

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS
ALESON VIEIRA

**Citogenética e quantificação de DNA de cinco espécies e um
híbrido do gênero *Catasetum* (Orchidaceae)**

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO – BRASIL
DEZEMBRO – 2013

ALESON VIEIRA

Citogenética e quantificação de DNA de cinco espécies e um híbrido do gênero *Catasetum* (Orchidaceae)

Dissertação apresentada à
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO
GROSSO, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento de Plantas,
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Isane Vera
Karsburg

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO – BRASIL
DEZEMBRO - 2013

Vieira, Aleson.

V658c Citogenética e quantificação de DNA de cinco espécies e um híbrido do gênero *Catasetum* (Orchidaceae) / Aleson Vieira. – Alta Floresta , 2013
73 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade do Estado de Mato Grosso.

Bibliografia: f. 39-56

Orientador: Isane Vera Karsburg

1. Citogenética. 2. Orchidaceae. 3. Amazônia. I. Autor. II. Título.

CDU 575+582.594

CITOGENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE CINCO
ESPÉCIES E UM HÍBRIDO DO GÊNERO *Catasetum*
(ORCHIDACEAE)

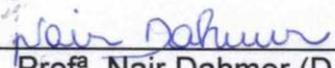
ALESON VIEIRA

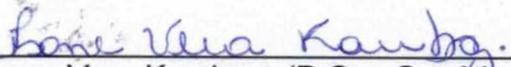
Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE MATO GROSSO, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento de
Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 10 de dezembro de 2013.

Comissão Examinadora:


Prof. Wellington Ronildo Clarindo (D.Sc., Genética e Melhoramento) – UFES


Prof^a. Nair Dahmer (D.Sc., Zootecnia) – UNEMAT


Prof^a. Isane Vera Karsburg (D.Sc., Genética e Melhoramento) – UNEMAT
(Orientadora)

A minha mãe Irma da Conceição Palhano Vieira.

“Um belo dia abandonarei este corpo que outrora prestimosamente abrigou a minha alma; e neste dia vislumbrarei em breves instantes toda trajetória percorrida. Poderei até concluir que tudo o que fiz foi em vão, tudo em que acreditei não passaram de tolices, e ainda assim serei feliz. Pois só pelo fato de ter conhecido tão nobre pessoa esta existência já terá valido a pena”.

(Dedico)

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo incentivo, oportunidade, e reconhecimento.

À Capes pelo apoio financeiro.

À Professora Isane Vera Karsburg, pela orientação, amizade, confiança, apoio, dedicação, por seus ensinamentos, e por sua força.

À Doutora Nair Dahmer por sua colaboração, dedicação, amizade e ensinamentos.

Ao Doutor Wellington Ronildo Clarindo que em 2009 me recebeu de braços abertos em Viçosa, e que agora participa de um momento tão importante em minha carreira; obrigado por sua colaboração em todos os momentos.

À Professora Celice Alexandre Silva pelo apoio e incentivo

A Professora Leonarda Grillo Neves, que além de ensinar me ajudou imensamente no período de sua disciplina.

Às Professoras Rosana Rodrigues e Telma Nair Santana Pereira, pelo apoio, pelos ensinamentos, e por sua dedicação.

À equipe do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais (UNEMAT - AF).

Ao aluno Daniel Pereira Miranda (Graduando em Agronomia), e às alunas Vanessa dos Santos de Mello (Graduação em Biologia) e Alumara Dins Teixeira (Graduação em Agronomia) por sua ajuda sempre que necessária, pelos momentos de risos e brincadeiras.

Ao Mestrando Ricardo Gallo por toda a ajuda.

À Mestranda Angelitta da Silva Benevenuto pela ajuda.

À minha amiga “irmã” Wandreilla Moreira (MP) que me acompanhou desde o início desta jornada, que esteve comigo rindo, estudando, reclamando, se queixando, por sua amizade e por transformar cada dia em um momento especial.

À Tia Ivone Damacena Moreira por seu carinho, e por ter me recebido em sua casa como uma mãe.

Aos meus amigos “irmãos” Jonas Dourado Júnior, Simão Justen, Thiago Maldonado, Márcio Trettel e Rodrigo Battisti por todos os momentos, não importa qual a circunstância.

À Aguida Morales Pereira, Viviane Guzzo De Carlli Poelking e Gustavo Carvalho pela amizade e por tudo o que vocês representam em minha vida.

Ao Doutor André Narvaes de Rocha Campos por todos os seus ensinamentos, apoio e compreensão.

À minha irmã Marciane M. Vieira Astolpho, meu cunhado Marcelus Nahime Astolpho, e a minha sobrinha Ana Helena Vieira Astolpho, pelo apoio e carinho.

Ao meu irmão Alex Vieira, minha cunhada Manoela Ramos Lemos Vieira, e ao meu sobrinho João Pedro Lemos Vieira, pelo incentivo.

Ao meu irmão Alan Vieira, e minha irmã Débora Ribeiro pelo apoio e carinho.

Ao meu pai Mauro Rodrigues Vieira por seu apoio.

À minha mãe Irma da Conceição Palhano Vieira que soube entender todos estes momentos ao longo de dois anos de dedicação, que sempre me apoiou, incentivou, e acreditou na minha capacidade, por seu infinito amor, paciência, conselhos, por seu carinho e respeito.

A todos os que de forma direta ou indireta estiveram envolvidos com a minha formação, que se dedicaram, e que acreditaram que era possível.

E principalmente a Deus por me capacitar todos os dias, por me fortalecer, por me dar entendimento, conhecimento, discernimento e sabedoria em todos os momentos.

“Aprendi que se eu jamais voltar a buscar os anseios do meu coração, não irei procura-los além do meu próprio quintal, e se não estiverem lá! É porque realmente nunca foram meus!” (L. Frank Baum).

BIOGRAFIA

ALESON VIEIRA, filho de Mauro Rodrigues Vieira e Irma da Conceição Palhano Vieira nasceu em Alta Floresta – MT, no dia 08 de março.

Em 2004 ingressou na Universidade do Estado de Mato Grosso, e em Fevereiro de 2009 graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biologia, no município de Alta Floresta.

Em março de 2009 mudou-se para Viçosa-MG, onde permaneceu como bolsista de DTI – III, pelo Projeto Genosoja, durante dois anos, no Laboratório de Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em novembro de 2011 foi aprovado em primeiro lugar, para a primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de mestrado pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT).

Em fevereiro de 2012 matriculou-se e em março do mesmo ano iniciou as disciplinas nos câmpus de Alta Floresta, Tangará e Cáceres – Mato Grosso.

Em dezembro de 2013 submeteu-se à defesa de dissertação no campus Universitário de Alta Floresta, sob orientação da Prof^a Dr^a Isane Vera Karsburg.

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	xii
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 FAMÍLIA Orchidaceae	2
2.2 GÊNERO <i>Catasetum</i>	5
2.3 CITOGENÉTICA	9
2.4 CITOMETRIA DE FLUXO	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS	15
3.2 CITOGENÉTICA	15
3.2.1 ANÁLISES DOS DADOS CROMOSSÔMICOS	16
3.3 CITOMETRIA DE FLUXO	17
3.3.1 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 CITOMETRIA DE FLUXO	19
4.2 CITOGENÉTICA	23
5. CONCLUSÕES	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Histograma representando os núcleos corados com iodeto de propídeo das espécies (A) *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade. (2010), (B) *Catasetum boyi* Mansf. (1930), (C) *Catasetum blackii* Pabst. (1964), (D) *Catasetum fimbriatum* Lindl. (1850), (E) *Catasetum juruenense* Hoehne. (1915), (F) *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda. (1992).....22
- Figura 2 – Metáfase mitótica de *Catasetum x altaflorestense* $2n=4x=80$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$25
- Figura 3 – Metáfase mitótica de *Catasetum boyi* $2n=3x=54$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$27
- Figura 5 – Metáfase mitótica de *Catasetum fimbriatum* $2n=6x=108$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$30
- Figura 6 - Metáfase mitótica de *Catasetum jururenense* $2n=3x=66$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$32
- Figura 8 - Dendrograma representado pela distância entre vizinho mais próximo, relação das espécies de *Catasetum* e do híbrido (1 – *C. x altaflorestense*, 2 – *C. blackii*, 3 – *C. boyi*, 4 – *C. fimbriatum*, 5 – *C. juruenense*, 6 – *C. schimidtianum*), com base na análise do cariótipo.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Quantificação do conteúdo de DNA nuclear, em pictogramas, das espécies <i>Catasetum x altaflorestense</i> Benelli & Grade., <i>Catasetum boyi</i> Mansf., <i>Catasetum blackii</i> Pabst., <i>Catasetum fimbriatum</i> Lindl., <i>Catasetum juruenense</i> Hoehne., <i>Catasetum schimidtianum</i> Miranda & Lacerda., utilizando se de iodeto de propídeo como fluorocromo e <i>Solanum lycopersicum</i> (2C=1,95 pg) como padrão interno.	19
Tabela 02 – Número cromossômico das espécies de <i>Catasetum</i> , do híbrido natural, e os valores citados na literatura.....	23
Tabela 03 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do <i>Catasetum x altaflorestense</i> Benelli & Grade (2010) 2n=4x=80 cromossomos.....	26
Tabela 04 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do <i>Catasetum boyi</i> Mansf (1930) 2n=3x=54 cromossomos.....	28
Tabela 05 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do <i>Catasetum blackii</i> Pabst (1964) 2n=3x=66 cromossomos.....	29
Tabela 06 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do <i>Catasetum fimbriatum</i> Lindl (1850) 2n=6x=108 cromossomos.	31
Tabela 07 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do <i>Catasetum juruenense</i> Hoehne (1915) 2n=3x=66 cromossomos.....	33
Tabela 08 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do <i>Catasetum schimidtianum</i> Miranda & Lacerda (1992) 2n=3x=54 cromossomos.....	34
Tabela 09 - Índice de assimetria intracromossômica (A1) e intercromossômica (A2) de cinco espécies e um híbrido natural.	35
Tabela 10 – Valores médios encontrados pelo programa estatístico R para a montagem do dendograma	37

RESUMO

VIEIRA, Aleson, Msc., Universidade do Estado de Mato Grosso, Dezembro de 2013, CITOGENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE CINCO ESPÉCIES E UM HÍBRIDO DO GÊNERO *Catasetum* (ORCHIDACEAE). Orientadora: Isane Vera Karsburg. Conselheiros: Nair Dahmer e Wellington Ronildo Clarindo.

O Brasil possui uma flora orquidológica privilegiada, com ocorrência de 2500 a 3000 espécies entre 195 gêneros. Dentre estes destaca-se o gênero *Catasetum*, o qual possui aproximadamente 300 espécies. Com o presente trabalho objetivou-se a caracterização citológica a partir da análise da morfometria cromossômica e quantificação do DNA por citometria de fluxo das espécies *Catasetum boyi* Mansf (1930), *Catasetum blackii* Pabst (1964), *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850), *Catasetum juruenense* Hoehne (1915), *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992), e do híbrido *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade (2010), a fim de contribuir para o conhecimento da variabilidade cariológica dessas plantas e gerar resultados que possam fornecer subsídio para caracterizar o gênero. As sementes de cápsulas maduras de *Catasetum* foram esterilizadas e semeadas em frascos contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. Para o bloqueio celular foi usado o herbicida trifluralim 3 µM, e as radículas ficaram em contato com o anti-tubulinico durante 18 horas a 4°C. A metodologia para o preparo das lâminas foi seguida de acordo com Carvalho & Saraiva, (1993), pela técnica de dissociação celular, e as lâminas foram coradas com 5% de solução de Giemsa. As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A partir das avaliações citológicas, da análise estatística e da quantificação de DNA por citometria de fluxo realizada com as cinco espécies do gênero *Catasetum* e o híbrido natural, podemos concluir que o híbrido *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade (2010) é um tetraploide 2n=4x=80 com 20 grupos cromossômicos, os quais foram classificados como sendo 7m+13sm e a mesma possui o valor de 6.04 picogramas de DNA; esta encontra-se no mesmo grupo de similaridade que a espécie *Catasetum blackii* Pabst (1964), que é um triploide 2n=3x=66, e seus cromossomos foram agrupados em 22 grupos e classificados como 11m+11sm, a espécie possui o valor de 6.06 picogramas de DNA; o

Catasetum boyi Mansf (1930) que é um triploide $2n=3x=54$ organizados em 18 grupos cromossômicos com $9m+9sm$ e 6.03 picogramas de DNA encontra-se no mesmo grupo de similaridade do *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992) o qual também é um triplóide com $2n=3x=54$ cromossomos organizados em 18 grupos os quais são classificados como sendo $15m+3sm$, esta espécie possui 6.05 picogramas de DNA. A espécie *Catasetum juruenense* Hoehne (1915) é classificada como um triploide com $2n=3x=66$ cromossomos, agrupados em 22 grupos com $15m+7sm$, seu valor de DNA em picogramas é de 6.06; os valores encontrados pela análise estatística a colocou em um grupo distinto muito próximo às espécies *C. boyii* e *C. schimidtianum* devido ao seu índice de similaridade interespecífica com estas espécies; e a *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) encontra-se isolada dos demais grupos das espécies avaliadas, uma vez que esta é a única que apresentou valores mais discrepantes por ser um hexaplóide $2n=6x=108$ cromossomos os quais foram agrupados em 18 grupos com $6m+12sm$ e possui 11.34 picogramas de DNA, valor este quase que o dobro das demais espécies avaliadas.

Palavras-chave: Amazônia, Cromossomos, Orchidaceae

ABSTRACT

VIEIRA, Aleson, MSc., Mato Grosso State University, December 2013, CYTOGENETIC AND DNA QUANTIFICATION OF FIVE SPECIES AND A HYBRID FROM THE GENUS *Catasetum* (ORCHIDACEAE). Advisor: Isane Vera Karsburg. Counselors: Nair Dahmer and Wellington Ronildo Clarindo.

Brazil has a privileged orchid flora, with 2500 to 3000 species from 195 genus, among those stands out the genus *Catasetum*, which has about 300 species. The present work aimed the cytological characterization, based on chromosomal morphometric analysis and DNA quantification by flow cytometry of the species *Catasetum boyi* Mansf (1930), *Catasetum blackii* Pabst (1964), *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850), *Catasetum juruenense* Hoehne (1915), *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992), and the hybrid *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grill (2010), in order to contribute to the knowledge of the cytological variability of these plants and found results which can provide subsidy to characterize the genus. The seeds from ripe capsules of *Catasetum* were sterilized and seeded in pots with the medium MS (Murashige and Skoog, 1962) plus 1.0 g L^{-1} of activated charcoal, 30.0 g L^{-1} of sucrose and 7.0 g L^{-1} of agar. For the cell block it was used the herbicide trifluralim at 3 mM, and the rootlets were kept in contact with an anti-tubulinic for 18 hours at 4°C . The methodology for the slides preparation was according to Carvalho & Scott (1993), through the cell dissociation technique, and stained slides with 5% of Giemsa solution. The cytometric analyzes were performed at the Plant Cytogenetics and Vegetal Cytometry Laboratory, located in the General Biology Department (DBG) of the Viçosa Federal University (UFV). The results of the cytological evaluations, statistical analysis and DNA quantification by flow cytometry performed with the five species of the genus *Catasetum* and the natural hybrid showed that the hybrid *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grill (2010) is a tetraploid $2n=4x=80$ with 20 chromosomal groups which have been classified as $7m+13sm$ and has a value of 6:04 picograms of DNA, so that it is in the same similarity group as the species *Catasetum blackii* Pabst (1964) which is also a triploid $2n=3x=66$, with chromosomes grouped into 22 groups and classified as $11m+11sm$, with a value of 6:06 picograms of DNA. *Catasetum boyi* Mansf (1930) is a triploid $2n=54=3x18$ arranged in 18 chromosomal groups with $9M+9sm$ and 6:03 picograms of DNA, so that it is in the same similarity group as the *Catasetum schimidtianum*

Miranda & Lacerda (1992) which is also a triplóide with $2n=3x=54$ chromosomes arranged in 18 groups classified as $15m+3sm$, with 6:05 picogramas of DNA. The species *Catasetum juruenense* Hoehne (1915) is classified as a triploid with $2n=3x=66$ chromosomes, grouped into 22 groups with $15m+7sm$ and value in picograms of DNA of 6.06. The results found by statistical analysis showed this species in a very distinct group near the *C. boyii* and *C. schimiditium* due to its index of interspecific similarity with these species. The *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) was found isolated from other groups of species assessed, since this is the only one who had high discrepant values, this is a hexaploid $2n=6x=108$ chromosomes, grouped in 18 groups with $6m+12sm$ with 11:34 picograms of DNA, a value that is almost double compared to the other species evaluated .

Keywords: Amazon, Chromosome, Orchidaceae

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma flora orquidológica privilegiada, com ocorrência de 2500 a 3000 espécies entre 195 gêneros, distribuídas por todos os biomas; é o terceiro país mais rico em espécies, depois da Colômbia e do Equador. No entanto, este número é constantemente alterado com novas descobertas em locais pouco ou não estudados, o que leva a uma grande escassez de pesquisas sobre os gêneros de Orchidaceae (Dressler, 1993; Barros, 1996; Nogueira, 2004).

Dentre os gêneros encontrados no Brasil, o gênero *Catasetum* é o que mais desperta interesses em botânicos e zoólogos, em razão de sua incrível adaptação à entomofilia e ao trimorfismo em suas flores (ABRACC, 1998^a; Raposo, 1992).

O gênero *Catasteum* foi descrito pela primeira vez em 1822 por C.S. Kunth, baseado em informações de L.C. Richard, publicado em Synopsis Plantarum 1: 330-331, sendo o *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth a espécie tipo. Este gênero possui mais de 166 espécies, distribuídas pelas Américas Central e do Sul; no Brasil podem ser encontradas 94 espécies e 6 híbridos naturais (ABRACC, 1998^a; Karsburg, 2011).

Com maior quantidade de plantas terrestres ou epífitas, o habitat deste gênero se estende desde o México até a Argentina, com um centro de radiação no Brasil. Essas plantas vegetam em segmentos de troncos de árvores velhas, onde existe acúmulo de material orgânico em decomposição, expostos geralmente a grande radiação solar (Mendonça & Lins, 2000).

As informações referentes à caracterização genética das espécies são de grande importância para o estudo da evolução, pois o processo evolutivo dos seres vivos tem sido auxiliado por dados citogenéticos (Guerra, 1988).

A evolução dos organismos tem como base a ocorrência de variabilidade genética e a ação de seleção natural, portanto, a evolução pode ser definida como sendo qualquer alteração na frequência dos alelos, genótipos, ou conteúdo genético ao longo das gerações (Freitas & Bered, 2003).

A citogenética é uma ciência voltada para estudos de observação dos cromossomos por meio de técnica de coloração, de modo a contá-los ou proceder com quaisquer outras análises morfológicas, melhorar o entendimento do processo de divisão celular e de modificação que acontecem na estrutura cromossômica

(Sodré, 1999). Essas técnicas contribuem na organização, função, replicação, variação ou evolução dos cromossomos (Peñasola, 2005).

Os dados citogenéticos são facultativos em ser utilizados na sistemática vegetal, sendo um dos mais importantes instrumentos para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução, tanto dentro de pequenos táxons quanto em níveis superiores. Apesar do uso cada vez maior de técnicas refinadas de citogenética, o principal instrumento ou parâmetro continua sendo a variabilidade cromossômica numérica (Guerra, 1986; Stebins, 1996).

Para o estabelecimento de relações entre espécies, a análise do cariótipo fornece informações essenciais a respeito da organização dos cromossomos (Peñasola, 2005). As variações cromossômicas numéricas de um táxon permite reconhecer o número básico do grupo, o qual constitui o principal instrumento para a análise citotaxonômica (Félix & Guerra 2000).

A quantificação do conteúdo de DNA tem sido reconhecida como um relevante parâmetro para caracterização genômica, com aplicação aos estudos evolutivos, além de fornecer informações úteis para o planejamento de projetos de sequenciamento e em trabalhos envolvendo marcadores moleculares (Bennett & Leitch 2005).

Com o presente trabalho objetivou-se a caracterização citológica, a partir da análise da morfometria cromossômica e quantificação do DNA por citometria de fluxo das espécies *Catasetum boyi* Mansf (1930), *Catasetum blackii* Pabst (1964), *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850), *Catasetum juruenense* Hoehne (1915), *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992), e do híbrido *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade (2010), a fim de contribuir para o conhecimento da variabilidade cariológica dessas plantas e gerar resultados os quais possam fornecer subsídio para caracterizar o gênero.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA Orchidaceae

A família Orchidaceae é considerada por alguns autores como a maior família das fanerógamas (Bechtel et al., 1992). Dentro do grupo de plantas com

flores, compreende cerca de 35.000 espécies distribuídas em seis tribos, 80 subtribos, e cerca de 750 gêneros (Heywood & Iriondo, 2003); possui ainda um grupo com mais de 100.000 híbridos desenvolvidos nos últimos 150 anos, tanto por cruzamentos naturais quanto artificiais (Faria et al., 2001; Moreira & Isaias, 2008).

De acordo com o sistema de classificação de plantas mais recente (APG III), que é baseado em dados morfológicos e moleculares; a família Orchidaceae encontra-se posicionada na ordem Asparagales, a qual ainda recebe tratamentos para maiores esclarecimentos sobre os verdadeiros posicionamentos dos gêneros que a compõem. Suas espécies podem ser encontradas em quase todos os lugares do planeta, com grande diversidade nos trópicos, não ocorrendo apenas nas regiões polares e desérticas (Dressler, 1993; Judd et al., 2009).

Em orquídeas, os estudos taxonômicos iniciaram com análise de estruturas florais, contudo estes se mostraram pouco informativos, devido às frequentes formas intermediárias observadas entre os grupos e a abundância de caracteres basais e derivados encontrados simultaneamente em uma mesma espécie. Este gradiente de classificação dos caracteres morfológicos dentro de uma mesma população pode fazer com que, dependendo do tratamento taxonômico empregado, seja reconhecida a ocorrência de uma, duas ou mais espécies. O resultado disso é a existência de diferentes sistemas de classificação, os quais podem ser falhos, dado o alto nível de convergência dos caracteres morfológicos em Orchidaceae. Portanto, o estudo de características que não sejam influenciadas por variações ambientais, tais como marcadores moleculares e citogenéticos são valiosos para melhor classificação taxonômica e filogenética (Dressler, 1993).

A família Orchidaceae possui uma grande variabilidade em relação ao número de cromossomos de suas espécies (Blumenschein, 1957), os quais se estendem entre os limites de $2n=12$ em *Psymorchis pusilla* (L.) até $2n=240$ em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl.. Em *Epidendroideae* o número básico da família não está claro, tendo-se sugerido $x=5$ (Dodson, 1957), e $x=10$, devido à alta frequência da ocorrência de $n=10$ e $n=20$ (Conceição et al., 2006) e $x=7$, devido à frequente ocorrência de $n=21$ (Félix & Guerra, 2000). Considerando-se $x=7$, a série poliplóide principal seria $n=7, 14, 21$, com variação ± 1 em cada nível de ploidia e, considerando a disploidia, frequente na maioria das tribos de *Epidendroideae*, levaria aos números básicos secundários de $x=21, 20$ e 19 (Félix & Guerra, 2010).

Na família Orchidaceae muitas espécies ou gêneros são restritos a determinadas regiões do mundo, dependendo das condições climáticas e vegetacionais de cada local, sendo comum na família a alta representatividade de espécies endêmicas. No Brasil, segundo Barros et al. (2012), ocorrem aproximadamente 2.433 espécies e 236 gêneros, distribuídos por todas as regiões do país, principalmente pela plasticidade adaptativa, sendo capazes de habitar lugares em condições extremas, o que pode ocasionar variação nas formas de vida, podendo ser terrestre, rupícolas, saxícolas, aquáticas, mico-heterotróficas e predominantemente epífitas (aproximadamente 70% das espécies) (Koch & Silva, 2012).

De acordo com Dressler (1981, 1993), em média duas em cada três espécies de Orchidaceae são epífitas. Pela dependência da umidade e do substrato arbóreo, a diversidade de epífitas pode ser usada como indicador ecológico de qualidade e conservação de florestas úmidas. Por exigir adaptações específicas, o epifitismo pode proporcionar maior acesso à luz e diminuição da competição (Kersten 2006).

As espécies epífitas correspondem à parte significativa da diversidade vegetal e contribuem positivamente para tornar as florestas tropicais úmidas um dos mais complexos ecossistemas da biosfera (Kersten 2006). Segundo Nadkarni (1986), a capacidade destas florestas em abrigarem grande número de animais pode ser atribuída ao substrato e sustento providos pelas epífitas, e por sua respectiva capacidade de retenção de nutrientes da chuva, neblina e partículas em suspensão.

Estruturalmente podem possuir raízes com micorrizas, tuberosas ou não, em geral com velame, que caracteriza-se por ser uma camada esbranquiçada de células mortas, cuja função é de proteção contra choques mecânicos, ataque de insetos e/ou armazenamento de nutrientes. E, em algumas espécies áfilas, fazem o papel das folhas, realizando a fotossíntese, podendo também apresentar caule simpodial ou monopodial, muitas vezes rizomatoso, mais raramente cormos, internós frequentemente formando pseudobulbos (Koch & Silva, 2012).

Suas folhas são alternas, raramente opostas, dísticas ou espiraladas, simples, inteiras, com nervação usualmente paralelinérvia. Inflorescências racemosas ou paniculadas, algumas vezes reduzidas a uma única flor, terminais ou laterais. As flores são caracterizadas por apresentar 3 sépalas, livres ou conatas; 3

pétalas, livres, a mediana diferenciada em labelo, as laterais semelhantes às sépalas; estames 1 ou 2 (raramente 3), adnatos ao estilete e ao estigma formando a coluna; pólen em geral agrupado em polínias; gineceu sincárpico, tricarpelar; estigma com um dos lobos não receptivo na face dorsal formando o rostelo, este podendo ou não formar estipe e/ou viscido; ovário ínfero, unilocular com placentação parietal, ocasionalmente trilocular com placentação lateral; óvulos numerosos (Koch & Silva, 2012).

Néctar em geral ausente, quando presente produzido em cálcar ou em nectários septais. Fruto cápsula, abrindo por (1-) 3 ou 6 fendas longitudinais; sementes minúsculas, com tegumento membranáceo, embrião muito reduzido e endosperma ausente (Dahlgren et al., 1985; Dressler, 1993).

As plantas da família Orchidacea apresentam sexualmente características particulares, tais como, a fusão das estruturas reprodutivas (androceu e gineceu) resultando num ginostêmio, a diferenciação de uma das pétalas do labelo e grãos de pólen em mássulas ou polínias (Koch & Silva, 2012); a autopolinização espontânea tem sido identificada em várias espécies de orquídeas (Van Der Pijl & Dodson 1966, Catling 1990, Catling & Catling 1991). A autopolinização é considerada como um processo complexo que pode acontecer de diversas maneiras (Lloyd & Schoen 1992). Uma delas é a cleistogamia, um tipo de autogamia que tem sido identificado em mais de 56 famílias, incluindo Orchidaceae (Lord, 1981, Van Der Pijl & Dodson 1966).

2.2 GÊNERO *Catasetum*

O gênero *Catasetum* foi descrito em 1822 por L.C. Richard ex Kunth. Seu nome deriva do grego “Kata”, que significa fimbria e “Seta”, que pode ser traduzido como encrespado, devido à forma de suas flores, podendo ainda ser entendido por “cerdas para baixo”. Este gênero possui aproximadamente 300 espécies e há várias décadas desperta interesses em botânicos e zoólogos devido a seu trimorfismo sexual (Endsfeldz, 1998).

O *Catasetum* apresenta flores femininas, masculinas e ou hermafroditas. As flores masculinas apresentam um mecanismo de disparo que ejeta as polínias juntamente com o retináculo sobre os polinizadores (Dressler, 1993, Singer, 2004).

Também são mais coloridas e efêmeras que as flores femininas, que em geral são esverdeadas, mais duradouras e coriáceas (Dressler, 1993).

A diferença entre flores diclinas masculinas e diclinas femininas é acentuada, sendo que estas já foram descritas em gêneros distintos; as diclinas masculinas foram descritas como sendo pertencentes ao gênero *Myanthus*, e as diclinas femininas, como representantes do gênero *Monochantus* (Decker, 1946).

O *Catasteum altaflorestense* é um híbrido natural endêmico do município de Alta Floresta – MT; foi descrito por Benelli & Grade (2010); seus parentais são as espécies *C. osculatum* K.G. Lacerda & V. P. Castro e *C. schmidtianum* F. E. Miranda & K. G. Lacerda (Petini & Grade, 2010).

O híbrido *C. x altaflorestense* e a espécie *C. schmidtianum* ocorrem na mesma área, frequentemente são encontradas vegetando associadas no mesmo forófito: *Maximiliana maripa*. A co-habitação de ambas ocorre por toda a área observada, sendo o segundo parental relacionado, *C. osculatum*, encontrado num raio de 10 km, o que torna possível a hibridação natural, considerando que as Euglossini, abelhas observadas visitando os exemplares, alcançam até 20 km de vôo (Roubik, 2001).

Há ainda que considerar que as espécies aqui referidas como parentais (*C. osculatum* e *C. schmidtianum*) têm fenologia muito similar e a floração ocorre no mesmo período para ambas, além disso, as duas *Catasetinae* são dominantes absolutas, não havendo ocorrência de outras espécies no local (Petini & Grade, 2010)

O *Catasetum x altaflorestense* é uma epífita com pseudobulbos robustos, fusiforme cilíndricos, com 10,0 - 25,0 cm de comprimento e de 3,0 - 5,0 cm diâmetro, possui folhas obovadas de 20,0 - 30,0 cm de comprimento por 10,0 - 15,0 cm de largura, são verde-escuras, com nervuras proeminentes na face abaxial, base atenuada, formando pseudopécíolo, ápice levemente acuminado; sua inflorescência é racemosa, com 15,0 - 40,0 cm de comprimento x 0,5 - 0,7 cm de largura, multiflora, com flores dispostas nos dois terços apicais (Petini & Grade, 2010).

Suas brácteas florais são triangulares, 1,2 x 0,6 cm, base dos segmentos esverdeados; sépala dorsal oblonga, ca. 4,0 x 1,0 cm, carnosa, ereta, levemente côncava, base atenuada, ápice acuminado, freqüentemente esverdeadas ou marrom-avermelhadas, ocasionalmente pintalgadas; sépalas laterais oblongas, ca. 4,0 x 1,1 cm, carnosas, patulares e levemente reflexas, margem convoluta próxima

ao ápice, ápice acuminado; pétalas oblongoovaladas, ca. 4,2 x 1,6 cm, patentes, levemente membranáceas nos bordos, base atenuada, ápice abruptamente acuminado; labelo cuculado, ca. 1,0 cm profundidade x 1,2 cm larg., ínfero, espessamente carnosos, rijos, saquiformes, parte dorsal da protuberância arredondada, na face anterior depresso, óstio de âmbito elíptico, lobo mediano apiculado, ca. 1,0 - 2,0 cm compr. x 1,0 - 3,0 cm de largura (Petini & Grade, 2010).

Possui lobos laterais amplos e patentes, ocasionalmente convolutos, verde-amarelados até marrom-escuro, pintalgado de marrom-avermelhado ou marrom-café, todo o labelo apresenta muitas protuberâncias minúsculas, as quais são pintalgadas, margem fimbriada; polinário ca. 0,5 x 0,1 cm, 2 polínias, setas curvas, ca. 1,0 - 1,2 x 0,1 cm, carnosas, cruzam-se próximo à base da coluna, a antena esquerda sempre posicionada sobre a direita e prolongando-se sobre o centro do óstio; flores femininas não observadas; fruto não observado (Petini & Grade, 2010).

A *Catasetum blackii* caracteriza-se por ser uma epífita, com pseudobulbo com tamanho entre 10,5 x 1,5 cm, com entrenós. Suas folhas são lanceoladas e podem medir em média 27,6–36,5 x 2,3–6,2 cm; quando em período de floração a espécie pode apresentar um grande número de flores, as quais possuem pedúnculo de 0,5–0,6 a 48,4–61,2 cm; sua flor é estaminada ressupinada com brácteas florais que variam de 0,8 x 0,3 até 9–18 cm; sépala dorsal 3–3,4 x 0,8–1,1 cm; sépalas laterais 2,8–3,4 x 0,7–0,9 cm; pétalas 2,6–3,6 x 0,6 cm, sem máculas; labelo 1,8–2,1 x 1–1,7 cm, livre, membranoso, trilobado, semiexplanado, sem nervuras, lobos laterais ca. 0,7 x 1 cm, semiarredondados, revolutos, margem fimbriada; lobo mediano 1,1–1,4 x 0,6–1,3 cm, plano, liguliforme, calosidade linear na face livre; polinário ca. 0,8 x 0,3 cm; antenas com 0,7–0,8 cm de comprimento; flor pistilada não vista (Bastos & Berg, 2012).

A espécie *C. blackii* foi considerada por Holst (1999) uma espécie rara da região do entorno do Rio São Francisco, citada apenas para o sudoeste da Bahia e nordeste de Minas Gerais, mas ocorre também na Chapada Diamantina, conforme Toscano de Brito (1995), sua floração ocorre entre os meses de novembro e março (Barros et al. 2010).

A *Catasetum boyi* Mansf (1930) está depositada no herbário Royal Botanic Garden; caracteriza-se por ser uma epífita com flores em torno de 4,5 cm; esta espécie é naturalmente encontrada no estado do Amazonas – Brasil (Neto & Baptista, 2007).

A espécie *Catasetum fimbriatum* Lindley, é epífita apresenta partes vegetativas compatíveis com as de qualquer outra espécie de *Catasetum*. Apresenta inflorescência pendente com muitas flores. As flores são esverdeadas com máculas marrons e o labelo apresenta margem fimbriada. Em Mato Grosso é comum em áreas abertas, sendo coletada em cerrado, na região sudoeste (Koch & Silva, 2012). Sua distribuição ocorre pela Argentina, Bolívia e Brasil. No Brasil pode ser encontrada no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul (Koch & Silva, 2012).

As folhas da *C. fimbriatum* são finas, elípticas, geralmente de cor verde clara, sempre apresentando-se em número de 2 a 7 por pseudobulbo e com uma variação de 15 a 35 cm de comprimento (Scaglia, 1998).

Segundo Hoehne (1938), as inflorescências apresentam-se de modo raciforme e de acordo com a diferenciação sexual, podem ser variáveis em comprimento, eretas ou arqueadas, apresentando de 2 a 28 flores, sendo que a haste floral nasce bem próxima à base do pseudobulbo, constituindo assim uma planta pleuranta. As flores de *C. fimbriatum*, organograficamente podem ser classificadas como: incompletas, diclamídeas (heteroclamídeas) e zigomorfas. Também possuem pétalas e sépalas (em número de 3) verde-amareladas que apresentam, por sua vez, máculas transversais avermelhadas (Endsfeldz, 1999).

O labelo de cor verde-amarelado apresenta-se lacerado, em forma de leque, apresentando uma cavidade bastante larga, onde encontra-se uma saliência triangular distal em relação à sua base. Tal estrutura possui também muitas fímbrias, as quais dão nome à espécie, geralmente de cor amarela (Bicalho & Barros, 1988).

Decker (1946) citou a presença de dois cirros na coluna que estão diretamente relacionados com a espetacular adaptação para a obtenção da fecundação cruzada, através 12 da ejeção da polínaria sobre o dorso do agente polinizador (*Euglossa* sp), quando este os toca.

As flores diclinas femininas, extremamente perfumadas, possuem uma estrutura grosseira, de textura muito carnosa, onde o labelo ocupa a posição da sépala dorsal em relação às flores diclinas masculinas. Estas flores surgem em inflorescências eretas, em pequeno número, geralmente 2 a 6, sendo que estas apresentam cor verde matizado de amarelo. As flores diclinas masculinas surgem

em uma inflorescência arqueada podendo apresentar mais de 20 flores (Hoehne, 1938)

As flores monoclinas desta espécie apenas foram descritas ocupando um espaço intermediário entre as flores diclinas masculinas e diclinas femininas de uma mesma inflorescência, ou seja, a zona mediana, precedida pela zonal basal, onde se encontram as flores diclinas femininas, e anterior à zona apical, caracterizada pela presença das flores diclinas masculinas (Decker, 1946). As flores monoclinas são formadas pela “mistura” das peças florais das flores diclinas masculinas e femininas, mas não se apresentam totalmente férteis, isto é, se o estigma apresentar-se fértil, as massas polínicas não o serão (ou não se encontrarão presentes). Por sua vez, se as massas polínicas forem viáveis, o estigma não o será (Hoehne, 1938).

A *Catasetum juruenense* também caracteriza-se por ser uma espécie epifítica, reconhecida principalmente pelas sépalas e pétalas marrons e labelo verde, carnosos e de margem denticulada. Pode ser encontrada em margens de rios. Segundo Miranda (1996), *Catasetum juruenense* tem ocorrência restrita a florestas de terra firme e margens dos afluentes do rio Tapajós. Em Mato Grosso foi coletada em floresta de terra firme, no extremo norte, nas proximidades do rio Teles Pires. Endêmica do Brasil e do Estado de Mato Grosso sua floração sob cultivo ocorre entre os meses de agosto e setembro (Koch & Silva, 2012).

Catasetum schmidtianum foi descrita por Miranda & Lacerda, é uma espécie epífita, com pseudobulbos alongados, suas folhas são acuminadas e possuem nervuras espessas, sua flor apresenta pétalas e sépalas lanceoladas, de cor marrom, no lado exterior e amarelado, pintalgadas de púrpura, no lado interior; nativa do Rio Sepotuba, em Mato Grosso sua floração ocorre no verão (Silva & Silva, 1998).

2.3 CITOGENÉTICA

A citogenética é a área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (Guerra, 1988). É uma das fontes geradoras de questionamentos que impulsionaram a genética molecular, a biotecnologia e a

engenharia genética, permanecendo junto às mesmas como um dos recursos de avaliação em várias pesquisas dessa natureza (Sacchet, 1999).

A citogenética clássica desenvolveu-se, principalmente, a partir do início do século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. A análise cromossômica é um dos campos estimulantes da citologia e da genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma (Brammer et al., 2007).

Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado (Guerra & Souza, 2002).

A análise cariotípica pode identificar alterações ou aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, além de possibilitar a descrição do comportamento meiótico, provendo informações, como taxa de fertilidade, problemas em relação ao pareamento ou reconhecimento dos cromossomos homólogos nos parentais e na progênie híbrida, além dos casos de não disjunção, ou seja, não segregação das cromátides nas anáfases, o que pode levar a formação de gametas aneuploides. Por outro lado, a caracterização citogenética detalhada, como o mapeamento físico cromossômico, possibilita a descrição clara da homologia cariotípica de uma determinada cultivar ou variedade (Singh, 1993).

A análise citogenética clássica, em geral, é realizada em cromossomos metafásicos mitóticos, corados com corante convencional como o Giemsa ou o Carmim Acético, por exemplo. Em uma análise de células mitóticas, aspectos como o número e comprimento dos cromossomos, razão entre braços cromossômicos, padrão de condensação e de coloração, além de características físicas adicionais, como presença e posição de constrição secundária, permitem a comparação de espécies e a identificação de variações cromossômicas inter e intraespecíficas (Guerra et. al, 2002).

A obtenção de bons resultados depende do perfeito domínio de diferentes técnicas de coloração. A utilização de corantes acidófilos na citogenética clássica possibilitou a visualização nítida dos cromossomos, revelando informações sobre

diversos parâmetros citogenéticos. Nas últimas décadas, o uso de técnicas citogenéticas tem fornecido informações importantes por meio da localização física de certos marcadores nos cromossomos (Penasola, 2005).

A caracterização citogenética evidencia marcadores citológicos que permitem identificar alterações numéricas e estruturais. Em geral, estas alterações cromossômicas podem implicar em diferenças fenotípicas, sendo importantes no entendimento dos processos evolutivos. Assim, estudos citológicos comparativos entre *taxa* têm contribuído para entender processos filogenéticos, com ênfase na citotaxonomia (Guerra, 1986).

A análise cariotípica relacionada à avaliação do número, tamanho dos cromossomos, relação entre braços, número e posição das constrições secundárias, podem trazer informações importantes na análise comparativa entre táxons aparentados ou mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Guerra et al., 2002).

Muitos pesquisadores constataram a dificuldade de que, grande número de determinações cromossômicas, citadas nas literaturas, são possivelmente incorretas. Isso devido à grande maioria das contagens cromossômicas serem feitas em um único indivíduo da espécie, assim, recontagens podem fornecer maior segurança quanto ao número básico real quanto à ocorrência de raças cromossômicas na espécie (Guerra, 1986).

O gênero *Catasetum* é pouco estudado, com relatos de número cromossômico para cerca de 15% das espécies. Apesar de o número básico citado para esse gênero ser $x=27$ (Jones & Darker 1968), Blumenschein (1960) contou $2n=56$ para três espécies pertencentes à seção *Eucatasetum* Roufe (Hoehne, 1949) e para uma espécie da seção *Myanthus* Lindl. Cerca de 40% das espécies de *Catasetum*, com número cromossômico conhecido, são poliplóides, apresentando $2n=108$ e/ou 162 (Blumenschein, 1960; Jones & Daker 1968; Félix & Guerra 2000).

No gênero *Catasetum*, as espécies rupícolas e terrestres apresentam níveis de ploidia superiores às das epífitas, sugerindo que a poliploidia pode estar envolvida na capacidade de ocupar esse tipo de habitat (Félix & Guerra 2000). A poliploidia é o tipo de variação cromossômica dominante na evolução vegetal (Stebbins, 1977; Guerra, 1988; Soltis & Soltis 1999). Pode ser vista como um mecanismo que pode aumentar a variabilidade genética dos indivíduos e é considerada um facilitador de especiação rápida (Soltis & Rieseberg, 1986; Soltis et al. 2007). Segundo Jones & Daker (1968), a poliploidia certamente fez sua parte na

evolução das espécies de *Catasetum* e pode ser uma das causas da variação intraespecífica do mesmo.

2.4 CITOMETRIA DE FLUXO

De acordo com Doležel (1997), a citometria de fluxo pode ser útil para controlar a estabilidade do nível de ploidia, identificar haplóides e duplo haplóides em culturas de anteras e ovários, verificar novos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, detecção de aneuploides, no estudo da apomixia, identificação do sexo em plantas dioicas, identificação de híbridos, identificação de polissomatia, acompanhamento do desenvolvimento da semente, identificação do produto de fusão de protoplastos. A análise do nível de ploidia é atualmente a aplicação mais comum da citometria de fluxo no melhoramento genético e produção de sementes.

A citometria de fluxo pode ser caracterizada como uma microfotometria fluorescente dinâmica (Greilhuber, 2007), que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, protoplastos, núcleos e cromossomos) em suspensão. A medida em fluxo da fluorescência emitida permite análises de alta velocidade e garante que essas partículas sejam selecionadas aleatoriamente em toda a população, sem qualquer subjetividade associada (Doležel, 1997).

A citometria de fluxo avalia a intensidade relativa de fluorescência dos núcleos isolados a partir de células obtidas de tecidos vegetais ou animais, resultando em um histograma típico. Esse histograma apresenta um pico maior (número de núcleos na fase G₀/G₁ do ciclo celular) e um pico menor (número de núcleos na fase G₂), enquanto a região entre os dois picos corresponde ao número de núcleos em fase S (Galbraith, et al. 1983; Price, et al. 2000; Doležel & Bartoš 2005).

Os trabalhos pioneiros de citometria de fluxo em plantas eram limitados pelas dificuldades em se obter células isoladas em suspensão com núcleos adequados para processamento no citômetro (Doležel 1997). Somente após o desenvolvimento de metodologias que tornaram o processo de obtenção de material nuclear relativamente rápido, a determinação do valor C em plantas passou a apresentar diversas aplicações (Doležel & Bartoš 2005; Clarindo, et al. 2008).

Com o surgimento da citometria de imagem e da citometria de fluxo, a citogenética vegetal foi ampliada. A associação dessas metodologias introduziu um novo escopo de estudo, principalmente pela possibilidade de aplicação no melhoramento, estudos filogenéticos e evolutivos de plantas e programas de sequenciamento genômico. Dentro desta linha de pesquisa, uma ampla fonte de dados pode ser obtida e associada como o número cromossômico (Rossi, et al. 2008), a autoploidia e alopoliploidia (Praça, et al. 2009), a estabilidade genômica em cultura de tecidos (Clarindo, et al. 2008), o estudo de ciclo celular com e sem tratamentos (Sandoval, et al. 2003). Estes dados também podem ser utilizados nas avaliações de variabilidade intra e interespecíficas (Volgmayr & Greilhuber, 1998; Vilhar, et al. 2001).

Segundo Greilhuber (2007), o termo citometria refere-se ao cálculo de medidas em células e tecidos, e surgiu a partir da necessidade de quantificar substâncias celulares. As medidas que apresentam maior interesse são as espaciais, como área e comprimento, e as densitométricas, obtidas pela quantificação da absorvância/transmitância.

Citometria – do gr., métron, instrumento de medição, e kitos, espaço oco, cavidade, célula (Ferreira. 1999) – é a medição de propriedades físico-químicas de partículas, especialmente células. Entre as propriedades possíveis de serem medidas por um citômetro estão as elétricas, acústicas, ópticas e a emissão de radiação nuclear (Shapiro. 2003).

A citometria de fluxo é a modalidade de citometria na qual as partículas a terem suas propriedades medidas passam através do sítio de medição impulsionadas pela vazão de um fluido no qual estão imersas. Dependendo do que se deseja medir, é necessário o uso de substâncias específicas – como corantes e luminescentes – com alguma característica mensurável que seja função da propriedade a ser determinada (Moraes, 2007).

O conteúdo de DNA de um núcleo haploide ou gamético de um organismo é denominado valor C de DNA (Bennett et al., 2008). Portanto, um núcleo na fase G1 do ciclo celular contendo duas cópias do genoma não replicado possui valor 2C de DNA (Bartos, 2005). O valor C já foi estimado por diversas metodologias distintas, como a citometria de imagem e a densitometria de Feulgen. Mais recentemente a citometria de fluxo vem sendo utilizada devido à facilidade de preparo das amostras e da eficácia comprovada do método. Diversas comparações interlaboratoriais já

foram feitas para validação da técnica para esta finalidade com a obtenção de resultados estáveis e promissores (Dolezel et al., 1998), sendo atualmente a metodologia mais utilizada para esta finalidade.

O conteúdo nuclear de DNA é geralmente expresso em picogramas (pg). No entanto, com o advento da biologia molecular e os avanços nos projetos de sequenciamento genético, houve uma tendência em expressar tal conteúdo em termos de quantidade de pares de base (bp). Para estimar o valor C de uma espécie deve-se proceder a análise desta juntamente com uma planta de valor C conhecido (padrão de referência). O conteúdo de DNA nuclear é calculado em função da relação da fluorescência entre as duas espécies (Dolezel, et al. 1998; Dolezel & Bartos, 2005).

Atualmente já se conhece o conteúdo de DNA nuclear de um grande número de espécies. Os resultados sugerem que a família Orchidaceae é, entre as angiospermas, a que possui maior variabilidade nos conteúdos de DNA nuclear (Leitch, et al., 1994) com valores entre 0,60 e 38,83 pg de DNA, uma variação de mais de 64 vezes. A variação entre todas as angiospermas vai de 0,0065 pg em *Genlisea margaretae* (Lentibulariaceae) a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (Liliaceae), uma variação de 2000 vezes (Leitch, et al. 1994; Bennet, 2007).

De acordo com Bennett & Leitch (2004), apenas 223 entre as mais de 24 mil espécies aceitas para a família Orchidaceae possuem estimativas para o valor C de DNA. Observa-se que estimativas para alguns gêneros são notavelmente ausentes como em *Brassavola*, *Catasetum*, *Encyclia* e inúmeros outros. Para outros como *Cattleya* e *Laelia*, as estimativas são mínimas. *Epidendrum*, o gênero mais numeroso da família, possui apenas uma estimativa. Acredita-se que a falta de dados para a família Orchidaceae utilizando a técnica da citometria de fluxo esteja relacionada às dificuldades em se obter estimativas precisas para esta família (Leitch, et al., 1994), possivelmente devido à natureza recalcitrante do tecido. Os procedimentos utilizados para as estimativas existentes variam muito, dificultando comparações.

Em estimativas do valor C de 70 espécies de orquídeas pertencentes a 26 gêneros distintos, Jones et al. (1998) utilizaram tanto padronização interna quanto externa. Além disso, foram utilizados glóbulos vermelhos de galinha como padrão de referência, procedimentos que podem levar a estimativas totalmente equivocadas (Bartos, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus Alta Floresta-MT, utilizando-se explantes de *Catasetum*, obtidos por cultivo *in vitro* sem o uso de fitoreguladores.

3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS

Cápsulas maduras foram coletadas de pendões florais de cada espécie de *Catasetum* do Orquidário Alta Florestense - UNEMAT. As sementes foram colocadas em frascos autoclavados para desinfestação superficial, e posteriormente imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2% de cloro ativo por 5 min, e enxaguadas por três vezes em água destilada autoclavada.

Uma amostra de 2 mL da solução final contendo sementes desinfestadas e água destilada esterilizada, foram homogeneizadas e com o auxílio de uma seringa estéril, semeadas em frascos contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da inclusão do ágar.

3.2 CITOGENÉTICA

Radículas de cada espécie cultivada *in vitro* em meio alternativo sem uso de fitoreguladores, foram lavadas em três trocas de água destilada durante 20 minutos.

Para o bloqueio celular foi usado o herbicida trifluralim 3 µM; as radículas ficaram em contato com o anti-tubulinico durante 18 horas a 4°C; posteriormente as raízes foram fixadas em metanol:ácido acético (3:1) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de solução. O fixador foi trocado três vezes, e as amostras foram armazenadas a 4°C (Carvalho et al., 2008).

Meristemas radiculares foram lavados, digeridos com enzima Pectinase Sigma[®] durante 2 horas a 34°C. Posteriormente as raízes foram lavadas com água destilada com três trocas consecutivas, e fixadas em metanol:ácido acético, após. O

material fixado foi armazenado sob refrigeração (4°C) por 24 horas antes do preparo das lâminas.

A metodologia para o preparo das lâminas foi seguida de acordo com Carvalho & Saraiva (1993), pela técnica de dissociação celular, para todas as espécies e o híbrido. As lâminas foram coradas com 5% de solução de Giemsa (Merck KGaA) em um tampão de fosfato (pH 6,8) durante 5 minutos, lavadas duas vezes em água destilada, secas ao ar e colocado numa placa quente a 50°C durante 5 min. Foram analisadas trinta metáfases, sendo as melhores imagens fotografadas com o uso de objetiva de 100X de um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e no software LAZ EZ V1. 7.0.

3.2.1 ANÁLISES DOS DADOS CROMOSSÔMICOS

As imagens foram analisadas através do software de domínio público Image/J versão 1.46r (2012) desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde (INS, Bethesda, MD, EUA), juntamente com a linguagem de programação Java versão 1.6.0 (2012) (Abramhoff et al. 2004), ambos podem ser obtidos via internet, pelo sítio <http://rsb.info.nih.gov/ij/> para o software ImageJ e <http://www.java.com/> para a linguagem Java.

Para as medidas dos valores de comprimento total do cromossomo, braço longo, braço curto, razão e índice centromérico, foi utilizado o programa de domínio público Micromasure for Windows, version 3.3, link: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micromasure>; que converte a escala de pixels para medidas em micrômetros (Reeves & Tear, 2000).

O índice de assimetria do cariótipo das espécies foi determinado segundo Zarco (1986), onde o índice de assimetria intraespecífica é igual a soma das médias dos braços curtos, dividida pela soma das média dos braços longos, e o total dividido pelo número de grupos cromossômicos; e o índice de assimetria interespecífico é igual a soma das médias dos braços curtos, dividida pela soma das médias do comprimento total, multiplicado por cem.

Os dados correspondentes às variáveis número de cromossomos, dados da citometria, número de cromossomos metacêntricos, número de cromossomos submetacêntricos, tamanho do maior cromossomo, tamanho do menor cromossomo,

comprimento do lote haploide, comprimento médio dos cromossomos, comprimento médio do braço longo, comprimento médio do braço curto, razão média entre os braços cromossômicos e índice centromérico médio foram analisadas por estatística multivariada, por meio de técnicas de análise de agrupamento. Como medida de dissimilaridade, foi utilizada a distância euclidiana média padronizada e como método hierárquico aglomerativo, o método de Ward (1963). Com base nos cálculos, foi estabelecido o dendrograma, o qual verifica o grau de similaridade entre as espécies similares, utilizando-se o programa R (2005).

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO

As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria de Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.3.1 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR

Folhas jovens de cada espécie e padrão foram simultaneamente colocadas em água destilada à temperatura de 4°C e cortadas em dois fragmentos de 2-cm. Os núcleos foram extraídos por corte “Chopping” (Galbraith et al., 1983) em 0,5 mL de OTTO-I de tampão de lise (Otto, 1990) suplementado com 2,0 mM de ditiotreitol (Sigma-Aldrich CHIEMIE GmbH, Steinheim, Alemanha) e 50 mg mL⁻¹ de RNase (Sigma -Aldrich CHIEMIE GmbH), pH 2,3 (Loureiro et al., 2006; Clarindo, 2008; Rosado et al., 2009). Subsequentemente, 0,5 ml do mesmo tampão foi adicionado.

A suspensão foi filtrada através de um filtro de nylon com uma malha de 30 mm de diâmetro (Partec GmbH, Munster, Alemanha), e transferida para micro tubos de centrífuga de - 2 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e centrifugado a 100 g (Clarindo, 2008; Rosado et al., 2009). Após 5 minutos, o sedimento foi incubado durante 5 – 20 minutos em 100 mL de OTTO-I de tampão de lise e coradas com 1,5 ml de solução de OTTO-II (Otto, 1990) suplementado com 75 mM de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich CHIEMIE GmbH) e 50 mg mL⁻¹ de RNase (Sigma-Aldrich CHIEMIE GmbH), pH 8,6.

A suspensão foi analisada com um citómetro de fluxo Partec PAS (Partec GmbH), equipado com uma fonte de laser (488 nm) e um filtro RG 610. O equipamento foi calibrado e alinhado com as soluções padrão, de acordo com as recomendações do fabricante (Partec GmbH); e o software FLOWMAX (Partec GmbH) foi utilizado para a análise de dados.

O tamanho do genoma nuclear das amostras foi medido por meio de picos correspondentes à média dos núcleos G0/G1 e o teor relativo de DNA das amostras e de plantas normais.

O pico do padrão de núcleos foi ajustado para o canal 200; e cinco repetições independentes de cada tratamento foram realizadas, com mais de 10 000 núcleos analisados em cada um, com o tamanho do genoma médio dado em picogramas (pg); o conteúdo de DNA nuclear foi calculado a partir do padrão interno.

Todos os histogramas de intensidade de fluorescência relativa foram avaliados no programa FlowMax Partec®. A razão entre as médias dos picos G0/G1 dos padrões de referência e das amostras foram calculadas e convertidas em picogramas (pg) de DNA.

O tamanho do genoma nuclear foi calculado a partir das leituras dos núcleos em G0/G1, de acordo com a fórmula: $Ca = Ca \times CP \div CP$, em que: Ca = Conteúdo da amostra e CP = Conteúdo do padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CITOMETRIA DE FLUXO

Os valores por citometria de fluxo do conteúdo de DNA dos núcleos corados com iodeto de propídeo na fase G0/G1 apresentaram um número até quatro vezes maior que o padrão utilizado *Solanum lycopersicum* (2C=1,95 pg) (Tabela 01); o coeficiente de variação para cada espécie foi baixo, ficando entre os valores de 0,22 e 0,87 %; CV menores que 3% são considerados de alto nível de resolução (Doležel, 1997) e indicam que os procedimentos de extração e coloração das suspensões nucleares possibilitaram a obtenção de núcleos intactos e uniformemente corados (Doležel, 1991; Yapaisan et al., 1999).

As variações no conteúdo de DNA podem implicar níveis de ploidia da espécie ou das populações (Yang e Loh, 2004; Galbraith et al., 2002). Na evolução os poliploides destacam-se por serem em geral bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros aos quais os progenitores diplóides não se mostram adaptados.

Tabela 01 – Quantificação do conteúdo de DNA nuclear, em pictogramas, das espécies *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade, *Catasetum boyi* Mansf, *Catasetum blackii* Pabst, *Catasetum fimbriatum* Lindl, *Catasetum juruenense* Hoehne, *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda, utilizando se de iodeto de propídeo como fluorocromo e *Solanum lycopersicum* (2C=1,95 pg) como padrão interno.

Espécies	DNA (pg)	CV (%)
<i>Catasetum x altaflorestense</i> Benelli & Grade.	6.04	0,61
<i>Catasetum boyi</i> Mansf.	6.03	0,74
<i>Catasetum blackii</i> Pabst.	6.06	0,64
<i>Catasetum fimbriatum</i> Lindl.	11.34	0,87
<i>Catasetum juruenense</i> Hoehne.	6.06	0,22
<i>Catasetum schimidtianum</i> Miranda & Lacerda.	6.05	0,29

Pg = pictogramas e CV = coeficiente de variação

O ponto de vista tradicional sobre a origem dos poliplóides era de que, após o evento de poliploidização, a nova espécie iria se expandir e colonizar novos

espaços. Isto foi contestado, principalmente, pelos trabalhos de Soltis & Soltis (1999), demonstrando que muitas das espécies poliplóides conhecidas, provavelmente a grande maioria, surgiram diversas vezes ao longo da evolução, envolvendo progenitores diversos.

A família Orchidaceae como um todo, parece ter uma correlação positiva entre conteúdo de DNA e o habitat terrestre (Leitch et al., 1994), o mesmo ocorrendo com a poliploidia no gênero *Oncidium* que parece relacionada ao habitat terrestre ou rupícola (Felix & Guerra, 2000). No gênero *Laelia* sl, as espécies também aparentam ter números cromossômicos mais elevados em representantes rupícolas do que epifíticos; no entanto para o gênero *Catasetum* podemos verificar uma maior quantidade no conteúdo de DNA, caracterizando as espécies analisadas como poliploides, sendo todas estas epífitas, demonstrando assim que há também uma correlação positiva entre conteúdo de DNA e sua estrutura vegetal.

Um grande número de trabalhos, principalmente usando análises de DNA nuclear, assim como informações morfológicas, citológicas e ecológicas, confirmam a origem polifilética da maioria das espécies poliplóides (Soltis & Soltis, 1999; Nelson & Elisens, 1999; Segraves et al., 1999; Sharbel & Mitchel-Olds, 2001).

Jones et. al (1998) em seu trabalho com a família Orchidaceae verificaram que pode haver uma variação no valor em picogramas de DNA entre espécies do mesmo gênero, tal qual foi verificado entre as espécies avaliadas do gênero *Catasetum*. Dentre quinze espécies examinadas dentro do gênero *Laeliinae* houve uma diferença de três vezes no tamanho do genoma entre as espécies *Broughtonia sanguinea* e a *Cattleya walkeriana*; além disso, a variação de tamanho não estava limitada ao nível intergenérico; entre as espécies de *Cattleya* houve uma diferença de duas vezes entre *C. forbesii* Lindl., *C. walkeriana* e *C. bowringiana*.

Meesawat et. al (2008) em seus trabalhos com *Dendrobium* verificaram que independente do explante a ser utilizado para avaliação ser *in vitro* ou *ex vitro* o valor de seu conteúdo de DNA não se altera; portanto podemos afirmar que os valores encontrados em *Catasetum* não sofreram alterações por terem sido obtidos por cultura *in vitro*; os autores em suas pesquisas encontraram valores de $2,43 \pm 0,06$ pg de DNA, valores estes que diferiram, porem não ficaram muito distantes dos de Jones et al. (1998) que encontraram $2,61 \pm 0,17$ pg em seus trabalhos; já os valores encontrados entre as espécies avaliadas do gênero *Catasetum*

apresentaram quantidades de DNA que demonstram as espécies serem triplóides, tetraplóides e hexaplóides (6,03 a 11,34 pg de DNA).

A Figura 01 apresenta os histogramas gerados pela citometria de fluxo, as espécies *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade (2010), *Catasetum boyi* Mansf (1930), *Catasetum blackii* Pabst (1964), *Catasetum juruenense* Hoehne (1915), e o *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992), apresentaram um pico em 300 pares de bases, quando comparado ao padrão interno, o qual o pico G0/G1 ficou em 100 pares de bases; já a espécie *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) destacou-se por apresentar um pico G0/G1 em 600 pares de bases, o dobro do valor encontrado entre as espécies avaliadas, e cinco vezes maior que o padrão interno utilizado.

O *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) foi descrito por Moraes (2007) como sendo uma espécie com grande variabilidade de ciclos fenológicos, e que a mesma apresenta uma alta capacidade de formação de ecótipos, uma vez que esta apresenta um grande sucesso vegetativo, quando transferida de habitat; tais características podem ser atribuídas como consequências dos processos evolutivos a que esta espécie foi submetida durante a sua adaptação, como ocorrem em inúmeras plantas tropicais, o que está de acordo com as observações feitas por Taiz & Zeiger (1998), cuja evolução dos mecanismos morfogenéticos e fisiológicos atuaram desde muito cedo para propiciar a adaptação e a perpetuação destas espécies aos ambientes em que estas encontravam-se. Esta afirmação é corroborada por Odum (1988), o qual ressalva ainda que tais adaptações podem até mesmo originar diversos ecótipos em uma dada espécie vegetal.

Diferentes níveis de ploidia sugerem que este mecanismo evolutivo pode estar envolvido na capacidade de ocupar habitats particulares (Félix & Guerra, 2000). Poliploidia é o tipo dominante de variação cromossômica visto na evolução das plantas, uma vez que, aparentemente, aumenta a variabilidade genética dos indivíduos e favorece uma rápida especiação (Soltis et. al, 2007). De acordo com Jones & Daker (1968), poliploidia tem desempenhado um papel importante na evolução da espécie *Catasetum* e pode ser uma das principais causas das suas variações intraespecíficas.

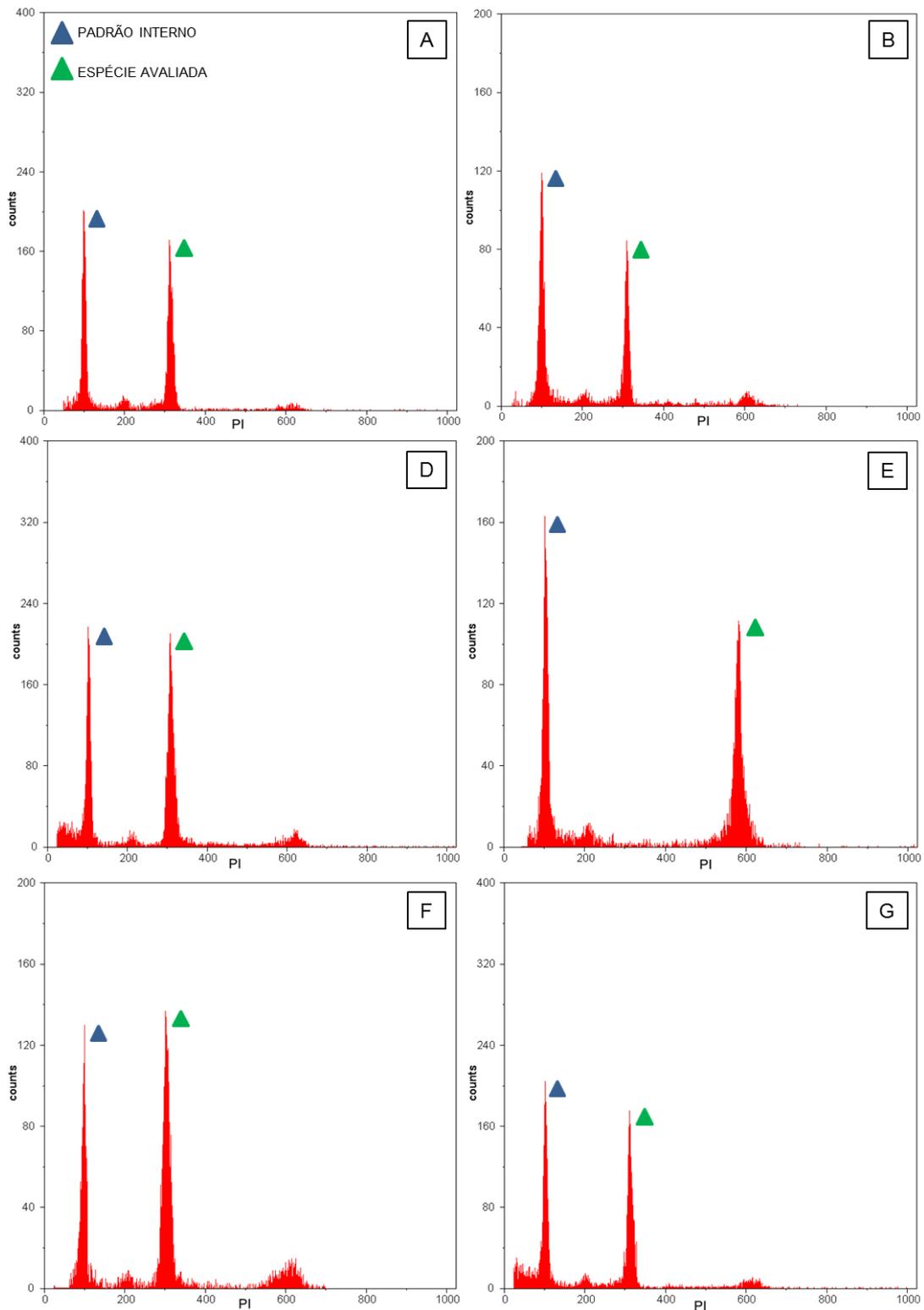


Figura 01 - Histograma representando os núcleos corados com iodeto de propídeo das espécies (A) *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade. (2010), (B) *Catasetum boyi* Mansf. (1930), (C) *Catasetum blackii* Pabst. (1964), (D) *Catasetum fimbriatum* Lindl. (1850), (E) *Catasetum juruenense* Hoehne. (1915), (F) *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda. (1992).

4.2 CITOGENÉTICA

As cinco espécies e o híbrido analisados apresentaram números cromossômicos distintos (Tabela 02), o *Catasetum x altaflorestense* com $2n=80$ cromossomos, o *Catasetum boyi* com $2n=54$, o *Catasetum blackii* (1964) apresentou $2n=66$ cromossomos, o *Catasetum fimbriatum* $2n = 108$, o *Catasetum juruenense* $2n=66$, e o *Catasetum schimidtianum* $2n = 54$ cromossomos; os mesmos encontram-se dentro da média de números cromossômicos encontrados na literatura para o gênero *Catasetum*, que podem variar entre $2n=54$ e 162 (Darlington & Wylie, 1955, Bolkhoviskikh et al. 1.969 , Moore 1973 , 1977 , Goldblatt 1981 , 1984, 1985, 1988 , Goldblatt & Johnson 1990, 1991 , 1996, 1998).

Tabela 02 – Número cromossômico das espécies de *Catasetum*, do híbrido natural, e os valores citados na literatura.

Espécie	Nº Encontrado	Nº Descrito	Referência
<i>C.x altaflorestense</i>	80	----	
<i>C.boyi</i>	54	----	
<i>C. blackii</i>	66	----	
<i>C. fimbriatum</i>	108	54 ¹ , 108 ²	¹ Maekawa et. al (2013) e ² Blumenschein (1960)
<i>C. juruenense</i>	66	----	
<i>C. schimidtianum</i>	54	54	Maekawa et. al, (2013)

A família Orchidaceae apresenta uma grande variabilidade em números cromossômicos, com eventos envolvendo a poliploidia e disploidia; essa variação cariológica foi confirmada, especialmente para o grupo Amphyglottidae, onde os números variaram de $2n=24$ a $2n=240$ (Félix & Guerra 2000; Conceição et al., 2006).

Na evolução, a ploidia é considerada de grande importância, pois favorece a diversificação ecológica e a ocupação de novos ambientes, uma vez que esta é um dos mecanismos de especiação (Otto & Whitton, 2000). A ocorrência de poliploidia também já foi descrita em diferentes gêneros da família orchidacea, tais como *Ophrys L.* (Bernardos et. al. 2003), *Dactylorhiza Neck. ex Nevski* (Devos et al 2006; Pedersen, 2006; Hedren et. al 2008), *Cattleya Lindl.* e *Laelia Adans.* (Tanaka & Kamemoto, 1974; 1984).

A poliploidia é o fenômeno de maior importância na evolução e na especiação dos vegetais. Acredita-se que pelo menos 75% das espécies já estudadas e descritas citogeneticamente tenham suportado, pelo menos uma vez na sua história evolutiva, um evento de duplicação de todos os cromossomos; e isto não é diferente em orquídeas, onde cogita-se que mais de 90% das espécies sejam poliploides (Mondin & Neto, 2006).

Jones & Daker (1968), ressaltam ainda que a poliploidia tem um papel significativo na evolução da espécie *Catasetum*, e pode ser uma das causas primárias da alta variação intraespecífica encontrada neste gênero. A alta variação intraespecífica para este gênero está relacionada diretamente ao seu dimorfismo sexual; Taiz & Zeiger (1998) afirmam que plantas com dimorfismo sexual possuem suas expressões sexuais influenciadas por seu estado nutritivo e por variações nas taxas de exposição às radiações solares, independentemente das características genéticas que apresentam.

Segundo Zimermam (1991), quando as espécies do gênero *Catasteum* estão expostas a altas intensidades luminosas, ocorre a formação de flores diclinas femininas e quando expostas a ambientes mais sombreados, dão origem a flores diclinas masculinas ao passo que as flores monoclinas ocorrem quando existem no mesmo ambiente grandes variações de intensidade luminosa. Essas variações na morfologia das flores como anteriormente descrito, ocorrem em razão do tempo de exposição da planta à luz, pois esta exposição é a responsável pelo seguimento de rotas metabólicas, que darão origem aos diferentes fenótipos encontrados (Attridge, 1990).

A diversificação de espécies no mesmo ambiente do agente polinizador comum (Mardan, 1995) gera um maior cruzamento intraespecífico; justificando assim o grande número de híbridos naturais descritos na literatura, como é o caso da *Cataserum x altaflorestense* do *Catasetum x apolloi* (Petini & Grade, 2010), e do *Catasetum x fausti* Bicalho (Bicalho, 1996).

O *Catasetum x altaflorestense*, de acordo com a mensuração e similaridade de seus cromossomos, podemos verificar que este é um híbrido tetraplóide (Figura 2); isto pode ter ocorrido por meio de dois eventos básicos da poliploidia: a autopoliploidia ou a alopoliploidia.

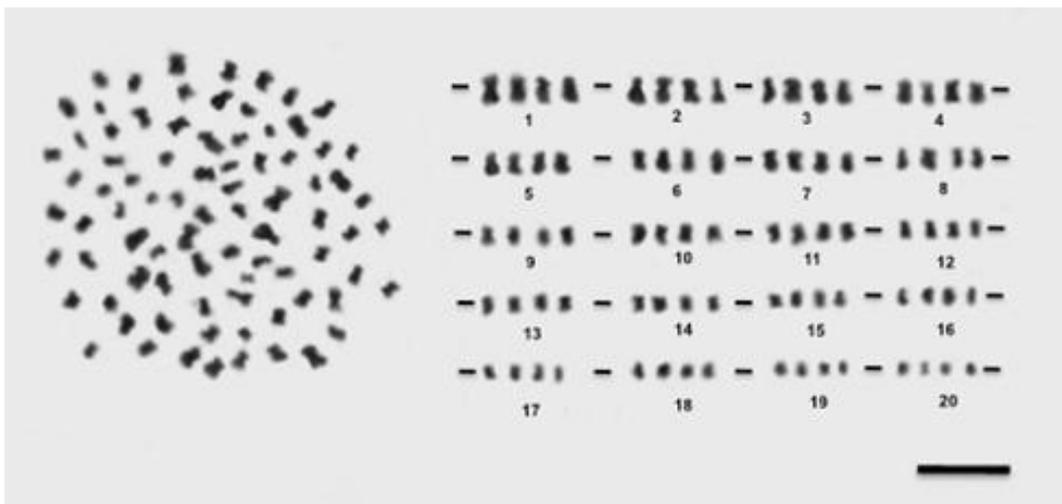


Figura 2 – Metáfase mitótica de *Catasetum x altaflorestense* $2n=4x=80$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$.

A autopoliploidia consiste na duplicação do número de cromossomos pela própria espécie, de modo que uma espécie que deveria ter duas cópias do mesmo cromossomo, uma vinda do pai e outra da mãe, passa a ter 4, 5, 6, 7 ou mais cópias do mesmo cromossomo. Por isso os autopoliplóides passam a ser designados como $3n$ (triplóides), $4n$ (tetraplóides), $5n$ (pentaplóides) e assim consecutivamente, pois significa que eles têm mais do que duas cópias de cada cromossomo e a alopoliploidia é o resultado do cruzamento de duas espécies distintas, onde posteriormente o número de cromossomos é duplicado; é o mais comum na natureza devido à sua alta fertilidade, e por não apresentarem na maioria das vezes problemas meióticos (Mondin & Neto, 2006).

Desta forma podemos supor que o *Catasetum x altaflorestense* é oriundo de uma duplicação de seu número cromossômico durante a mitose, ou que durante a recombinação genética na fecundação ocorreu uma duplicação de um dos pares de cromossomos dos parentais, gerando assim um híbrido tetraploide.

O tamanho médio dos cromossomos do *Catasetum x altaflorestense* (Tabela 03) ficou entre $3.18 \pm 1.60\mu\text{m}$ para o tamanho total, $2.05 \pm 0.98\mu\text{m}$ para o braço longo e $1.12 \pm 0.62\mu\text{m}$ para o braço curto; constituído por 20 grupos cromossômicos classificados como $7m + 13sm$.

Tabela 03 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade (2010) $2n=4x=80$ cromossomos.

<i>Catasetum x altaflorestense</i> Benelli & Grade (2010)						
Grupo	Total (μm)	Braço (μm)		R	I.C.	Classe
		Longo	Curto			
01	3.18	2.05	1.12	1.83	35.74	SM
02	2.91	1.62	1.29	1.27	44.15	M
03	2.68	1.74	0.94	1.87	35.07	SM
04	2.53	1.43	1.10	1.30	43.63	M
05	2.52	1.66	0.86	2.00	34.06	SM
06	2.40	1.37	1.04	9.48	43.19	M
07	2.38	1.49	0.89	1.69	37.36	SM
08	2.24	1.27	0.97	1.30	43.40	M
09	2.28	1.46	0.82	1.79	36.04	SM
10	2.19	1.37	0.82	1.69	37.35	SM
11	2.10	1.34	0.77	1.76	36.37	SM
12	2.08	1.17	0.91	1.28	43.91	M
13	2.02	1.29	0.73	1.80	35.96	SM
14	1.96	1.10	0.86	1.29	43.65	M
15	1.94	1.25	0.68	1.88	35.24	SM
16	1.83	1.19	0.70	1.71	37.06	SM
17	1.83	1.05	0.78	1.36	42.50	M
18	1.80	1.15	0.65	1.78	35.96	SM
19	1.71	1.05	0.65	1.66	38.26	SM
20	1.60	0.98	0.62	0.00	38.53	SM

R = razão entre os braços longo e curto, I.C. = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = Submetacêntrico.

O valor médio da razão entre os braços longos e curtos foi de $2,00 \mu\text{m} \pm 0,00$ e o índice centromérico médio encontrado ficou entre $44,15 \pm 34,06 \mu\text{m}$.

O *Catasetum boyi* Mansf (1930) foi classificado como um triploide, $2n=3x=54$ (Figura 3).

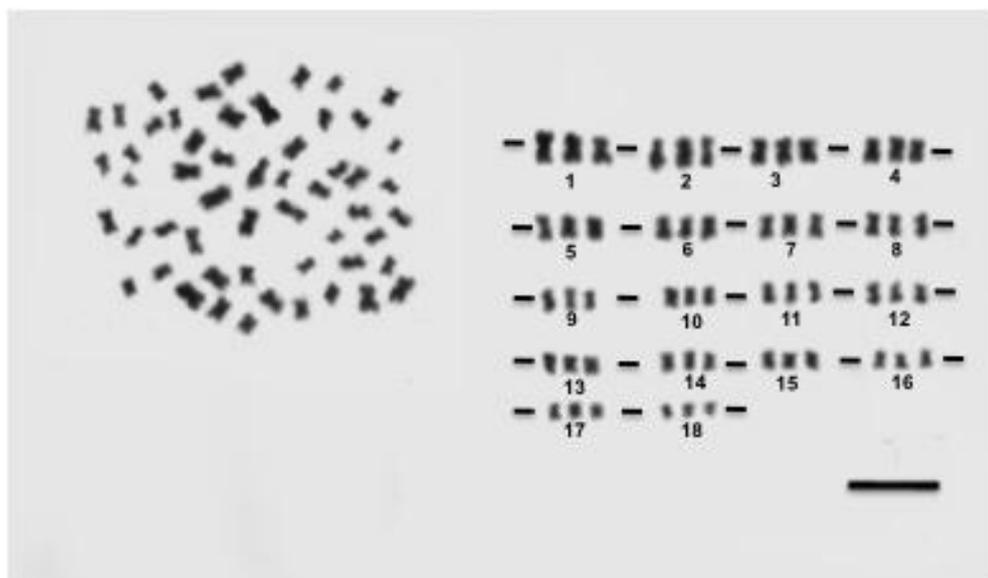


Figura 3 – Metáfase mitótica de *Catasetum boyi* $2n=3x=54$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$.

O *Catasetum blackii* Pabst (1964) apresentou 66 cromossomos os quais foram agrupados em 22 grupos e classificados como 11m e 11sm (Figura 4).

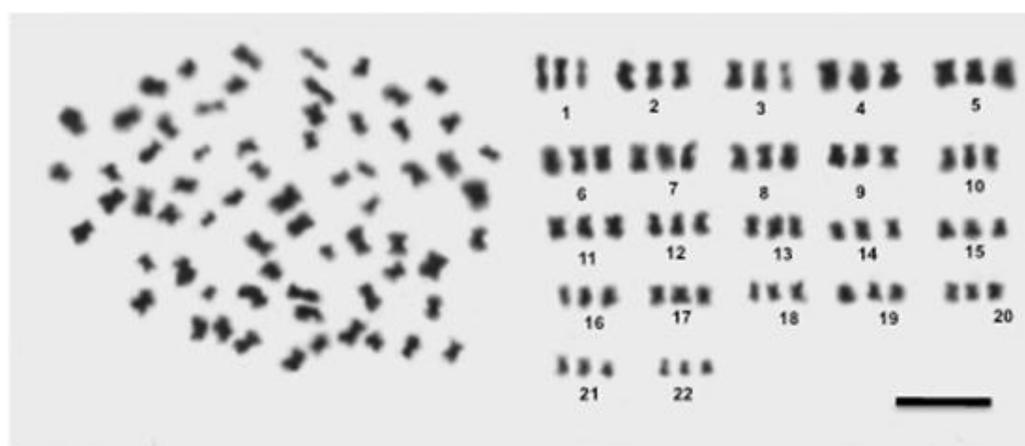


Figura 4 – Metáfase mitótica de *Catasetum blackii* $2n=3x=66$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$.

A média do tamanho total dos cromossomos do *Catasetum boyi* ficou entre $3.75 \pm 1.75\mu\text{m}$, o valor médio para o braço longo ficou entre $2.21 \pm 1.11\mu\text{m}$ e para o braço curto $1.54 \pm 0.64\mu\text{m}$; a razão média entre o comprimento dos braços longos

foi de $1.75 \pm 0.56 \mu\text{m}$ e a média para o índice centromérico $45.31 \pm 36.49 \mu\text{m}$; pela avaliação dos dados obtidos a espécie pode ser classificada em 18 grupos cromossômicos, 9m + 9sm (Tabela 04).

Tabela 04 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do *Catasetum boyi* Mansf (1930) $2n=3x=54$ cromossomos.

<i>Catasetum boyi</i> Mansf (1930)						
Grupo	Total (μm)	Braço (μm)		R	I.C.	Classe
		Longo	Curto			
01	3.75	2.21	1.54	1.48	41.04	M
02	3.48	1.90	1.58	1.21	45.31	M
03	3.17	1.82	1.35	1.36	42.50	M
04	3.03	1.78	1.25	1.44	41.32	M
05	2.93	1.61	1.31	1.23	44.92	M
06	2.88	1.67	1.21	1.38	42.11	M
07	2.87	1.76	1.11	1.59	38.76	SM
08	2.78	1.67	1.11	1.51	39.88	SM
09	2.69	1.64	1.05	1.56	39.08	SM
10	2.61	1.64	0.97	1.72	37.31	SM
11	2.52	1.58	0.94	1.72	37.17	SM
12	2.43	1.41	1.02	1.38	42.09	M
13	2.34	1.39	0.95	1.46	40.59	M
14	2.26	1.35	0.90	1.54	39.98	SM
15	2.21	1.40	0.81	1.75	36.65	SM
16	2.10	1.21	0.89	1.39	42.25	M
17	2.00	1.23	0.76	1.07	38.31	SM
18	1.75	1.11	0.64	0.56	36.49	SM

R = razão entre os braços longo e curto, I.C. = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico.

A média do tamanho total dos cromossomos do *Catasetum blackii* ficou entre $3.49 \pm 1.72 \mu\text{m}$, o valor médio encontrado para o braço longo foi de $1.94 \pm 1.12 \mu\text{m}$ e para o braço curto $1.54 \pm 1.12 \mu\text{m}$; a razão média entre os braços curtos e longos foi de $1.90 \pm 1.14 \mu\text{m}$ e $46.81 \pm 34.71 \mu\text{m}$ (Tabela 05).

Tabela 05 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do *Catasetum blackii* Pabst (1964) $2n=3x=66$ cromossomos.

<i>Catasetum blackii</i> Pabst (1964)						
Grupo	Total (μm)	Braço (μm)		R	I. C.	Classe
		Longo	Curto			
01	3.49	1.94	1.54	1.27	44.38	M
02	3.29	2.05	1.23	1.70	37.59	SM
03	3.21	1.89	1.32	1.51	41.12	M
04	3.16	1.93	1.23	1.59	38.91	SM
05	3.08	1.88	1.20	1.57	38.94	SM
06	3.03	1.81	1.22	1.48	40.30	M
07	2.98	1.74	1.24	1.40	41.61	M
08	2.94	1.56	1.37	1.14	46.81	M
09	2.88	1.72	1.16	1.49	40.31	M
10	2.82	1.75	1.07	1.67	37.98	SM
11	2.75	1.69	1.06	1.62	38.46	SM
12	2.56	1.56	1.00	1.57	39.05	SM
13	2.45	1.44	1.02	1.43	41.39	M
14	2.39	1.39	1.00	1.41	41.74	M
15	2.32	1.41	0.91	1.58	39.14	SM
16	2.28	1.32	0.95	1.41	41.93	M
17	2.20	1.29	0.90	1.44	41.18	M
18	2.11	1.25	0.86	1.45	40.87	M
19	2.05	1.28	0.77	1.68	37.44	SM
20	1.89	1.16	0.73	1.62	38.70	SM
21	1.85	1.18	0.68	1.75	36.60	SM
22	1.72	1.12	0.60	1.90	34.71	SM

R = razão entre os braços longo e curto, I.C. = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = Submetacêntrico.

A espécie *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) possui $2n=6x=108$ cromossomos, estes foram agrupados em 18 grupos com 6m + 12sm (Figura 5).

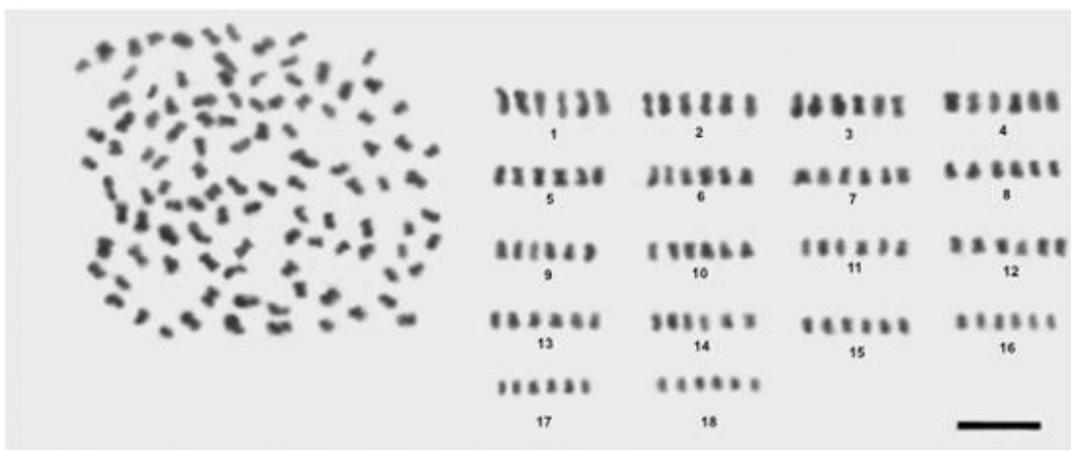


Figura 5 – Metáfase mitótica de *Catasetum fimbriatum* $2n=6x=108$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$.

Recentemente a espécie *C. fimbriatum* foi descrita com o número de 54 cromossomos por Maekawa et. Al. (2013), no entanto o número cromossômico descrito de 108, no presente trabalho, está de acordo com Blumenschein (1960),.

O reconhecimento de que muitas das espécies vegetais chamadas de diploides seriam na realidade poliploides antigos ou residuais, não é um fato novo (STEBBINS, 1980), mas atualmente há uma aceitação geral de que a poliploidia antiga é muito ampla e que muitas, senão a grande maioria das espécies, apesar de cromossomicamente e pelo tipo de herança de seus genes comportarem-se como diplóides, são, na verdade paleopoliplóides (Leitch & Bennet, 1997; Murray, 2002).

A média encontrada para o tamanho do comprimento total foi de $3,39 \pm 1.76\mu\text{m}$, para o braço longo $2,00 \pm 1.12\mu\text{m}$ e para o braço de $1.39 \pm 0.64\mu\text{m}$; os valores médios encontrados para a razão entre estes foram de $1.93 \pm 1.21\mu\text{m}$, já a média para o índice centromérico dos grupos foi de $44.58 \pm 34.88\mu\text{m}$ (Tabela 06).

Tabela 06 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) $2n=6x=108$ cromossomos.

<i>Catasetum fimbriatum</i> Lindl (1850)						
Grupo	Total (μm)	Braço (μm)		R	I. C.	Classe
		Longo	Curto			
01	3.39	2.00	1.39	1.44	41.13	M
02	3.01	1.70	1.31	1.31	43.44	M
03	2.79	1.69	1.10	1.60	39.57	SM
04	2.67	1.61	1.06	1.56	39.64	SM
05	2.52	1.45	1.06	1.39	42.25	M
06	2.43	1.46	0.97	1.51	39.91	SM
07	2.36	1.44	0.91	1.59	38.79	SM
08	2.30	1.40	0.90	1.60	38.95	SM
09	2.23	1.38	0.85	1.63	38.25	SM
10	2.19	1.34	0.85	1.57	38.91	SM
11	2.18	1.21	0.97	1.26	44.58	M
12	2.13	1.31	0.82	1.43	38.61	SM
13	2.09	1.32	0.77	1.73	36.77	SM
14	2.04	1.33	0.71	1.93	34.88	SM
15	2.00	1.28	0.72	1.87	36.00	SM
16	1.94	1.23	0.71	1.21	36.46	SM
17	1.87	1.21	0.66	1.62	35.40	SM
18	1.76	1.12	0.64	1.23	36.28	SM

R = razão entre os braços longo e curto, I.C. = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = Submetacêntrico.

O *Catasetum juruenense* Hoehne (1915) é classificado como um triploide com $2n=3x=66$ cromossomos, agrupados em 22 grupos com 15m e 7sm (Figura 6).

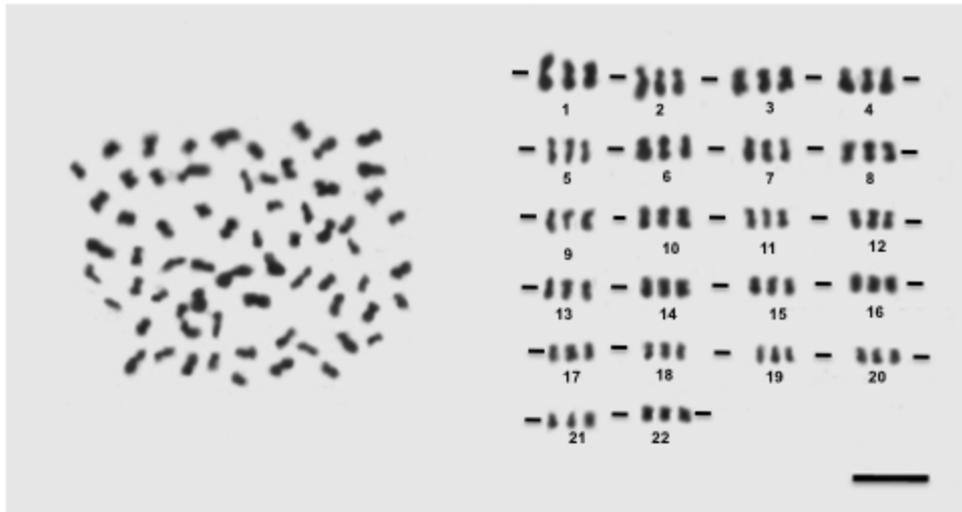


Figura 6 - Metáfase mitótica de *Catasetum jururenense* $2n=3x=66$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$.

A espécie *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992) é um triplóide com $2n=3x=54$ cromossomos (Figura 7).



Figura 7 – Metáfase mitótica de *Catasetum schimidtianum* $2n=3x=54$ cromossomos pré-tratados com $3\mu\text{m}$ de trifluralim por 18 horas, corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra $10\mu\text{m}$.

Os valores médios para o tamanho total dos cromossomos do *Catasetum jururenense* foi de $4.47 \pm 2.04\mu\text{m}$. A média entre o valor dos braços longos foi de $2,59 \pm 1,20\mu\text{m}$ e de $1,87 \pm 0.84$ para a média dos braços curtos (Tabela 07).

Tabela 07 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do *Catasetum juruenense* Hoehne (1915) $2n=3x=66$ cromossomos.

<i>Catasetum juruenense</i> Hoehne (1915)						
Grupo	Total (μm)	Braço (μm)		R	I. C.	Classe
		Longo	Curto			
01	4.47	2.59	1.87	1.52	41.96	M
02	3.65	2.04	1.61	1.28	44.05	M
03	3.57	2.21	1.36	1.73	38.13	SM
04	3.46	1.87	1.59	1.18	45.96	M
05	3.32	1.83	1.48	1.26	44.70	M
06	3.23	1.88	1.36	1.39	41.94	M
07	3.17	1.79	1.38	1.31	43.50	M
08	3.09	1.70	1.39	1.23	44.96	M
09	3.03	1.77	1.26	1.41	41.68	M
10	2.93	1.66	1.27	1.30	43.44	M
11	2.83	1.56	1.28	1.22	45.03	M
12	2.75	1.67	1.08	1.56	39.19	SM
13	2.69	1.61	1.08	1.53	40.01	M
14	2.60	1.57	1.03	1.54	39.57	SM
15	2.50	1.53	0.97	1.59	38.68	SM
16	2.43	1.55	0.88	1.14	36.19	SM
17	2.35	1.44	0.91	0.96	38.89	SM
18	2.30	1.35	0.95	0.49	41.46	M
19	2.25	1.40	0.85	1.02	37.69	SM
20	2.22	1.31	0.91	1.44	41.07	M
21	2.12	1.25	0.87	1.47	40.98	M
22	2.04	1.20	0.84	0.94	41.11	M

R = razão entre os braços longo e curto, I.C. = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico.

A razão entre o comprimento do braço longo e do braço curto para a espécie *Catasetum juruenense* teve média de $1.59 \pm 0.49 \mu\text{m}$ e o índice centromérico obteve média de $45.03 \pm 36.19 \mu\text{m}$.

A média do comprimento total dos cromossomos da espécie *Catasetum shimitidianum* ficou entre $3.29 \pm 2.00 \mu\text{m}$; os valores médios do comprimento do

braço longo e braço curto ficaram em $1.90 \pm$ e $1,20 \mu\text{m}$ e $1,40 \pm 0.80 \mu\text{m}$ respectivamente (Tabela 08).

Tabela 08 – Morfometria dos cromossomos metafásicos do *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992) $2n=3x=54$ cromossomos.

<i>Catasetum schimidtianum</i> Miranda & Lacerda (1992)						
Grupo	Total (μm)	Braço (μm)		R	I. C.	Classe
		Longo	Curto			
01	3.29	1.90	1.40	1.39	42.32	M
02	2.95	1.73	1.22	1.42	41.37	M
03	2.83	1.72	1.10	1.57	39.05	SM
04	2.79	1.59	1.20	1.32	43.06	M
05	2.75	1.55	1.20	1.32	43.55	M
06	2.70	1.64	1.06	1.59	39.17	SM
07	2.67	1.61	1.07	1.51	39.88	SM
08	2.64	1.54	1.10	1.41	41.70	M
09	2.61	1.44	1.16	1.26	44.63	M
10	2.57	1.44	1.13	1.28	44.09	M
11	2.55	1.43	1.12	1.29	43.92	M
12	2.46	1.36	1.11	1.23	44.98	M
13	2.44	1.46	0.98	1.48	40.27	M
14	2.38	1.39	0.99	1.41	41.77	M
15	2.34	1.40	0.94	1.49	40.20	M
16	2.30	1.34	0.96	1.41	41.74	M
17	2.19	1.26	0.93	1.36	42.44	M
18	2.00	1.20	0.80	1.50	40.25	M

R = razão entre os braços longo e curto, I.C. = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = Submetacêntrico.

A razão entre braços longos e curtos da espécie *Catasetum shimitidianum* foi de $1,59 \pm 1.36 \mu\text{m}$, já a média encontrada do índice centromérico ficou entre $44,98 \pm 39.05 \mu\text{m}$.

Entre todas as espécies avaliadas os cromossomos apresentaram medidas que os classificam como médios e curtos; o comprimento de um cromossomo é considerado uma constante e, portanto é uma de suas propriedades características,

os cromossomos podem ser classificados como longos (>10 μm), médios (4-8 μm) ou curtos (< 2 μm).

Nollet (2009) em seu trabalho com *Epidendrum L.* verificou que os tamanhos médios dos cromossomos encontrados variaram de 0.80 μm nos menores cromossomos em *E. orchidiflorum* a 3.19 μm nos maiores cromossomos de *E. armeniacum*; Lauton et. al (2011) constataram que a *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Linl.) possui cromossomos que variam de 1,48 a 0,40 μm ; já Gomes et. al. (2011) em seu trabalho com o *Catasetum longifolium* verificaram que a espécie apresenta números que variam de 1,28 a 0,18 μm , com uma média de 0,47 μm , e Maekawa et. al (2013) verificaram em seu trabalho com o gênero *Catasteum* que as espécies variaram entre 0,5 μm e 4,9 μm ; tais resultados corroboram para que possamos afirmar que a família Orchidaceae possui um padrão cromossômico que pode ser caracterizado como sendo estes de curtos a médios; uma vez que verifica-se que dentro do gênero *Catasetum* e demais gêneros avaliados estes valores permanecem em um mesmo padrão médio de medidas.

O índice de similaridade entre os cromossomos do híbrido *C. x altaflorestense* foi de 0.03 intracromossômica e 38.93 intercromossômica, para a espécie *Catasetum blackii* o valor encontrado foi de 0.03 e 40.16 para o índice de similaridade intracromossômica e intercromossômica respectivamente; os valores encontrados para o *Catasetum boyi* foram de 0.04 para o índice de similaridade intracromossômica e 40,61 intercromossômica. A espécie *Catasetum fimbriatum* apresentou um índice de similaridade de 0.04 intracromossômica, e intercromossômica 39.17, e as espécies *C. juruenense* e *C. schimiditium* foram de 0.03 - 0.04, e 41.61 - 41.92, respectivamente para cada uma (Tabela 09).

Tabela 09 - Índice de assimetria intracromossômica (A1) e intercromossômica (A2) de cinco espécies e um híbrido natural.

Espécies	A1	A2
<i>Catasetum x altaflorestense</i>	0.03	38.93
<i>Catasetum blackii</i>	0.03	40.16
<i>Catasetum boyi</i>	0.04	40,61
<i>Catasetum fimbriatum</i>	0.04	39.17
<i>Catasetum juruenense</i>	0.03	41.61
<i>Catasetum schimiditium</i>	0.04	41.92

Os índices de assimetria cariotípica têm sido extensamente utilizados para inferir mecanismos de evolução cromossômica em plantas; quando avaliado deve-se levar em consideração que cariótipos mais simétricos representam estágios mais primitivos na evolução de um determinado grupo de plantas. O estudo detalhado da assimetria cariotípica em alguns grupos de plantas permite uma compreensão clara do sentido da evolução cariotípica. Aumentos na assimetria cariotípica são decorrentes de translocações Robertsonianas, inversões e translocações desiguais detectáveis através da análise do comportamento meiótico (Stebbins, 1961; Paszko, 2006).

A partir dos dados obtidos foi possível realizar uma análise de agrupamento com base nos dados cariológicos, o que permitiu a elaboração de um dendrograma hierárquico (Figura 8), no qual se observou a formação de quatro grupos com algum grau de similaridade e a dissimilaridade entre outros. Foram incluídos, nessa análise multivariada, os dados referentes ao número de cromossomos, quantidade de DNA em pictogramas, número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, tamanho do maior cromossomo, tamanho do menor cromossomo, comprimento do lote haploide, comprimento médio dos cromossomos, comprimento médio do braço longo, comprimento médio do braço curto, razão média entre os braços cromossômicos e índice centromérico médio, incluídas na tabela 10.

O método hierárquico de Ward possibilitou a distribuição das espécies dentro dos grupos ao formar o dendrograma. Variações cariotípicas intraespecíficas são geradas em consequência de rearranjos estruturais e podem significar respostas desses genomas aos diferentes ambientes nos quais são encontrados (Teodoro-Pardo et al., 2007).

Tabela 10 – Valores médios encontrados pelo programa estatístico R para a montagem do dendograma

Espécie	NC	DNA (pg)	Fórmula cariotípica	(µm)							
				TCM	TCM	CLH	CCM	BL	BC	R	IC
1*	80	6.039	28m + 52sm	3.65	1.59	176.98	2.21	1.35	0.86	1.61	38.87
2*	66	6.056	27m + 27sm	3.69	1.67	172.4	2.61	1.56	1.05	1.53	39.96
3*	54	6.028	33m + 33sm	3.88	1.72	143.36	2.65	1.58	1.08	1.51	40.32
4*	108	11.338	24m + 84sm	3.69	1.59	109.38	2.03	1.26	0.76	1.71	37.52
5*	66	6.061	45m + 21sm	5.09	2.09	143.58	2.66	1.56	1.10	1.45	41.12
6*	54	6.054	45m + 09sm	3.43	2.03	139.4	2.58	1.50	1.08	1.40	41.91

*Representação das espécies e do híbrido no dendograma (1 – *C. x altaflorestense*, 2 – *C. blackii*, 3 – *C. boyi*, 4 – *C. fimbriatum*, 5 – *C. juruenense*, 6 – *C. schimiditium*), NC = Número de cromossomos, DNA = Dados da citometria, pg = picogramas, Fórmula cariotípica = Número de cromossomos metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), TCM = Tamanho do Maior Cromossomo, TCM = Tamanho do Menor Cromossomo, CLH = Comprimento do Lote Haplóide, CCM = Comprimento Médio dos Cromossomos, BL = Comprimento Médio do Braço Longo, BC = Comprimento Médio do Braço Curto, R = Razão Média entre os Braços Cromossômicos, IC = Índice Centromérico Médio.

As informações geradas pelo dendograma, e as informações encontradas pelo índice de similaridade estão de acordo; ambas colocam o híbrido *Catasetum x altaflorestense* e a espécie *Catasetum blackii* em um grupo distinto, o *Catasetum boyi* e o *Catasetum schimiditium* em um segundo grupo, o qual o *Catasetum juruenense* aparece próximo, distinguindo-se pela similaridade intracromossômica, mas identificando-se como próxima pelo valor da similaridade intercromossômica.

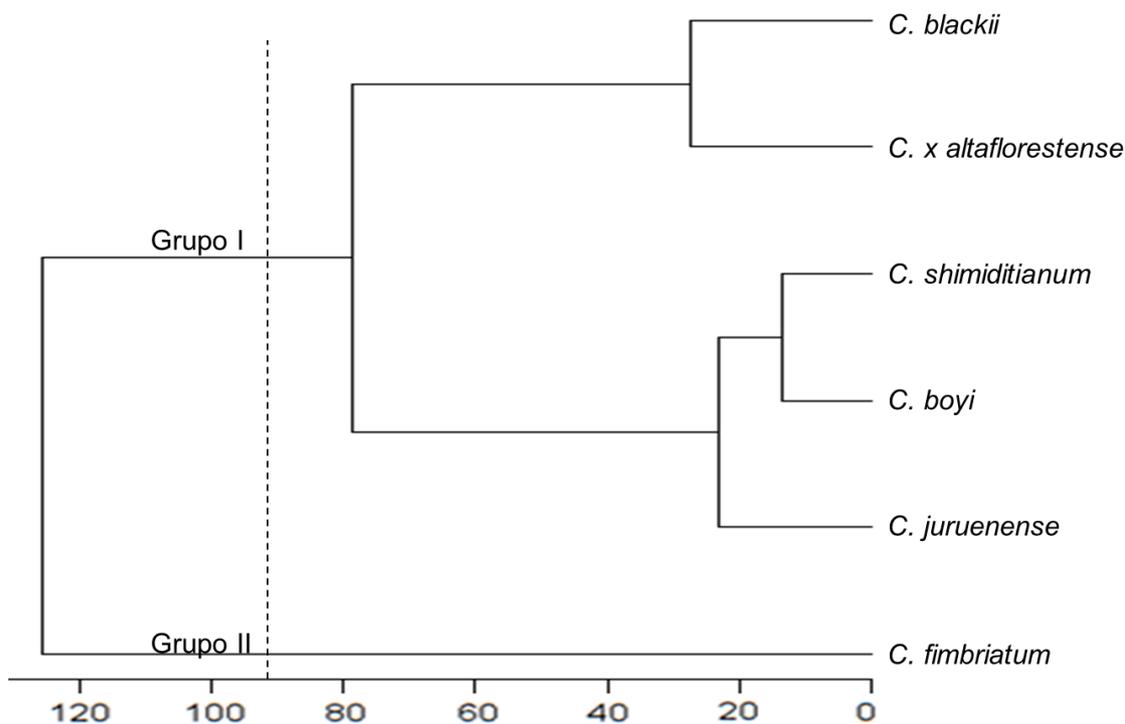


Figura 8 - Dendrograma representado pela distância entre vizinho mais próximo, relação das espécies de *Catasetum* e do híbrido (1 – *C. x altaflorestartense*, 2 – *C. blackii*, 3 – *C. boyi*, 4 – *C. fimbriatum*, 5 – *C. juruenense*, 6 – *C. shimiditium*), com base na análise do cariótipo.

Os valores encontrados para a distância Euclidiana foram de 1* para 2* 27.46670 de 2* para 3* 4.72022 de 3* para 4* 94.50587 de 4* para 5* 81.73938 de 5* para 6* 19.56703.

De acordo com Araújo et al. (2008), as diferenças encontradas entre as espécies quando avaliadas por estatística multivariada proporcionar uma avaliação sistemática de padrões determinados, além de uma descrição sintética da afinidade genética entre espécies e populações de um determinado estudo; promovendo uma distinção mais clara entre os grupos analisados.

5. CONCLUSÕES

A partir das avaliações citológicas, da análise estatística e pela quantificação de DNA por citometria de fluxo realizada com as cinco espécies do gênero *Catasetum* e o híbrido natural, podemos concluir que o híbrido *Catasetum x altaflorestartense* Benelli & Grade (2010) é um tetraploide $2n=4x=80$ com 20 grupos

cromossômicos, os quais foram classificados como sendo 7m + 13sm e o mesmo possui o valor de 6.04 picogramas de DNA; este encontra-se no mesmo grupo de similaridade que a espécie *Catasetum blackii* Pabst (1964), que também é um triploide $2n=3x=66$, seus cromossomos foram agrupados em 22 grupos e classificados como 11m + 11sm, a espécie possui o valor de 6.06 picogramas de DNA; o *Catasetum boyi* Mansf (1930) que é um triploide $2n=3x=54$ organizados em 18 grupos cromossômicos com 9m + 9sm e 6.03 picogramas de DNA encontra-se no mesmo grupo de similaridade do *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (1992) o qual também é um triploide com $2n=3x=54$ cromossomos organizados em 18 grupos os quais são classificados como sendo 15m + 3sm, esta espécie possui 6.05 picogramas de DNA. A espécie *Catasetum juruenense* Hoehne (1915) é classificado como um triploide com $2n=3x=66$ cromossomos, agrupados em 22 grupos com 15m + 7sm, seu valor de DNA em picogramas é de 6,06; os valores encontrados pela análise estatística a colocou em um grupo distinto muito próximo às espécies *C. boyii* e *C. schimidtianum* devido a seu índice de similaridade interespecífica com estas espécies; e o *Catasetum fimbriatum* Lindl (1850) encontra-se isolado dos demais grupos das espécies avaliadas, uma vez que este é o único que apresentou valores mais discrepantes por ser um hexaplóide $2n=6x=108$ cromossomos, os quais foram agrupados em 18 grupos com 6m + 12sm e possui 11.34 picogramas de DNA, valor este que representa quase o dobro das demais espécies avaliadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRACC, **Jornal da ABRACC**: Associação de Brasileira de Catasetíneas. (1998a).
- ABRAMHOFF, M. D., MAGELHAES, P. J., RAN, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**. 11:36–42. 2004.
- ABRAMHOFF, M.D.; MAGELHAES, P.J.; RAM, S.J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**. v.11, p.36-42, 2004.
- ARAÚJO, F.P DE.; SILVA, N. DA.; QUEIROZ, M. DE. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.723-730, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v30n3/27.pdf>>. Acesso em: 25, novembro, 2013.

- ATTRIDGE, T. H. Light and plant responses. London: **Copyright Licensing Agency**, 432 p. 1990.
- BARROS F. Notas taxonômicas para as espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platyste Pleurothallis* e *Scaphyglottis*. **Botanica Brasilica**, 10: 139 – 151. 1996.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M. & FORSTER, W. (2012). Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>> Acesso: 02, dezembro, 2013.
- BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. Orchidaceae in R.C. Forzza, et al (org.). **Catálogo de plantas e Fungos do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.2., p.1344- 1426. 2010.
- BASTOS & BERG. **Flora da Bahia: *Catasetum* (Orchidaceae) Sitientibus** série **Ciências Biológicas** 12(1): 83–89. 2012.
- BECHTEL, H.; CRIBB, P.; LAUNERT, E. **The manual of cultivated orchid species**. Cambridge: The Mit. 585p. 1992.
- BENNET. J. **The Aegean Bronze Age**. In I. Morris, R. Saller and W. Scheidel (eds), *The Cambridge Economic History of the Greco-Roman World* (Cambridge: Cambridge University Press) 175-210. 2007.
- BENNETT MD, Leitch IJ. Plant genome size research: A field in focus. **Ann. Bot.** 95: 1-6, 2005.
- BENNETT, MD.; LEITCH, I. J. **Plant DNA c-values databases of the royal botanic garden**. Kew, 2004. Disponível em: <<http://www.rbgkew.org.uk>>. Acesso em: 02, dezembro, 2013.
- BENNETT, M. D.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: implications for genome size variation and flow cytometry. **Annals of botany**, v. 101, n. 6, p. 777-90. 2008.
- BENZING, D.H., **Mineral nutrition**. In: Ashton, P.S. (Ed.), *Vascular Epiphytes, General Biology and Related Biota*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 112–151. 1990.
- BERNARDOS, S., AMICH, F., GALLEGOS, F., Kariological and taxonomic notes on Ophrys (Orchidoideae, Orchidaceae) from Iberian Peninsula. **Botanical Journal of the Linnean Society** 142: 395-406. 2003.

- BICALHO, H. D. Revista Brasileira de Hortic. Ornamental., Campinas V2, n 2, p 64 – 65. 1996.
- BICALHO, H. D.; BARROS, F. de. On taxonomy of *Catasetum* subsection *Isoceras*. **Lindleyana**, v.3, p. 87-92, 1988.
- BLUMENSCHNEIN, A. **Estudos citológicos na família Orchidaceae**. Doctoral thesis. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1957.
- BLUMENSCHNEIN, A. **Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas**. Publicações Científicas da Universidade de São Paulo, v. 1, p. 45 – 50. 1960.
- BOLKHOVISKIKH, Z., GRIF, V., MATVEJEVA, T., ZAKHARYEVA, H.V., **Chromosome number of flowering plants**. V.L. Komarov Botanical Institute. Academy of Sciences of the USSR, Moscou. 1969.
- BRAGA, P. I. S. Orquídeas: Biologia floral. **Ciência Hoje**, 1987.
- BRAMMER, S.P., ZANOTTO, M., CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. EMBRAPA: Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno - Área de Citogenética e Genética Molecular, Brasileira de Genética, v.9, p.741-743,2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPT-Acesso> em: 10, novembro, 2013.
- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, v. 70, p. 515 – 519, 1993.
- CARVALHO, REGINALDO; SILVA, KALINY V. P.; OLIVEIRA, LÊDA F.; ALVES, ALFREDO AUGUSTO CUNHA. **Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot***. XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2008.
- CATLING, P.M. & CATLING, V.R. A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. **Lindleyana** 6:187-210. 1991.
- CATLING, P.M. Auto-pollination in the Orchidaceae. *In* Orchid biology, reviews and perspectives (J. Arditti, ed.). **Timber Press, Oregon**, v.5, p.121-158. 1990.
- CHARANARSRI, U., KAMEMOTO, H., TACASHITA, M. Chromosome numbers in *Oncidium* and allied genera. **American Orchid Society Bulletin** 42: 518-524. 1973.

- CHRISTOPHER, J.S., CRIBB P. J., **A reassessment of the sectional limits in the gens *Cymbidium Swartz***. In Arditti J. (ed) *Orchid biology – reviews and perspectives*, III. Cornell University Press, London. 1984.
- CLARINDO. W. R., CARVALHO, C. R., ARAÚJO. F. S., ABREU. I. S., OTONI. W. C. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tiss. Org. Culture*. 92, 207–214. 2008.
- CONCEIÇÃO, L. P., OLIVEIRA, A. L. P. C., BARBOSA, L. V. Characterization of the species *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) occurring in dunas do Abaeté-Salvador, BA Brazil. *Cytologia* 71: 125-129. 2006.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T. & YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons**. Springer Verlag. Berlin. 1985.
- DARLINGTON, C., WYLIE, A. P., **Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2ª edição**. George Allen & Unwin LTD, Ruskin House Museum Street, London. 1955.
- DECKER, J. S. **Cultura das orquídeas no Brasil**. São Paulo: Editora Atheneu, 152 p. 1946.
- DEMATTEIS, M., DAVIÑA, J. R., Chromosome studies on some Orchids from South America. *Selbyana* 20: 235-238. 1999.
- DEVOS, N., RASPÉ, O., Oh, S. H., TYTECA, D., JACQUEMART, A. L., The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: Insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 767–778. 2006.
- DODSON, C. H. *Oncidium pusillum* and its allies I. Am. **Orchid Soc. Bull.**, v. 26, p. 170 – 172. 1957.
- DOLEŽEL J, BARTOS J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*. 95:99–110. 2005
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38 (3): 285-302. 1997a.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154. 1991.
- DOLEŽEL, J. **Flow cytometry, its application and potential for plant breeding**. In: LELLEY, T. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. Vienna: WUV-Universitätsverlag, p.80-90. 1997.

- DOLEŽEL, J; GREILHUBER, J; LUCRETTIII, S. et al. Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry : Inter-laboratory Comparison *. **Annals of Botany**, v. 82, p. 17-26, 1998.
- DRESSLER RL. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland, USA: Dioscorides Press. 1993.
- DRESSLER, L. R., **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland, Dioscorides Press. 1993.
- DRESSLER, R.L. & DODSON, C.H. Classification and phylogeny in the Orchidaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 47:25-67. 1960.
- DRESSLER, R.L. **The orchids, natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 352p. 1981.
- ENDSFELDZ, W. F. **Características muito peculiares**. *Natureza*, v. especial, p. 26-36, 1999.
- ENDSFELDZ, W. F. Galeria de espécies. **O Mundo das Orquídeas**. v.2, p. 22-27, 1998.
- FARIA, R. T.; REGO, L. V.; BERNARDI, H. B.; MOLINARI, H. B. Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternative substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 337-342, 2001.
- FELIX LP, GUERRA M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution** 254: 131-148. 2005.
- FELIX LP, GUERRA M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidoid orchids. **Genetics and Molecular Biology** 23(4): 957-978. 2000.
- FELIX, L. P. AND GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 163, 234–278. 2010.
- FELIX, L.P. & GUERRA, M.S. O cariótipo de *Nhotoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e nos sítios de rDNA. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 35, n. 3-4, p. 283-289, 2000.
- FELIX, L.P. **Citogenética e citotaxonomia de orquídeas do Brasil, com ênfase no gênero *Habenaria* Willd.** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2001.
- FERREIRA, R. A. R. **Uma avaliação da certificação ambiental pela norma NBR ISO 14001 e a garantia da qualidade ambiental**. São Carlos. 148p. Dissertação

(mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 1999.

FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre, Editora UFRGS, 463 p. 2003.

GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDOX JM, AYRES NM, SHARMA DP, FIROOZABADY E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science 220**: 1049–1051. 1983.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P. E FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science 220** (4601): 1049-1051. 1983.

GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. E DOLEŽEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. Current Protocols in cytometry, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. **John Wiley & Sons, Inc., New York**. 2002.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V5. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1981.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1979-1981. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V8. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1984.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V13. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1985.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1984-1985. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V23. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1988.

GOLDBLATT, P., JOHNSON, D. E., Index to plant chromosome numbers 1986-1987. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V30. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1990.

GOLDBLATT, P., JOHNSON, D. E., Index to plant chromosome numbers 1992-1993. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V58. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1996.

GOLDBLATT, P., JOHNSON, D. E., Index to plant chromosome numbers 1994-1995. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V69. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden**. 1998.

- GOLDBLATT, P., JOHNSON, D. E., Index to plant numbers 1988-1989. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. V40. **Sant Louis, Missouri Botanical Garden. Chromosome.** 1991.
- GOMES, C. M.; KARSBURG, I. V.; LAUTON, D. S.; SANTOS, A. C.; BILIERI, C. E. Morfometria Cromossomica de *Catasetum longifolium* C. Rich. ex Kunth In: **Congresso de Iniciação Científica**, 4ª. (JC), Cáceres/MT. Anais... Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG, 2011. Vol. 7 (2011). Cód. 6033. ISSN ONLINE 2237-9258. CDROM 2178-7492. 2011.
- GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIRO, J. Nuclear DNA Content Measurement. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes.** 1st ed., p.67-99. WILEY, 2007.
- GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Rev. Bras Genet.** 9: 741-743. 1986.
- GUERRA, M. **Chromosome number variation and evolution in monocots.** In Wilson, K.L., Morrison, D.A. (Eds.): *Monocots – Systematics and Evolution – Vol.1 – Proceedings of the Second International Conference on the Comparative Biology of the Monocots*, pp.125-134. Melbourne: CSIRO. 2000a.
- Guerra, M. S. (1988). **Introdução à Citogenética Geral.** Rio de Janeiro: Guanabara. 142 p. Bengtsson, 1980.
- GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, v.9, p.741-743, 1986.
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana.** São Paulo, Funpec, 131p. 2002.
- HEDREN M, NORDSTROM S, STAHLBERG D. Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. **Mol Ecol.** 17:5075–5091. 2008.
- HEYWOOD, V. H. & IRIONDO, J. M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation** 113: 321-335. 2003.
- HOEHNE, F. C. As plantas ornamentais da flora brasileira. **Boletim de Agricultura**, v.1, p.247-273, 1938.
- HOEHNE, F. C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil.** Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio. São Paulo. 1949.
- HOLST, A. W., **The world of Catasetum.** Timber press. pp. 346. 1999.

- JOHN, B. **Citogenética de populações**, Universidade de São Paulo USP. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo – SP, 1980. 84p.
- JOHN, B. **Citogenética de populações, Universidade de São Paulo USP**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo – SP, 1980. 84p.
- JONES, K., DAKER, M. G., The chromosome of orchids: III Catasetinae Schltr. **Kew Bulletin**. 22: 421-427. 1968.
- JONES, P.D., BRIFFA, K.R., BARNETT, T.P. AND TETT, S.F.B. Highresolution palaeoclimatic records for the last millennium: integration, interpretation and comparison with General Circulation Model control run temperatures. **The Holocene**., v 8, 455 – 71. 1998.
- JONES, W.; 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.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 632p. 2009.
- KARSBURG, I. V.; BILCE, T. M.; GALLO, R. **Identificação da NOR ativa em cromossomos de *Catasetum tigrinum* Lind**. Reunião Brasileira de Citogenética, São Paulo, v.2, p. 34, ago. 2011.
- KERSTEN, R.A. **Epifitismo vascular na bacia do alto Iguaçu, Paraná**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.
- KOCH, A.K.; SILVA, C.A. **Orquideas nativas de Mato Grosso**. Cuiaba, Ed. Carline & Caniato, 112 p. 2012.
- LAUTON, D. S.; KARSBURG, I. V.; SANTOS, A. C.; GOMES, C. M.; VIANA, T. L. **Caracterização Dos Cromossomos de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Linl.)** In: Congresso de Iniciação Científica, 4ª. (JC), Cáceres/MT. Anais... Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG, 2011. Vol. 7 (2011). Cód. 5825. ISSN ONLINE 2237-9258. CDROM 2178-7492. 2011.
- LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D. & LEITCH, I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. RMS microscopy handbooks, N. 27. **Bios Scientific Publishers Ltd.**, Oxford, 118 p., 1994.
- LLOYD, D.G. & SCHOEN, D.J. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. **International Journal of Plant Science** 153: 358 - 369. 1992.

- LORD, E.M. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. **The Botanical Review** 47: 421 - 449. 1981.
- LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of botany**, v. 98, n. 3, p. 515-27. 2006a.
- MACHADO, E. F. *Catasetum*, uma orquídea diferente. **O Mundo das Orquídeas**, v.4, p.5-6, 1998.
- MAEKAWA, V. O; BARROS, F.; FORNI-MARTINS, E. R.; Chromosome Numbers And Karyotypes Of *Catasetum* Species (Orchidaceae) Departamento de biologia, Institute of Biology, CP6109, Universidade de Campinas UNICAMP, 13083 - 3970, Campinas, SP, Brazil. **Botanical Garden of São Paulo**, São Paulo, Brasil. 2013.
- MARDAN, M. Varied pollinators for Southeast Asian crops. In: ROUBIK, D.W. (Ed). *Pollination of cultivated plants in the tropics*. Roma : FAO (FAO **Agricultural Services Bulletin** 118), p.142-149. 1995.
- MEESAWAT, U.; SRISAWAT, T.; EKSOMTRAMAGE, L.; KANCHANAPOOM, K. Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw .) with the analysis of flow cytometry. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 277-280, 2008.
- MENDONÇA, M.P. & LINS, L.V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas & Fundação Zêo-Botânica de Belo Horizonte, 157p. 2000.
- MIRANDA, F. **Orquídeas da Amazônia Brasileira**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 191p. 1996.
- MONDIN. M & NETO. A. D. Citogenética Vegetal Enfatizando A Família Orchidaceae *Orchidstudium* 4: 24-54. 16 de Agosto de 2006.
- MOORE, R. J., (eds) Index to plant chromosome numbers 1967 – 1971. **Regnum veg.** 90: 1 - 539. 1973.
- MOORE, R. J., (eds) Index to plant chromosome numbers 1973 – 1974. **Regnum veg.** 96: 1 - 257. 1977.
- MORAES, I.C.R. **Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae)**. 64f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

- MOREIRA, A. S. P.; ISAIAS, R. M. S. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**. 51(1):83-93. 2008.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia*. **Plantarum** 15, 473–497.
- NADKARNI, N. M. 1986a. An ecological overview and checklist of epiphytes in the Monteverde Cloud Forest. **Brenesia** 24:55-62. 1962.
- NELSON, A. D. AND W. J. ELISENS. Polyploid evolution and biogeography in *Chelone* (Scrophulariaceae): Morphological and isozyme evidence. **American Journal of Botany** 86: 1487-1501. 1999.
- NETO, A. D. & DALTON, H. B. Orchidstudium – **International Journal of Orchid Study** 2(1): 1-13, 2007.
- NOGUEIRA RE. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 37p. 2004.
- NOLLET. F., **Varição Numérica E Evolução Cariotípica Em Epidendrum L.** (Orchidaceae: Epidendroideae) Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. 2009.
- ODUM, E.P. **Fundamentos de ecologia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 927p. 1988.
- OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods to cell biology*. New York: **Academic Press, Inc.**, 1990. p.105-110, 1990.
- OTTO, S. P., WHITTON, J., Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics** 34: 401–437. 2000.
- PASZKO, B.A Critical and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*, Wien, v.258, p.39-48. 2006.
- PEDERSEN, H. A., Systematics and evolution of the *Dactylorhiza romana/sambucina* polyploid complex (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 152: 405–434. 2006.
- PEÑALOZA, A.P.S. II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** – DF, 89p. 2005.

PETINI-BENELLI, A. ; GRADE, A. . Novo Híbrido Natural de *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth (Orchidaceae) para o Norte de Mato Grosso, Brasil. **Orquidario** (Rio de Janeiro), v. 24, p. 124-132, 2010.

PRAÇA, M. M, CARVALHO, C. R., CLARINDO, W. R. A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato. **Sci. Hortic.** 122: 501-505. 2009.

PRICE, H. J.; HODNETT, G. E JOHNSTON, J. S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. **Annals of Botany** 86 (5): 929-934. 2000.

PRIDGEON, A. M., BATEMAN, R. M., COX, A. V., HAPPEMAN, J. R., CHASE, M. W., Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. **Lindleyana** 12: 89–109. 1997.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051 07- 0, Disponível em: <http://www.R-project.org>. 2005. Último acesso: 12 de novembro de 2013.

RAPOSO, J. G. **A Etimologia a Serviço dos Orquidófilos-** Vol. I. Editora Ave-Maria- São Paulo. 1992.

REEVES A, TEAR J (2000). Micromesure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors through Internet. Disponível em:: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micromesure>. Último acesso: 24 de novembro de 2013.

ROSADO TB, CLARINDO WR, CARVALHO CR. An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measure the DNA content of *Zea mays* A and B chromosome. **Plant Sci.** 176:154-158, 2009.

ROSSI, A. A. B., CLARINDO, W. R., CARVALHO, C. R., OLIVEIRA, L. O. Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. **Cytologia** 73: 53–60. 2008.

ROUBIK, D. W. Pollination system stability in tropical America. **Conservation Biology** 14: 1235 - 1236. 2000.

SACCHET, A. M. O. F. **Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas.** Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 99-104. 1999.

- SANDOVAL, A., HOCHER, V., VERDEIL, J.L., Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. **Plant Cell Rep.** 22: 25 - 31. 2003.
- SCAGLIA, J.A.P. Como classificar corretamente um *Catasetum*. **O Mundo das Orquídeas**, v.4, p.7- 8,1998.
- SCHUBERT, K. Wissen, Sprache, Medium, Arbeit. Ein integratives Modell der ein- und mehrsprachigen Fachkommunikation. Tübingen: Narr. Knowledge Systems and Translation. **Berlin/New York: Mouton de Gruyter**, 125-145. 2007.
- SEGRAVES, K.A., THOMPSON, J.N., SOLTIS, P.S. *et al.* Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossularifolia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p.253, 262, 1999.
- SHAPIRO, H.M., *Practical flow cytometry*. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 2003.
- SHARBEL, T.F.; MITCHEL-OLDS, T. Recurrent polyploidy origins and chloroplast phylogeography in the *Arabis holboellii* complex (Brassicaceae). **Heredity**, Essex, v. 87, p. 59-68. 2001.
- SILVA, J. B. F., SILVA, M. F. F., Orquídeas Nativas da Amazônia: O gênero *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth., **Museu Goeldi**. Pará, Brazil. 121 p. 1998.
- SINGER, R.B. & KOEHLER, S. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae). **Annals of Botany** 93:39-51. 2004.
- SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 391p. 1993.
- SODRÉ, L.M. K, MESTRINER, M.A. **Práticas de Genética**. Paraná: Editora UEL, 101p. 1999.
- SOLTIS, D. E., RIESEBERG, L. H., Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): Genetic insights from enzyme electrophoresis. **American Journal of Botany**. 73(2): 310 – 18, 1986.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. A., Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution** 14: 348 – 352. 1999.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., SCHEMSKE, D. W., HANCOCK, J., THOMPSON, J., Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? **Taxon** 56: 13–30. 2007.
- STEBBINS, G. L., **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. Edward Arnold, London. 1977.

- STEBBINS, R.A. **The Barbershop Singer: Inside the Social World of a Musical Hobby** (Toronto, ON: University of Toronto Press). 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 792p. 1998.
- TANAKA, R. H., KAMEMOTO, H., **List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae**. 1 In C. L. Withner (ed.), *The orchids, scientific studies*, 411–483. 1974.
- TANAKA, R., KAMEMOTO, H., Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III* (Arditti, J., ed.). **Cornell University Press, Ithaca**, pp. 324 - 410. 1984.
- TEODORO-PARDO, C.V.D. GARCÍA-VELÁZQUEZ, A. & CORONA-TORRES, T. Polimorfismo cromossômico em *Capsicum annum* L.(Solanaceae) em recolectas de Puebla, Morelos y Quartenário, México. **Agrociencia**, v.41, p. 873- 881, 2007. Disponível em: <<http://www.colpos.mx/agrocien/agrociencia.htm>>. Acesso em: 10, novembro, 2013.
- TOSCANO-DE-BRITO, A. L. Orchidaceae. In: B.L. Stannard (ed.), *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia – Brazil*, Royal Botanic Gardens. **Kew**. p. 725-767. 1995.
- VAN DER PIJL L, DODSON CH. **Orchid owers: their pollination and evolution**. Coral Gables, Miami, USA: University of Miami Press. 1966.
- VILHAR. B., GREILHUBER, J., KOCE, J. D., TEMSCH, E. M., DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. **Ann. Bot.** 87: 719-728. 2001
- VOLGMAYR, H., GREILHUBER, J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen Image Analysis. **Fungal Genet. Biol.** 25: 181 - 195. 1998.
- WARD, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.
- YANG, M.; LOH, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BMC cell biology**, v. 5, p. 33. 2004.
- YANPAISAN, W., KING, N. J. C., DORAN, P. M., Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnol. Adv.**, 17: 3-27. 1999.
- ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype Taxonomy. *Taxon*, Bureau, n.35, p.526 - 530. 1986.
- ZIMERMAM, G.K. Ecological correlates of labile expression in the orchid *Catasetum viridiflavum*. **Ecology**, v.72, n.2, p.597-608, 1991.