEŽEL, J.; VERSHININ, A. V. The expansion of heterochromatin blocks in rye reflects the co-amplification of tandem repeats and adjacent transposable elements. **BMC Genomics**, v. 17, p. 337, 2016.

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

FERNÁNDEZ-CONCHA, G. C.; RAMÍREZ-MORILLO, I. M. Nomenclatural Novelties in the Orchidaceae from Venezuela and Guyana. **Novon**, v. 13, p. 405-418, 2003.

FREUDENSTEIN, J. V.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, v. 115, p. 665-681, 2015.

GREWAL, S. I. S.; MOAZED, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, v. 301, p. 798-802, 2003.

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

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC-Editora, Ribeirão Preto, São Paulo. 2002.

HÁGSATER, E. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: TAN, K. W. (ed.). **Proceedings of the eleventh World Orchid Conference**. Miami, 1985, pp. 195-201.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 7. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 11**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2008, 234p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 10. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 14**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2013, 209p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2015, 148p.

HÁGSATER, E.; SALDAÑA, L. S. The genus *Epidendrum*, Part 11. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 15(2)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2016, 72p.

HÁGSATER, E.; SANTIAGO, E. The genus *Epidendrum*, Part 12. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 16(1)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2018a, 144p.

HÁGSATER, E.; SANTIAGO, E. The genus *Epidendrum*, Part 12. Species new and old in *Epidendrum*. **Icones Orchidacearum 16(2)**. Instituto Chinoín, A.C., Mexico City, 2018b, 76p.

HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A. *Epidendrum*. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASSMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum: 4. Epidendroideae (part one)**. Oxford University Press, Oxford, 2005, pp. 236-251.

HENNIG, W. Heterochromatin. **Chromosoma**, v. 108, p. 1-9, 1999.

LAMB, J. C.; YU, W.; HAN, F.; BIRCHLER, J.A. Plant chromosomes from end to end: telomeres, heterochromatin and centromeres. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 116-122, 2007.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. **Science**, v. 320, p. 481-483, 2008.

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.

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

LIPPMAN, Z.; GENDREL, A. V.; BLACK, M.; VAUGHN, M. W.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W. R.; LAVINE, K.; MITTAL, V.; MAY, B.; KASSCHAU, K. D. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature**, v. 430, p. 471-475, 2004.

MARINHO, A. C. T. A.; VASCONCELOS, S.; VASCONCELOS, E. V.; MARQUES, D. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Karyotype and genome size comparative analyses among six species of the oilseed-bearing genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, p. 442-449, 2018.

MARQUES, I.; DRAPR, 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, 2014. DOI: 10.1186/1471-2148-14-20

MARTINS, L. V.; PRON, A. P.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; CARVALHO, R.; FEITOZA, L. L. Heterochromatin distribution and histone modification patterns of H4K5 acetylation and H3S10 phosphorylation in *Capsicum* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, p. 161-168, 2018.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 12, p. 164-171, 2014.

MENEZES, R. S.; BRADY, S. G.; CARVALHO, A. F.; DEL LAMA, M. A.; COSTA, M. A. The roles of barriers, refugia, and chromosomal clines underlying diversification in Atlantic Forest social wasps. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7689, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07776-7

MORAES, A. P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* × *E.*

puniceoluteum hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). **Ecology and Evolution**, v. 3, p. 3824-3837, 2013.

MORAES, A. P.; KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; GOMES, S. S. L.; VICCINI, L. F.; BARROS, F.; GUERRA, M.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. **Plant Biology**, v. 19, p. 298-308, 2017.

NÓBREGA, S. R.; COELHO, A. L. F.; VEROLA, C. F.; COSTA, I. R.; VILAÇA, R.; LUZ, F. J. F. & ARAÚJO, W. F. Chromosome variations and diversity of *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) on the Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017. DOI: 10.4238/gmr16039754

OLIVEIRA, I. G.; MORAES, A. P.; ALMEIDA, E. M.; ASSIS, F. N. M.; CABRAL, J.; BARROS, F.; FELIX, L. P. Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 102-120, 2015.

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

PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M. F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia spp.*) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 3185-3201, 2011.

PESSOA, E.; FELIX, L. P.; ALVES, M. A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. **Brittonia**, v. 66, p. 347-352, 2014.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. **Taxon**, v. 62, p. 77-88, 2013.

PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, p. 165-177, 2009.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; DRAPER, D.; BARROS, F.; FELIX, L. P., FAY M. F.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 49, 2014.

SCALDAFERRO, M. A.; GRABIELE, M.; MOSCONE, E. A. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 693-709, 2012.

STORT, M. N. S.; PAVANELLI, E. A. S. Formation of multiple or adventive embryos in *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 55, p. 331-336, 1985.

STORT, M. N. S.; PAVANELLI, E. A. S. Crossing systems in *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 34, p. 59-62, 1986.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. (ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives III**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1984, pp. 324-410.

van den BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417-430, 2009.

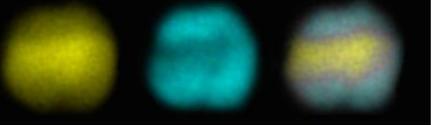
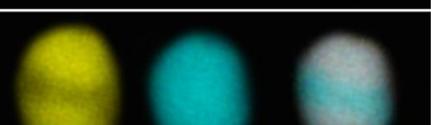
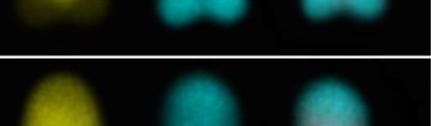
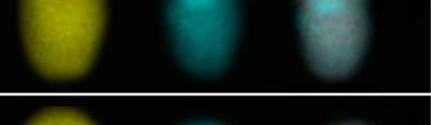
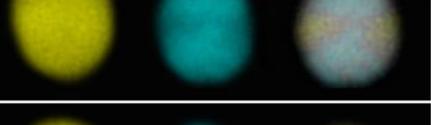
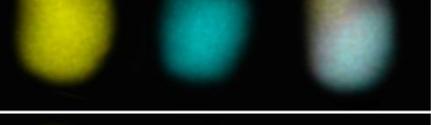
VAN-LUME, B.; ESPOSITO, T.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; GAGNON, E.; LEWIS, G. P.; SOUZA, G. Heterochromatic and cytomolecular diversification in the Caesalpinia group (Leguminosae): relationship between phylogenetic and cytogeographical data. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, v. 29, p. 51-63, 2017.

VOSA, C. Some aspects of karyotype evolution in Liliiflorae: heterochromatin variation and ecology in *Allium pulchellum*. **Bocconeia**, v. 5, p. 267-270, 1996.

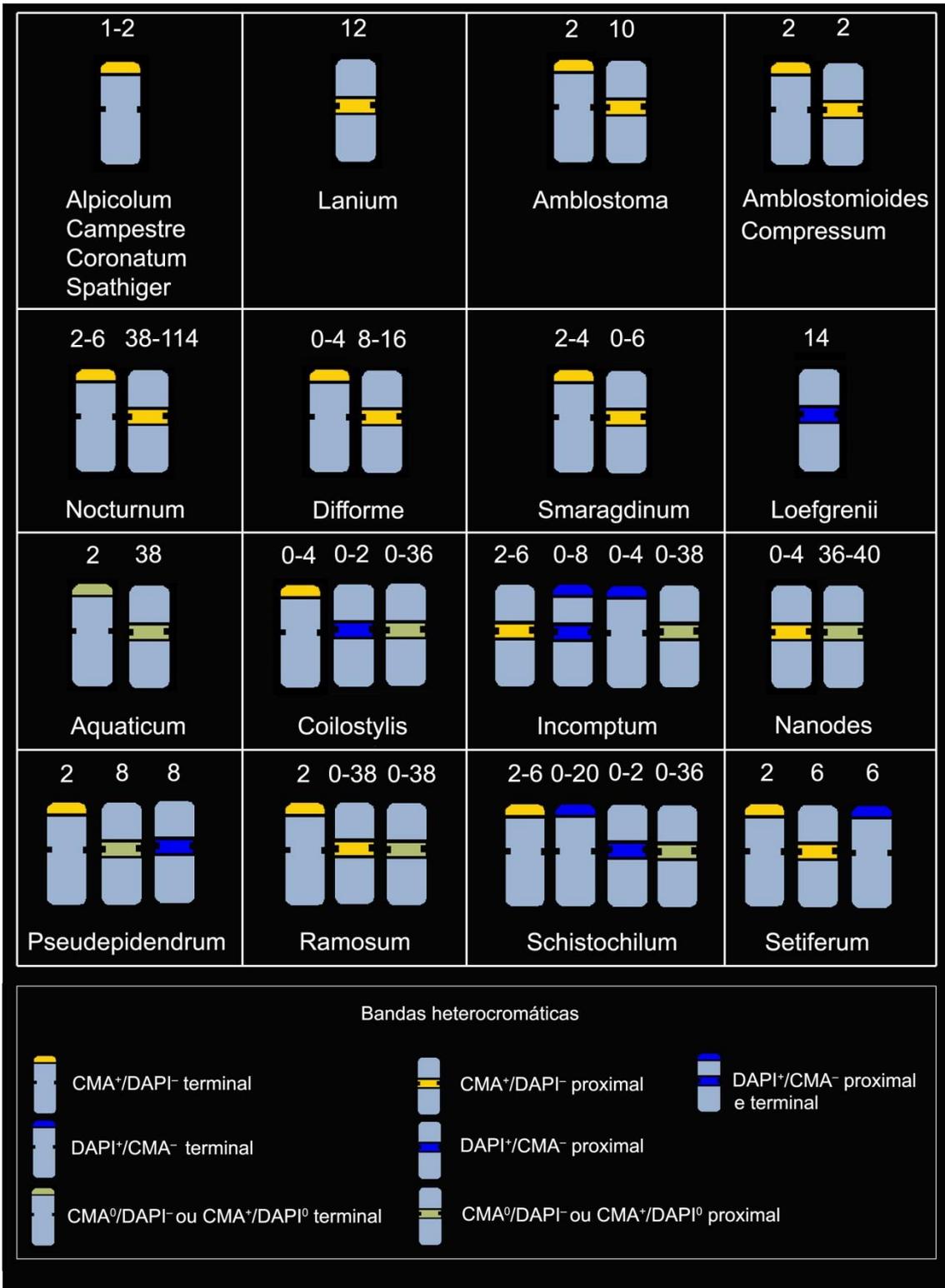
WANDERLEY, A. M.; MACHADO, I. C. S.; ALMEIDA, E. M.; FELIX, L. P.; GALETTO, L.; BENKO-ISEPPON, A. M. & SORK, V. L. The roles of geography and environment in divergence within and between two closely related plant species inhabiting an island-like habitat. **Journal of Biogeography**, v. 45, p. 81-393, 2018.

Material Suplementar

S1. Padrões de composição e localização da heterocromatina registradas para as espécies de *Epidendrum* analisadas.

	Banda CMA ⁺ /DAPI ⁻ proximal (<i>Epidendrum avicula</i>)
	Banda CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminal (<i>Epidendrum tridactylum</i>)
	Banda DAPI ⁺ /CMA ⁻ proximal (<i>Epidendrum paniculatum</i>)
	Banda DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminal (<i>Epidendrum flammeum</i>)
	Banda DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminal e proximal (<i>Epidendrum proligerum</i>)
	Banda CMA ⁰ /DAPI ⁻ proximal (<i>Epidendrum paniculatum</i>)
	Banda CMA ⁰ /DAPI ⁻ terminal (<i>Epidendrum alsum</i>)
	Banda CMA ⁺ /DAPI ⁰ proximal (<i>Epidendrum holstii</i>)

S2. Padrão de distribuição de heterocromatina verificada entre diferentes grupos infragênicos de *Epidendrum*



S3. Números cromossômicos registrados para *Epidendrum* distribuídos em seus respectivos grupos infragenéricos conforme proposta de Hágsater (1985) e atualizados conforme Hágsater e Saldaña (2013, 2015, 2016) e Hágsater e Santiago (2018a,b).

Grupo / Espécie	Número cromossômico e referências
Grupo Alpicolum	
<i>E. armeniacum</i> Lindl.	2n = 40 (Assis et al., 2013; este trabalho)
Grupo Amblostoma	
<i>E. lanipes</i> Lindl.	2n = 40 (Goldblatt, 1985)
<i>E. tridactylum</i> Lindl.	2n = 40 (Assis et al., 2013; este trabalho)
Grupo Amblostomioides	
<i>E. rondoniense</i> L.C.Menezes	2n = 40 (este trabalho)
Grupo Aquaticum	
<i>E. alsum</i> Ridl. Ex Oliv.	2n = 40 (este trabalho)
Grupo Campestre	
<i>E. campestre</i> Lindl.	2n = 40 (este trabalho)
Grupo Coilostylis	
<i>E. ciliare</i> L.	2n = 40 (Assis, 2013; este trabalho) 2n = 40, 80, 160 (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. purpurascens</i> Focke	2n = 40 (este trabalho)
<i>E. viviparum</i> Lindl.	2n = 40 (Assis, 2013; este trabalho) 2n = 80 (este trabalho)
Grupo Compressum	
<i>E. compressum</i> Griseb.	2n = 40 (este trabalho)
Grupo Coronatum	
<i>E. warasii</i> Pabst	2n = 40 (este trabalho)
Grupo Cristatum	
<i>E. cooperianum</i> Bateman	2n = 40 (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. cristatum</i> Ruiz and Pavon	2n = 40 (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Difforme	
<i>E. althausenii</i> A.D.Hawkes	2n = 40 (este trabalho)
<i>E. amapaense</i> Hágsater & L.Sánchez	2n = 40 (este trabalho)
<i>E. anatipedium</i> L.M.Sánchez & Hágsater	2n = 40 (este trabalho)
<i>E. campaccii</i> Hágsater & L. Sánchez	2n = 40 (Pessoa et al., 2014; este trabalho)

<i>E. difforme</i> Jacq.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. garciae</i> Pabst	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. latilabre</i> Lindl.	$2n = 40$ (Felix & Guerra, 2010; Assis et al., 2013; este trabalho)
<i>E. aff. latilabre</i>	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. pessoae</i> Hágater & L.Sánchez	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. pseudodifforme</i> Hoehne & Schltr.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013; este trabalho)
<i>E. sanchezii</i> E.Pessoa & L.P.Felix	$2n = 40$ (Pessoa et al., 2014; este trabalho)
Grupo Incomptum	
<i>E. obergii</i> Hawkes	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. proligerum</i> Barb. Rodr.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013; este trabalho)
Grupo Lanium	
<i>E. avicula</i> Lindl.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010; este trabalho)
Grupo Loefgrenii	
<i>E. loefgrenii</i> Cogn.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. vesicatum</i> Lindl.	$2n = 40$ (este trabalho)
Grupo Magnoliae	
<i>E. magnoliae</i> Muhl.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
<i>E. propinquum</i> A. Rich. & Galeotti	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Mutelianum	
<i>E. patens</i> Sw.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Nanodes	
<i>E. longirepens</i> (C.Schweinf.) C.Schweinf.	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. uleinanodes</i> Hágater	$2n = 40$ (este trabalho)
Grupo Nocturnum	
<i>E. bahiense</i> Rchb.f.	$2n = 80$ (este trabalho)
<i>E. carpophorum</i> Barb. Rodr.	$2n = 80$ (este trabalho)
<i>E. minus</i> (Cogn.) Hágater	$2n = 80$ (este trabalho)
<i>E. nocturnum</i> Jacq.	$2n = 40, 80$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010)
	$2n = 80$ (Assis et al., 2013; este trabalho)

<i>E. aff. nocturnum</i>	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. tumuc-humaciense</i> (Veyret)	$2n = 120$ (este trabalho)
Carnevali & G.A.Romero	
Grupo Pseudepidendrum	
<i>E. paniculatum</i> Ruiz & Pav.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Assis et al., 2013; este trabalho)
Grupo Ramosum	
<i>E. paranaense</i> Barb.Rodr.	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. ramosum</i> Jacq.	$2n = 40$ (Assis et al., 2013; este trabalho)
<i>E. strobiliferum</i> Rchb.f.	$2n = 24$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
	$2n = 40$ (este trabalho)
Grupo Schistochilum =	
Amphyglottis	
<i>E. blepharistes</i> Barker ex Lindl.	$2n = 40$ (Goldblatt & Johnson, 1994)
<i>E. calanthum</i> Rchb.f. & Warsc.	$2n = 30$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm	$2n = 240$ (Felix & Guerra, 2010; Assis et al., 2013)
	$2n = 224$ (Assis, 2013)
	$2n = 220$ (este trabalho)
<i>E. cochlidium</i> Lindl.	$2n = 28$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Pinheiro et al., 2009);
	$2n = 38$ (Assis et al., 2013)
<i>E. ellipticum</i> Grah.	$2n = 56$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
	$2n = 68$ (Felix & Guerra, 2010)
<i>E. ibaguense</i> Kunth.	$2n = 58, 72, 76$ (Nóbrega et al., 2017)
	$2n = 70$ (Pinheiro et al., 2009)
	$2n = 76$ (este trabalho)
<i>E. flammeum</i> E. Pessoa & M. Alves	$2n = 50$ (Assis, 2013; este trabalho)
<i>E. flexuosum</i> G. Mey	$2n = 28$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. fulgens</i> Brongn.	$2n = 24$ (Pinheiro et al., 2009; Moraes et al., 2013; Assis et al., 2013)
<i>E. holstii</i> Hágsater & Carnevali	$2n = 58$ (este trabalho)

<i>E. macrocarpum</i> Rich.	$2n = 40$ (este trabalho)
<i>E. myrmecophorum</i> Barb. Rodr.	$2n = 120$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. puniceoluteum</i> F.Pinheiro & F.Barros	$2n = 52$ (Pinheiro et al., 2009); $2n = 56$ (Moraes et al., 2013)
<i>E. purpureum</i> Barb. Rodr.	$2n = 56$ (Tanaka & Kamemoto, 1984) $2n = 120$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. radicans</i> Pav. ex Lindl.	$2n = 40, 57, 62, 64, 70$ (Tanaka & Kamemoto, 1984) $2n = 60$ (Pinheiro et al., 2009)
<i>E. secundum</i> Jacq.	$2n = 28, 40, 48, 52, 80$ (Pinheiro et al., 2009); $2n = 30, 40, 42, 48, 50, 54, 56, 58, 84$ (Assis et al., 2013) $2n = 50, 56, 58, 68, 84$ (Assis, 2013) $2n = 56, 60$ (Tanaka & Kamemoto, 1984) $2n = 28, 56, 58$ (este trabalho)
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	$2n = 28, 30, 60$ (Pinheiro et al., 2009); $2n = 40, 60, \text{ca. } 80$ (Tanaka & Kamemoto, 1984) $2n = 28$ (Assis, 2013; este trabalho)
Grupo Seraphyta	
<i>E. diffusum</i> Sw.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984)
Grupo Setiferum	
<i>E. martianum</i> Lindl.	$2n = 80$ (este trabalho)
Grupo Smaragdinum	
<i>E. smaragdinum</i> Lindl.	$2n = 38$ (este trabalho)
<i>E. orchidiflorum</i> (Salzm.) Lindl.	$2n = 112$ (Assis et al., 2013); $2n = \text{ca. } 120$ (Assis, 2013) $2n = 114$ (este trabalho) $2n = \text{ca. } 190$ (este trabalho)
Grupo Spathiger	
<i>E. rigidum</i> Jacq.	$2n = 40$ (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2010; este trabalho)

Referências S3

ASSIS, F. N. M. **Mecanismos de evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 2013. 131p.

ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; BARROS E SILVA, A. E.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, p. 329-344, 2013.

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

GOLDBLATT, P. (ed.). **Index to plant chromosome numbers 1982–1983**. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, 1985.

GOLDBLATT, P.; JOHNSON, D. E. (eds.). **Index to plant chromosome numbers 1990–1991**. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, 1994.

MORAES, A. P.; KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; GOMES, S. S. L.; VICCINI, L. F.; BARROS, F.; GUERRA, M.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. **Plant Biology**, v. 19, p. 298-308, 2017.

NÓBREGA, S. R.; COELHO, A. L. F.; VEROLA, C. F.; COSTA, I. R.; VILAÇA, R.; LUZ, F. J. F. & ARAÚJO, W. F. Chromosome variations and diversity of *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) on the Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017. DOI: 10.4238/gmr16039754

PESSOA, E.; FELIX, L. P.; ALVES, M. A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. **Brittonia**, v. 66, p. 347-352, 2014.

PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, p. 165-177, 2009.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. (ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives III**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1984, pp. 324-410.

CONCLUSÕES GERAIS

- Em *Epidendrum* “grupo Nocturnum” a poliploidia ($2n = 40, 80, 120$) aparece como importante fenômeno da evolução e especiação do grupo e pode ter correlações com a ecologia da planta e com a ocorrência de cleistogamia no sistema reprodutivo de suas espécies;

- No grupo Nocturnum, a distribuição de heterocromatina é marcada pela ocorrência de regiões ricas em pares de base GC (CMA⁺/DAPI⁻) localizadas preferencialmente na região proximal dos cromossomos e entre 0-6 bandas terminais entre os cariótipos. O conteúdo de DNA se apresenta relativamente correlacionado ao nível de ploidia, onde uma espécie diploide apresentou $2C = 2,91$ μg , espécies tetraploides apresentaram $2C \sim 6,00$ μg e uma espécie hexaploide apresentou $2C = 8,92$ μg ;

- *Epidendrum ciliare* apresentou padrões de distribuição de heterocromatina diferente das demais espécies do grupo “Nocturnum”, além de ser uma espécie diploide ($2n = 40$) com conteúdo de DNA próximo às espécies tetraploides ($2C = 6,28$ μg). A conciliação destas informações reforça o posicionamento de *E. ciliare* em um grupo infragenérico distinto e demonstra que caracteres florais, síndromes de polinização e formação de híbridos intraespecíficos envolvem linhagens distintas em *Epidendrum*;

- As espécies de *Epidendrum* “grupo Difforme” apresentam constante número cromossômico ($2n = 40$), morfologia predominantemente metacêntrica e submetacêntrica, cariótipos simétricos, de tamanho médio aproximado de $1,8$ μm . O padrão de heterocromatina é marcado pela ocorrência variável de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ proximais (8-16) ou terminais (0-4);

- O conteúdo de DNA nuclear nas espécies de *Epidendrum* “grupo Difforme” variou de $3,99$ μg em *E. campaccii* a $5,68$ μg em *E. althausenii* (variação de 1,42 vezes). Os valores foram relativamente aproximados entre a maioria das espécies, devido, sobretudo, ao número cromossômico constante ($2n = 40$) e a simetria cariotípica no grupo;

- Para o grupo Difforme, novas considerações taxonômicas são propostas com base no padrão de heterocromatina, conteúdo de DNA, análises filogenéticas e caracteres morfológicos das espécies. *Epidendrum latilabre* pode corresponder a

duas espécies distintas e *E. campaccii* e *E. pseudodiforme* podem constituir em um mesmo táxon.

- *Epidendrum*, de forma geral, apresenta predominância de $2n = 40$ no cariótipo de suas espécies na maioria dos grupos infragenéricos analisados. Séries poliploides ($2n = 80, 120, 160, 240$) aliado ao frequente registro de $2n = 40$ em grupos correlacionados ao gênero reforçam o número básico ancestral $x = 20$. Dois grupos, contudo, parecem ter uma origem diferente de $x = 20$: *Smaragdinum* (supostamente $x = 18$) e *Schistochilum* (provavelmente $x = 12$);

- O padrão de heterocromatina da maioria dos grupos infragenéricos de *Epidendrum* é marcado por regiões ricas em pares de base GC ($CMA^+/DAPI^-$) localizadas nas regiões terminais e proximais dos cromossomos. Regiões ricas em pares de base AT ($DAPI^+/CMA^-$) foram registradas especialmente nos grupos *Schistochilum*, *Loefgrenii* e *Pseudepidendrum*. Os grupos com maiores amostragens (*Schistochilum*, *Nocturnum*, *Difforme*) parecem seguir um padrão semelhante de número cromossômico e de distribuição de heterocromatina;

- Existe uma provável correlação entre poliploidia e hábito terrestre/rupícola nas espécies de *Epidendrum* com maiores números cromossômicos (*E. tumuc-humaciense*, $2n = 120$; *E. orchidiflorum*, $2n = 112, 114$, ca.190; *E. cinnabarinum*, $2n = 220, 240$). Da mesma forma, a ocorrência de regiões ricas em pares de base AT ($DAPI^+$) são encontradas especialmente em espécies terrestres/rupícolas, enquanto as espécies tipicamente epífitas de Mata úmida tendem a apresentar ausência de bandas $DAPI^+$.