



# CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DE *EPIDENDRUM* L. (ORCHIDACEAE: EPIDENDROIDEAE)

Felipe Nollet Medeiros de Assis<sup>2</sup>

Enoque Medeiros Neto<sup>1,2</sup>; Bruno César Querino de Souza<sup>2</sup>; Lânia Isis Ferreira Alves<sup>2</sup>; Leonardo Pessoa Félix<sup>2</sup>

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

## INTRODUÇÃO

*Epidendrum* L. é um dos maiores gêneros neotropicais da família Orchidaceae, com cerca de 1130 espécies (Chase *et al.*, 2003), amplamente distribuídas na América do Sul (Hágsater & Arenas, 2005). O gênero possui alto grau de polimorfismos inter e intraespecíficos como ocorre em *E. secundum* e *E. nocturnum* (Pabst & Dungs, 1975). As espécies são caracterizadas por apresentarem caules principalmente cilíndricos, raramente pseudobulbosos, folhas geralmente dísticas, flores com labelo fundido com a base da coluna e antera com duas ou quatro políneas sésseis (Hágsater & Arenas, 2005).

É um dos gêneros taxonomicamente bastante discutível, apresentando diversas dúvidas quanto ao seu posicionamento taxonômico e delimitação de suas espécies, em decorrência da descontinuidade morfológica (Pinheiro & Barros, 2007), caracteres anatômicos pouco informativos, agentes polinizadores não específicos e alta variabilidade cromossômica numérica. Nesse contexto, torna-se difícil compreender as relações filogenéticas no gênero, e deste com os demais membros da subtribo Laeliinae, em virtude da escassez de dados citogenéticos e moleculares que suportem uma hipótese segura da sua filogenia.

Citologicamente, apenas 4,6 % das espécies do gênero *Epidendrum* são conhecidas, com variação cromossômica desde  $n = 12$  em *E. mosenii* a  $n = ca. 120$  em *E. cinnabarinum* (Guerra, 2000). O número mais frequente para o gênero é  $n = 20$  que ocorre em aproximadamente 70% das espécies com registro cariológico conhecido (Felix & Guerra, 2001). Este também é o número mais frequente em outros membros da subtribo Laeliinae, o que sugere  $x = 20$  como número básico para o gênero e provavelmente para toda a subtribo. Contudo, os dados cariológicos são escassos, o que dificulta a compreensão da história evolutiva do gênero, das direções da evolução cariológica, dentre muitos outros aspectos de suas relações filogenéticas e do próprio número básico.

## OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou avaliar a variação e evolução cariotípica em espécies pertencentes à seção *Epidendrum sensu* Pabst & Dungs (1975), com base em dados levantados na literatura e na análise do cariótipo de 8 espécies brasileiras dessa seção.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 15 espécimes de *E. nocturnum* Jacq., 20 espécimes de *E. difforme* Jacq., 15 espécimes de *E. latilabre* Lindl., 20 espécimes de *E. ramosum* Jacq. e 9 espécimes de *E. tridactylum* Lindl. coletados em Taquaritinga do Norte (PE), 7 espécimes de *E. sp. nv. (aff. difforme)*, coletados em Pacoti (CE), 18 espécimes de *E. paniculatum* Ruiz & Pavon e 7 espécimes de *E. viviparum* Lindl. coletadas em Alto Paraíso (GO), totalizando oito populações estudadas na presente pesquisa. Todo o material analisado foi mantido em cultivo no orquidário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Exsicatas desses espécimes encontram-se depositadas no Herbário Jaime Coelho de Moraes (EAN). As espécies foram identificadas fundamentalmente segundo Pabst & Dungs (1975), mas os binômios foram atualizados de acordo com World Orchid Checklist - [www.kew.org/data/monocotsRedirect.html](http://www.kew.org/data/monocotsRedirect.html).

Para as análises citológicas foram utilizadas pontas de raízes pré-tratadas com 8 - hidroxiquinololeína 2mM a 8 a 10°C por 20 horas, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol absoluto/ácido acético glacial) por 3 - 24 horas e estocados em a - 20°C no próprio fixador e coradas convencionalmente com Giemsa. Para o preparo das lâminas, 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. As melhores células foram fotografadas em câmera digital Olympus D - 540 adaptada a um microscópio Olympus CX40. Todas as medições foram realizadas com o auxílio

do programa Image Tool.

## RESULTADOS

Todas as espécies analisadas apresentaram núcleos interfásicos semi - reticulados e padrão de condensação profásico proximal com variação intra e interespecíficas no número, tamanho e distribuição dos cromocentros. Os cariótipos foram simétricos. No grupo Subumbellatae foram analisadas quatro espécies distribuídas em duas Alianças: *E. nocturnum* apresentou  $2n = 80$ , cariótipos relativamente simétricos e cromossomos pequenos, enquanto *E. difforme*, *E. latilabre* e *Epidendrum sp. nov.* (aff. *difforme*) tiveram cariótipos similares, principalmente simétricos, com  $2n = 40$  e cromossomos metacêntricos a submetacêntricos. No grupo Paniculatae, *E. paniculatum* apresentou  $2n = 40$ , cariótipo simétrico formado por cromossomos medindo 0.99 a 2.45  $\mu\text{m}$ , semelhante a *E. ramosum* do grupo Strobiliferae, com  $2n = 40$  e cromossomos medindo 1.48 a 3.60  $\mu\text{m}$ . Na seção *Psilanthemum*, *E. viviparum* e no ex gênero *Amblostoma*, *E. tridactylum*, também tiveram  $2n = 40$ .

O gênero *Epidendrum* L. é bastante variável em termos de números cromossômicos, com evolução envolvendo eventos de poliploidia e disploidia (Hagsater & Arenas, 2005). Foram confirmadas as contagens prévias de *E. difforme* (Felix & Guerra, 2001), *E. paniculatum* (Tanaka & Kamemoto, 1984),  $2n = 80$  para *E. nocturnum* (Blumenschein, 1960).

Níveis mais elevados de ploidia foram observados em *E. nocturnum*, do grupo Subumbellatae, com  $2n = 80$ , *E. orchidiflorum*, com  $2n = \text{ca. } 112$ , *E. cinnabarinum*, com  $2n = 240$ , do grupo *Amphyglottidae* e *E. ciliare*, com  $2n = 80$  e 160 (Goldblatt, 1985), da seção *Aulizeum sensu* Pabst. & Dungs. (1975). Na subtribo Laeliinae, a poliploidia também ocorre nos gêneros *Prosthechea*, *Cattleya* e *Sophranitis* (Felix & Guerra, 2001), sugerindo que este evento ocorreu *de novo* em diversos membros dessa subtribo. Poliploidia é considerada a alteração cromossômica mais importante na evolução das Angiospermas (Stebbins, 1971; Soltis *et al.*, 2003; Guerra, 2008). Na subfamília Epidendroideae o tamanho do genoma varia em mais de 60 vezes, desde 0,3 a 19.8pg, com registro para o tamanho genômico em uma única espécie de *Epidendrum* (Leitch *et al.*, 2009).

Todavia, com número cromossômico variando de  $n = 12$  a  $n = 120$ , a poliploidia parece desempenhar um papel importante na evolução da quantidade de DNA no gênero. Curiosamente, os extremos da variação cromossômica numérica observada em *Epidendrum* ocorrem em espécies com habitat terrestre ou rupícola (*E. fulgens* e *E. cinnabarinum*), um gênero predominantemente epifítico (Pabst & Dungs, 1975). A família Orchidaceae como um todo, parece ter uma correlação positiva entre quantidade de DNA e o habitat terrestre (Leitch *et al.*, 2009), o mesmo ocorrendo com a poliploidia no gênero *Oncidium* que parece relacionada ao habitat terrestre ou rupícola (Felix & Guerra, 2001). No gênero *Laelia*, as espécies também aparentam ter números cromossômicos mais elevados em representantes rupícolas do que epifíticos (Blumenschein, 1957).

Contudo em *Epidendrum*, embora os níveis mais elevados de ploidia ocorram em representantes terrestres, como *E.*

*orchidiflorum* e *E. cinnabarinum*, o menor número cromossômico conhecido para o gênero em *E. fulgens* ( $2n = 24$ ), uma espécie terrestre ou rupícola. Além disso, em *E. ciliare*, principalmente epifítico, os números cromossômicos variam de  $n = 20$  a  $n = 80$  (Goldblatt, 1985) sugerindo que em *Epidendrum* a poliploidia e, possivelmente a quantidade de DNA, não está correlacionada ao tipo de hábito, mas a outras características ambientais.

*E. nocturnum* trata - se de uma espécie altamente polimórfica, com distribuição por toda a América Tropical, composta por quatro grupos formalmente reconhecidos (Brieguer & Bicalho, 1999), que podem ocorrer em simpatria, porém em microhabitats definidos, sem evidências de intergraduação (Carnevali & Romero, 1996). Nessa espécie, há registro de populações com  $2n = 40, 74, 80$  e  $85$  (Blumenschein, 1960; Tanaka & Kamemoto, 1984). Essa variação é interpretada como consequência de antigas combinações de genomas ajustada por apomixia (Veyret, 1996).

Em *Epidendrum*, 70% das espécies com registro cariológico possuem  $n = 20$ , seguido de  $n = 28, 40$  (Felix & Guerra, 2001). Números parecidos, especialmente  $n = 20$  ocorrem amplamente em todos os gêneros da subtribo Laeliinae, sugerindo  $x = 20$  como número básico para o gênero. As Angiospermas como um todo são consideradas antigos poliplóides que sofreram processo de diploidização através de massivo silenciamento gênico ou redução no número cromossômico (Adams & Wendel, 2005). É provável que esses processos estejam ativos na evolução cariológica de *Epidendrum*, sendo especialmente notável no grupo *Amphyglottidae*.

## CONCLUSÃO

De um ponto de vista estritamente da variação cromossômica numérica para o gênero *Epidendrum*, o número básico primário que explicaria mais parcimoniosamente as relações com outras espécies de Laeliinae seria  $x = 10$ , aparentemente inexistente nas espécies atuais do gênero. No grupo *Amphyglottidae*, o surgimento de um cariótipo com  $n = 12$  e um par cromossômico maior parece ter ocorrido no início da divergência dessa linhagem e  $x = 12$  provavelmente representa um número básico restrito a esse grupo. As demais linhagens de *Epidendrum* parecem ter sido derivadas secundariamente de um estoque ancestral com  $x = 20$  presente na maioria dos representantes atuais do gênero.

### Agradecimentos

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

## REFERÊNCIAS

- Adams K. L., Wendel, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in plant biology*. 8: 135-141, 2005
- Blumenschein, A., Estudos citológicos na família Orchidaceae. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP, USP. 1957, 142.

- Blumenschein, A. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas da Universidade de São Paulo*, 1: 45-50, 1960.
- Brieger, F. G., Bicalho, A. D. Observações taxonômicas no *Epidendrum nocturnum* Jacq, 2009.
- Carnevali, G., Romero, G. A. Orchidaceae Dunstervilleorum VII: The *Epidendrum nocturnum* Alliance in the Venezuelan Guayana and the Guianas. *Lindleyana* 11: 239 - 249, 1996
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L., Freudenstein, J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: K.W. Dixon, S.P.Kell, R.L.Barrett, P.J. Cribb (eds). *Orchid conservation. Natural History Publications*, Sabah, 2003, p. 69 - 89.
- 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. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 23: 1029 - 1041, 2000.
- Guerra, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120: 339-350, 2008
- 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.
- Pabst, G. F. J., Dungs, F. *Orchidaceae Brasiliensis Band 1*. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmiersow, 1975
- Pabst, G. F. J., Dungs, F. *Orchidaceae Brasiliensis, Band 2*. Hildesheim: BrückeVerlang Kurt Schmiersow, 1975
- 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.
- Soltis D. E. A. E. Sinters M. J. Zanis S. Kim J. D. Thompson P. S. Soltis L. Ronse de Craene, P. K. Endress, J. S. Farris. Gunnerales are sister to other core eudicots, and exhibit floral features of early - diverging eudicots. *American Journal of Botany* 90: 461 - 470, 2003
- Tanaka, R., Kamemoto, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. Pp. 324 - 410. In: J. Arditti, (Ed.). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Ithaca: Cornell University Press, 1984
- Veyret, Y. Orchidees Cult. Protect. no.25. 24 - 25. illus. Icones, Chromosome numbers, Embryology, 1996.