



# ECOLOGIA E CITOGENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *EPIDENDRUM SECUNDUM* JACQ. (ORCHIDACEAE: EPIDENDROIDEAE)

Enoque Medeiros Neto <sup>1,2</sup>

Felipe Nollet Medeiros de Assis <sup>2</sup>; Lânia Isis Ferreira Alves <sup>2</sup>; Juliana Pereira de Castro <sup>2</sup>; Leonardo Pessoa Felix <sup>2</sup>

1. Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Biologia, Campina Grande, Paraíba. 2. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Citogenética Vegetal, Campus III, Areia, PB, Brasil. e-mail: enoquemedeiros@gmail.com

## INTRODUÇÃO

O complexo *Epidendrum secundum* é uma das espécies mais variáveis e menos compreendida taxonomicamente (Brieger, 1976 - 1977), apresentando um grande número de sinônimos relacionados a ele, como *E. ansiferum* Rchb., *E. crassifolium* Lindl., *E. ellipticum* Grah., *E. elongatum* Jacq., dentre outras (Pinheiro & Barros, 2007a). Distribui-se por toda a América do Sul, ocorrendo em diversos habitats como na Cordilheira dos Andes, no planalto central do Brasil, em campos rupestres, na Mata Atlântica costeira e de altitude e em inselbergs da Caatinga (Pinheiro & Barros, 2007a), além da habilidade de colonizar novos tipos de habitats. A partir de análises multivariadas *E. secundum* foi recentemente considerada apenas uma espécie altamente polimórfica, apresentando alta variação morfológica contínua entre suas populações (Pinheiro & Barros, 2007a), porém insuficientes para o reconhecimento de espécies distintas.

Taxonomicamente a espécie foi delimitada por Lindley (1852 - 1859) no subgênero *Amphiglottium*, considerado monofilético e fortemente suportado em Bootstrap (van den Berg *et al.*, 2000). *E. secundum* pertence ainda a seção *Schistochila*, subseção *Tuberculata*, assim classificada com base na morfologia dos calos do labelo (Pinheiro & Barros, 2007b). Contudo, as evidências de diferentes níveis de ploidia em uma população de Pernambuco, completamente divergentes do número básico proposto para o gênero (Hágsater & Arenas, 2005), refletem a necessidade de uma varredura em busca do reconhecimento de seus citotipos. A escassez de dados citológicos em um amplo espaço amostral dificulta uma interpretação segura de suas relações filogenéticas inter e intra - específicas, bem como das forças que dirigem a evolução deste grupo em particular. As pesquisas que buscam esclarecer os limites entre espécies próximas ou a variabilidade entre populações são importantes porque revelam o padrão de evolução dos caracteres envolvidos na divergência dessas linhagens, ligados ao processo de especiação (Crawford & Mort, 2004).

## OBJETIVOS

Este trabalho objetivou analisar a variação cromossômica numérica em diferentes populações do Complexo *Epidendrum secundum* visando identificar os possíveis mecanismos ecológicos que ocorreram na evolução e adaptação dessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas citologicamente 15 populações do complexo *Epidendrum secundum*, localizadas em Fagundes (PB), Camocim de São Félix (PE), Brejo da Madre de Deus (PE), Santa Bárbara (MG), Nova Friburgo (RJ), Itatiaia (RJ), Curitiba (PR), Manhauçu (MG), Carrancas (MG), Mogi das Cruzes (SP), Santo Antônio do Itambé (MG), Santana do Riacho (MG) e três populações em Ubatuba (SP). Todos os espécimes das populações localizadas nos estados de Pernambuco e Paraíba foram coletados em campo, enquanto as populações das regiões Sul e Sudeste foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Botânica de São Paulo - IBT e posteriormente mantidas em cultivo no orquidário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba - Areia. Excisatas de todo o material analisado encontram-se depositadas nos Herbários Jaime Coelho de Moraes (EAN) e Instituto de Botânica de São Paulo (SP). Para as análises citológicas foram utilizadas pontas de raízes pré - tratadas com 8 - hidroxiquinoleína 0,2 mM a 40°C por 20 horas, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol absoluto/ácido acético glacial) por 3 - 24 horas e estocados a - 20°C no próprio fixador até posterior análise. A contagem do número, medição e análise da morfologia cromossômica foram realizadas através da coloração convencional com Giemsa (Guerra, 1983). As pontas de raízes foram hidrolisadas em HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos, esmagadas em ácido acético 45% e juntamente com as lâminas, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, secas ao ar, coradas e montadas em Entellan (Guerra & Souza, 2002). As melhores

células foram fotografadas em câmera digital Olympus D - 540 adaptada a um microscópio Olympus CX40.

Para a identificação do número cromossômico, pelo menos cinco metáfases foram examinadas por população, das quais as três melhores foram utilizadas para as medições cromossômicas. Foram analisados 15 indivíduos para cada população dos estados de Pernambuco e Paraíba, e um indivíduo para cada população das Regiões Sul e Sudeste. Todas as medições foram realizadas com o auxílio do programa Image Tool.

## RESULTADOS

Os espécimes analisados apresentaram núcleos interfásicos semi - reticulados e padrão de condensação profásico proximal. Os cariótipos apresentam - se fortemente assimétricos, em geral variando de 0.61 nos menores cromossomos a 4.71  $\mu\text{m}$  nos maiores. Além disso, ocorreram conjuntos cromossômicos maiores igualmente variáveis para cada citotipo. Os números cromossômicos diplóides variaram de  $2n = 40$  até  $2n = 84$ .

Nas populações de Nova Friburgo (RJ) e Santa Bárbara (MG) os cariótipos apresentaram - se assimétricos, bimodais, com  $2n = 40$  cromossomos e ocorrência de quatro satélites. Os cromossomos variaram de 1.26 a 4.71  $\mu\text{m}$ , formados por quatro cromossomos maiores e os demais claramente menores. Nas populações de Mogi das Cruzes (SP) e Manhuaçu (MG) ocorreram os números cromossômicos menos freqüentes da presente amostragem, ocorrendo apenas nestas populações. A população de Mogi das Cruzes apresentou cariótipo assimétrico, com  $2n = 50$ , com quatro cromossomos maiores que os demais. Em virtude do nível de condensação cromossômica não foi possível precisar a posição exata do centrômero. A população de Manhuaçu apresentou cariótipo fortemente assimétrico, com  $2n = 54$  cromossomos variando de 0.68 a 4.30  $\mu\text{m}$ , apresentando seis cromossomos claramente maiores. Não foram observados satélites nas células analisadas.

Nas populações de Ubatuba (SP), Itatiaia (RJ), Curitiba (PR), Carrancas (MG), Santo Antônio do Itambé (MG), Santana do Riacho (MG) e Camocim de São Félix (PE) observou - se o número cromossômico mais freqüente dentre as populações analisadas. Os espécimes apresentaram  $2n = 56$  cromossomos, com cariótipo assimétrico que variaram de 1.26 a 3.69  $\mu\text{m}$  e sete cromossomos claramente maiores que os demais, além da ocorrência de quatro satélites.

Nas populações da Região Nordeste, possivelmente em virtude do maior número de indivíduos analisados por população, tanto a variação intrapopulacional como os números cromossômicos foram bastante elevados. A população de Camocim de São Félix (PE) foi a mais variável, apresentando  $2n = 56$  (11 indivíduos), 68 (dois indivíduos) e 84 (dois indivíduos). Nas populações de Fagundes (Pedra de Santo Antônio - PB) e Camocim de São Félix (PE) ocorreram cariótipos com  $2n = 68$  cromossomos, bastante assimétricos, variando de 0.61 a 3.03  $\mu\text{m}$ , com um conjunto de seis cromossomos maiores. Nas populações do Brejo da Madre de Deus (PE) e também em Camocim de São Félix (PE) observou - se o maior número cromossômico dentre as populações analisadas na presente amostragem, com in-

divíduos apresentando  $2n = 84$  cromossomos, e cariótipo assimétrico variando de 1.26 a 3.68  $\mu\text{m}$ , com dez cromossomos claramente maiores que os demais. Além disso, foi possível observar a ocorrência de um satélite.

Os números cromossômicos da presente amostragem variaram de  $2n = 40$  em populações que ocorrem no Sudeste, até  $2n = 84$  em populações que ocorrem no Nordeste. Foi confirmada a contagem prévia de  $2n = 68$  (Felix & Guerra, 2001) em populações que ocorrem nos estados da Paraíba e Pernambuco, além de cinco contagens inéditas para esta espécie, com  $2n = 40, 50, 54, 56$  e 84. Todos os citotipos analisados apresentaram cariótipos bastante assimétricos, claramente bimodais, exibindo como característica mais marcante para este grupo um conjunto de cromossomos maiores, assim como ocorre em *Epidendrum fulgens*, *E. orchidiflorum*, *E. cinnabarinum* e *E. denticulatum*, espécies também pertencentes ao grupo *Amphylottidae*. De acordo com Stebbins (1971), citotipos cujos cariótipos são assimétricos originam - se de ancestrais com cariótipos mais simétricos, e em alguns casos, alterações estruturais são responsáveis pelo aumento da assimetria destes cariótipos. A origem de cariótipos bimodais é atualmente bastante discutida, sugerindo - se também que ocorrem através da hibridização entre táxons com cromossomos de diferentes tamanhos. Conforme Stebbins (1971), o aumento no tamanho de alguns cromossomos ocorre em função de reorganizações genômicas, agrupando genes importantes para a adaptação destes táxons.

Uma possível origem híbrida pode estar conduzindo estes ajustes de forma mais eficiente, conferindo a *E. secundum* a habilidade de colonizar novos tipos de habitats (Dressler, 1989; Hågsater & Arenas, 2005) e oferecendo ao grupo uma alta plasticidade fenotípica em decorrência desta adaptação (Pinheiro & Barros, 2007b). Outra forte evidencia de uma provável origem híbrida é a ocorrência de poliploidia (Stebbins, 1971), onde se verificou diferentes níveis de ploidia ocorrendo em simpatria nas populações amostradas em Pernambuco e Paraíba, com citotipos apresentando  $2n = 56, 68$  e 84. Estas populações localizam - se em regiões mais áridas, caracterizadas pela escassez de água, elevados índices de radiação solar e temperaturas mais elevadas, sendo principalmente colonizadas por espécies xerófitas. O número diplóide mais freqüente na presente amostra,  $2n = 56$ , sugere que  $2n = 84$  é triploide, e esta linhagem aloploide desconhecida possivelmente surgira de um ancestral híbrido com  $n = 28$ , que possivelmente ajustou a segregação dissômica através da poliploidia. No gênero *Epidendrum*, 70% das espécies com registro cariológico possuem  $n = 20$ , seguido de  $n = 28, 40$  (Felix & Guerra, 2001).

A família Orchidaceae provavelmente exibe uma correlação positiva entre quantidade de DNA e habitat terrestre (Leitch *et al.*, 2009). Contudo, apesar de os níveis mais elevados de ploidia em *Epidendrum* ocorrerem em espécies terrestres, como *E. orchidiflorum* (ca. 112) e *E. cinnabarinum* ( $2n = 240$ ), *E. fulgens*, uma espécie terrestre, apresenta o menor número cromossômico conhecido para o gênero ( $2n = 24$ ). Em contrapartida, *E. ciliare*, cujo hábito é predominantemente epífita, apresentam números cromossômicos variando de  $2n = 40$  a  $2n = 160$  (Goldblatt, 1985), sugerindo que em *Epidendrum* a poliploidia e, possivelmente a quan-

tidade de DNA, não está relacionada ao ambiente terrestre ou rupícola, mas possivelmente a disponibilidade de água e/ou temperatura. Uma segunda linhagem provavelmente seguiu direção evolutiva diferente através de disploidias descendentes, provavelmente por fusão cêntrica, a partir de populações com  $2n = 56$ , resultando nos citotipos com  $2n = 54, 50$  e  $40$ , como se observou em populações que ocorrem no Sul e Sudeste, cuja assimetria é menor entre os cromossomos, claramente maiores nestes cariótipos. As alterações cromossômicas estruturais que possivelmente ocorreram poderiam ser mantidas através da reprodução clonal. *E. secundum*, assim como outras espécies do grupo *Amphygloptidae* se reproduzem facilmente pela brotação de gemas dos nós da haste floral.

## CONCLUSÃO

O complexo *Epidendrum secundum* L. representa um exemplo claro de polimorfismo cromossômico numérico e estrutural. A variação encontrada na presente pesquisa indica a ocorrência de constantes ciclos de poliploidia e disploidia como os principais mecanismos que dirigem a evolução e adaptação em *E. secundum*. Fortes ajustes genéticos estão ocorrendo em *E. secundum* em função das variadas condições ambientais nas quais suas populações ocorrem.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS

Brieger, F. G. Gattungsreihe Epidendra. In: Brieger F. G., Maatsch R. & Senghas K. (eds.). *Schlechter*, Die Or-

chideen Berlin, Paul Parey, v. 3(1), 1976-1977, p. 509 - 549. Crawford, D. J. & Mort, M. E. Single - locus molecular Markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. *Taxon* 53:631 - 635, 2004. Dressler, R. L. *The orchids: natural history and classification*. Massachusetts: Harvard University Press, 1989, 333p. Felix, L. P. & Guerra, M. Citogenética e Citotaxonomia de Orquídeas do Brasil. Recife, PE, UFPE. 2001, 227p. Goldblatt, P. *Index to plant chromosome numbers 1982-1983*. St. Louis, Missouri Botanical Garden, 1985, 224p. Guerra, M. *Variação no conteúdo de DNA nuclear de Pisum sativum L.* Ciência e Cultura (SBPC), São Paulo - Brasil, 1983, 1663p. Guerra, M. & Sousa, M. J. *Como observar cromossomos - Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. FUPEC. Ribeirão Preto, 2002, 131p. Hágsater E. & Arenas M.A.S. *Epidendrum L.* - In: Pridgeon, A.M. et al., (Eds), *Genera Orchidacearum*. Oxford Univ. Press, 2005, p.236 - 251. Leitch IJ, Kahandawala I, Suda J. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*, 2009. Lindley, J. *Epidendrum*. - In: Lindley, J. (eds.), *Folia Orchidacea*. J. Matthews, London, 1852-1859, p. 1 - 97. a. Pinheiro, F. & Barros, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany* 25:129 - 136, 2007. b. Pinheiro, F. & Barros, F. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea* 34:563 - 570, 2007. Stebbins, G.L. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold, London, 1971. Van den Berg C, Higgins W.E., Dressler R.L., Whitten W.M., Arenas A., Culham A., Chase M.W. . A Phylogenetic Analysis Of Laeliinae (Orchidaceae) Based On Sequence Data From Internal Transcribed Spacers (Its) Of Nuclear Ribosomal Dna. *Lindleyana* 15:96-114, 2000.