

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JÚLIA YAMAGISHI COSTA

**Citotaxonomia e aspectos evolutivos de espécies de
Hoffmannseggella H.G.Jones (Orchidaceae), de campos
rupestres brasileiros**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal.

ORIENTADOR: PROFA DRA ELIANA REGINA FORNI-MARTINS

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C823c

Costa, Júlia Yamagishi
Citotaxonomia e aspectos evolutivos de espécies de
Hoffmannseggella H.G. Jones (Orchidaceae), de campos
rupestres brasileiros / Júlia Yamagishi Costa. --
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Eliana Regina Forni-Martins.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citotaxonomia das plantas. 2. *Hoffmannseggella*.
3. Orchidaceae. 4. Hibridação. I. Forni-Martins,
Eliana Regina. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Cytotaxonomy and evolutionary aspects of *Hoffmannseggella* H.G. Jones species (Orchidaceae), from brazilian “campos rupestres”.

Palavras-chave em inglês: Plant cytotaxonomy; *Hoffmannseggella*; Orchidaceae; Hybridization.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

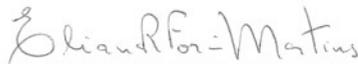
Banca examinadora: Eliana Regina Forni-Martins, Fábio de Barros, George John Shepherd, Leonardo Pessoa Félix, Neiva Isabel Pierozzi.

Data da defesa: 09/06/2006.

Campinas, 9 de junho de 2006

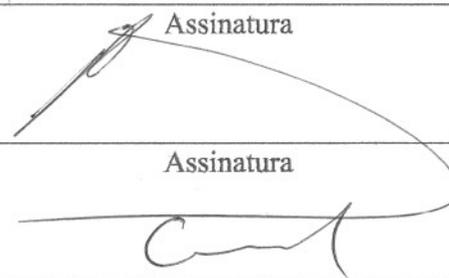
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Regina Forni-Martins



Assinatura

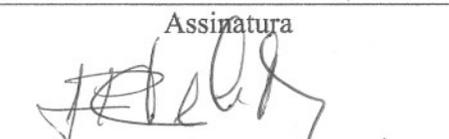
Prof. Dr. Fábio de Barros


Assinatura

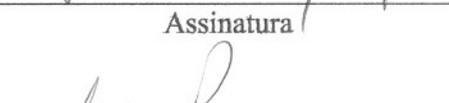
Prof. Dr. George John Shepherd

Assinatura

Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix


Assinatura

Profa. Dra. Neiva Izabel Pierozzi


Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello


Assinatura

Prof. Dr. João Semir


Assinatura

Profa. Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh


Assinatura

200619565

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

À TODOS QUE ME AJUDARAM

“(...) Estes homens, afinal, obtiveram tudo quanto a mão pode atingir, estendendo o braço. Variava neles o comprimento do braço, no resto eram iguais. Não consegui nunca ter inveja desta espécie de gente. Achei sempre que a virtude estava em obter o que não se alcançava, em viver onde se não está, em ser mais vivo depois de morto que quando se está vivo, em conseguir, enfim, qualquer coisa de difícil, de absurdo, em vencer, como obstáculos, a própria realidade do mundo.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Eliana, por ter me acompanhado desde a iniciação científica e por ter sido sempre mais que uma orientadora. Agradeço por todos os ensinamentos e por toda confiança depositada em mim durante todo esse período.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado concedida e pelos auxílios fornecidos à Dra. Eliana, possibilitando a realização desta pesquisa.

À CAPES, pelo apoio institucional, e ao CNPq pelo auxílio à minha orientadora e ao laboratório.

À UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica e Laboratório de Biossistemática pela ótima infra-estrutura concedida.

Aos Departamentos de Biologia Celular e de Fisiologia Vegetal, por terem colaborado em várias etapas desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Botânica, funcionários e colegas, por todos os conselhos e sugestões, além do acolhimento carinhoso durante todo este período.

À Coordenadoria e Secretaria de Pós-Graduação por todas as informações e ajudas relativas aos trâmites burocráticos necessários.

Aos Professores Drs. Eduardo Moscone (Universidade de Córdoba) e André L.L. Vanzela (Universidade Estadual de Londrina) pelos cursos de aperfeiçoamento oferecidos.

Ao colega e companheiro de “karma”, MsC. Christiano Franco Verola, pela identificação das espécies e colaboração com o trabalho.

À técnica do laboratório de Biossistemática, Iara, por todo o suporte e auxílio fornecidos; e ao motorista e auxiliar de campo Renato Belinello pelo auxílio nas coletas.

Aos “irmãozinhos” Mariana, Andréa, Itayguara, Vanessa e Juan, por terem sido sempre um grupo de pesquisa, sempre fornecendo ajuda, conselhos, ensinamentos e uma ótima convivência no laboratório.

Ao amigo Carlos Victor pelo “QG” oferecido em Diamantina, sempre ajudando nas coletas e sendo ótima companhia para os momentos de descontração após as coletas.

Aos amigos Mariana e Luis Pedro, Andréa e Emerson, Vanessa e Fábio, e Carla e Rogério pela amizade “extra-laboratorial”, estando sempre presentes até nos momentos mais difíceis.

A todos os colegas do Departamento, Ana Paula Gonçalves, Raquel, Fabiano “careca”, Rubem, Kayna, e muitos outros, pela amizade.

Aos meus queridos amigos do “nós-tratamos”, Dr. Landini, Sardinha, Gu, Bárbara, Dete, Fernanda, Danton, Heitor, Silvana, Norma, Carlos, Nádia e outros que já fizeram parte deste grupo, principalmente por falarem a verdade, por mais dolorida que seja.

Aos professores Marcus, Renata e também Rafael, por terem me apresentado ao Kungfu/Wushu e por me ensinarem mais do que apenas o esporte, sendo meus exemplos de dedicação, superação e caráter. Também aos meus companheiros de “sofrimento” neste suado esporte, Mateus, Pedro “C3PO”, Rachel, Pedro, Marcelo, Ricardo, Gabi, Rúlia, Tati, e muitos outros, pela amizade e apoio nos campeonatos, durante todo este período.

Aos meus pais e minha irmã, pelo incentivo desde sempre.

ÍNDICE

1. RESUMO	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUÇÃO GERAL	13
4. CAPÍTULO 1: Números cromossômicos e comportamento meiótico de sete espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G.Jones (Laeliinae, Orchidaceae)	22
4.1 Resumo	23
4.2 Introdução	24
4.3 Material e Métodos	29
4.4 Resultados	32
4.5 Discussão	38
4.6 Bibliografia	44
5. CAPÍTULO 2: <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> Verola & Semir – Evolução por aneuploidia a partir de uma espécie sincronopátrica?	54
5.1 Resumo	55
5.2 Introdução	56
5.3 Material e Métodos	58
5.4 Resultados	61
5.5 Discussão	66
5.6 Bibliografia	70
6. CAPÍTULO 3: Caracterização cariotípica de sete espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G. Jones por bandamentos C e por fluorocromos e hibridação <i>in situ</i> para a região 45S de DNAr	74
6.1 Resumo	75
6.2 Introdução	76
6.3 Material e Métodos	82
6.4 Resultados	87
6.5 Discussão	93
6.6 Bibliografia	98
7. CONCLUSÃO GERAL	109
8. BIBLIOGRAFIA GERAL	115

ÍNDICE DE FIGURAS

3. INTRODUÇÃO GERAL	13
Figura 1. Mapa de distribuição das espécies estudadas.	21
4. CAPÍTULO 1: Números cromossômicos e comportamento meiótico de sete espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G.Jones (Laeliinae, Orchidaceae)	22
Figura 1. <i>Hoffmannseggella angereri</i>	47
Figura 2: <i>Hoffmannseggella briegeri</i> , <i>H. cinnabarina</i> e <i>H. crispata</i>	48
Figura 3: <i>Hoffmannseggella fournieri</i> e <i>H. liliputana</i>	49
Figura 4: <i>Hoffmannseggella rupestris</i> – variação morfológica	50
Figura 5: <i>Hoffmannseggella rupestris</i> – pop. de Biribiri/Diamantina	51
Figura 6: <i>Hoffmannseggella rupestris</i> – pop. Soberbo e Caminho dos Escravos/Diamantina	52
Figura 7: <i>Hoffmannseggella rupestris</i> – pop. Fco. Sá, Botumirim e Grão Mogol	53
5. CAPÍTULO 2: <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> Verola & Semir – Evolução por aneuploidia a partir de uma espécie sincronopátrica?	54
Figura 1: <i>H. bradei</i> e <i>H. viridiflora</i> – morfologia, metáfases mitóticas e ideogramas	72
Figura 2: <i>H. bradei</i> – meiose e tétrades	73
6. CAPÍTULO 3: Caracterização cariotípica de sete espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G. Jones por bandamentos C e por fluorocromos e hibridação <i>in situ</i> para a região 45S de DNAr	74
Figura 1: Representação esquemática dos tipos cromossômicos	104
Figura 2: <i>Hoffmannseggella angereri</i>	105
Figura 3: <i>Hoffmannseggella briegeri</i>	106
Figura 4: <i>Hoffmannseggella caulescens</i> , <i>H. fournieri</i> , <i>H. liliputana</i>	107
Figura 5: <i>Hoffmannseggella rupestris</i>	108

ÍNDICE DE TABELAS

3. INTRODUÇÃO GERAL	13
Tabela 1: números cromossômicos documentados por Blumenschein (1960)	17
4. CAPÍTULO 1: Números cromossômicos e comportamento meiótico de sete espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G.Jones (Laeliinae, Orchidaceae)	22
Tabela 1: números cromossômicos documentados por Blumenschein (1960)	28
Tabela 2: números cromossômicos obtidos no presente trabalho	32
Tabela 3: normalidade de tétrades de <i>Hoffmannseggella rupestris</i>	36
5. CAPÍTULO 2: <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> Verola & Semir – Evolução por aneuploidia a partir de uma espécie sincronopátrica?	54
Tabela 1: Medidas cariotípicas de <i>Hoffmannseggella bradei</i>	63
Tabela 2: Medidas cariotípicas de <i>Hoffmannseggella viridiflora</i>	65
6. CAPÍTULO 3: Caracterização cariotípica de sete espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G. Jones por bandamentos C e por fluorocromos e hibridação <i>in situ</i> para a região 45S de DNAr	74
Tabela 1: Números cromossômicos documentados para <i>Hoffmannseggella</i>	79
Tabela 2: Dados de bandamentos e FISH	88

1. RESUMO

Dentro da família Orchidaceae, composta por cerca de 25.000 espécies, o gênero *Hoffmannseggella* (antiga seção *Parviflorae* do gênero *Laelia* Lindl.) é composto por espécies rupícolas, endêmicas da Cadeia do Espinhaço/MG. Estudos sugerem uma evolução rápida para o gênero, com a transição do hábito epifítico para o rupícola, mudança de polinizadores e eventos de hibridização e poliploidia como os principais mecanismos evolutivos envolvidos na origem das espécies de *Hoffmannseggella*.

Estudos cromossômicos prévios haviam sugerido o número básico de $x=20$ para o gênero, com alta incidência de poliplóides. No presente trabalho, foram obtidas contagens cromossômicas para dez espécies: *H. angereri* $n=20/2n=40$, *H. bradei* $n=20-21/2n=40$, *H. briegei* $2n=80$, *H. caulescens* $2n=80$, *H. cinnabarina* $2n=40$, *H. crispata* $n=20$, *H. fournieri* $n=20/2n=40$, *H. liliputana* $2n=40/60$, *H. rupestris* $n=40/2n=80$ e $2n=40$ e *H. viridiflora* $2n=44$. Foi observada aneuploidia em células de meristema radicular em *H. briegei* ($2n=80$) e *H. rupestris* ($2n=80$), ocorrência de citótipos em *H. rupestris* ($2n=40/80$) e anormalidades meióticas em várias espécies, com presença de monovalentes, disjunção adiantada de bivalentes e possíveis tetravalentes nas espécies poliplóides. Por ocorrerem em sincronopatria, apresentarem alta similaridade morfológica e pelas características cromossômicas, é provável que *H. viridiflora* tenha se originado por aneuploidia a partir de *H. bradei*.

Através dos procedimentos de bandamentos C, CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD, foi possível observar grandes diferenças entre os cariótipos das espécies *H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegei*, *H. caulescens*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*. Em geral, as espécies apresentaram grande número de bandas C (predominantemente centroméricas e subteloéricas), poucas bandas CMA/DA⁺ (subteloméricas), e grande variação no número de bandas DAPI/AMD⁺ (predominantemente teloméricas). Apenas *H. bradei* apresentou somente duas bandas heterocromáticas, uma CMA/DA⁺ DA/DAPI e uma DAPI/AMD⁺ e *H. briegei* apresentou polimorfismo para bandas CMA/DA/DAPI. Com relação aos sítios 45S de DNAr, os resultados foram uniformes, sendo que as espécies diplóides, com $2n=40$, apresentaram dois sítios, enquanto as espécies poliplóides, com $2n=80$, apresentaram 4 sítios.

2. ABSTRACT

Inside Orchidaceae, composed of almost 25,000 species, *Hoffmannseggella* H.G.Jones (previous

genus *Laelia* Lindl., section *Parviflorae*) is characterized by rupicolous species, endemic to the Espinhaço Range/ MG. Previous studies suggested an explosive evolution of the genus, with transition from epiphytic to rupicolous habitat, changes on pollinator specificity and events of hybridization and polyploidy as the main evolutionary mechanisms that originated *Hoffmannseggella* species.

Chromosome data from literature suggested the base number of $x=20$ for the genus, with high incidence of polyploids. The present work presents chromosome counts for ten species: *H. angereri* $n=20/2n=40$, *H. bradei* $n=20-21/2n=40$, *H. briegei* $2n=80$, *H. caulescens* $2n=80$, *H. cinnabarina* $2n=40$, *H. crispata* $n=20$, *H. fournieri* $n=20/2n=40$, *H. liliputana* $2n=40/60$, *H. rupestris* $n=40/2n=80$ and $2n=40$ and *H. viridiflora* $2n=44$. We observed aneusomaty on root meristematic cells of *H. briegei* ($2n=80$) and *H. rupestris* ($2n=80$), two distinct cytotypes of *H. rupestris* ($2n=40$ and $2n=80$) and meiotic abnormalities in several species, like monovalents, early disjunction of bivalents and putative tetravalents on polyploid species. Because they are found synchronopatric, with high morphological and chromosomal similarity, we suggest that *H. viridiflora* ($2n=44$) is an aneuploid derived from *H. bradei* ($2n=40$).

With C, CMA/DA/DAPI and DAPI/AMD banding techniques, we observed great differences among *H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegei*, *H. caulescens*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*. With exception of *H. bradei*, that presented only two heterochromatic, one CMA/DA⁺ DA/DAPI and one DAPI/AMD⁺ bands, all species presented a high number of C-bands (mainly centromeric and subtelomeric), few CMA/DA⁺ bands (subtelomeric), and great numeric differences of DAPI/AMD⁺ bands (mainly telomeric). We also observed, in *H. briegei*, a polymorphism of CMA/DA/DAPI bands. The hybridization sites of 45S rDNA were uniform among species, with diploid species ($2n=40$) presenting two hybridization signals and polyploid species ($2n=80$) presenting four signals.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas conhecidas, possuindo cerca de 25.000 espécies, representando cerca de 7% das fanerógamas existentes (PIJL & DODSON 1966). Na tribo Epidendreae conforme apresentada por PABST & DUNGS (1975), a subtribo Laeliinae Benthham possuía 1466 espécies, agrupadas em 43 gêneros, caracterizadas por serem epifíticas ou terrestres, com caule delgado ou em pseudobulbos, folhas dísticas ou terminais, duplicadas e, usualmente articuladas, e inflorescência, em sua maioria, terminal. As flores podem ser grandes ou pequenas e muitas apresentam nectário em forma de cunículo (DRESSLER 1981). Nesta subtribo, PABST & DUNGS (1975), adotando o sistema de SCHLECHTER (1917), posicionaram o gênero *Laelia* Lindl., dividindo o mesmo em sete seções, sendo *Laelia*, *Podolaelia* e *Calolaelia* ocorrentes no México e América Central, enquanto que *Cattleyoides*, *Hadrolaelia*, *Microlaelia* e *Parviflorae* eram exclusivamente brasileiras (BARROS 1990). A seção *Parviflorae* era caracterizada por espécies, em sua maioria, rupícolas (VAN DEN BERG *et al.* 2000).

Análises moleculares recentes, utilizando as seqüências de DNA *ITS 1* e *ITS 2*, sugeriram que o gênero *Laelia* seria polifilético, e as espécies brasileiras de *Laelia*, e principalmente da seção *Parviflorae*, deveriam ser incluídas e sinonimizadas sob o gênero *Sophronitis* Lindl. (VAN DEN BERG *et al.* 2000; VAN DEN BERG & CHASE 2000). Entretanto, foram obtidas poucas diferenças nas seqüências *ITS 1* e *ITS 2* entre as espécies de *Laelia* da seção *Parviflorae* estudadas, de forma que os clados obtidos possuem uma sustentação baixa, além de haver várias politomias (VAN DEN BERG *et al.* 2000).

CHIRON & CASTRO NETO (2002) sugeriram, através de características morfológicas, ambientais e moleculares, que o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones deveria ser reconsiderado para acomodar as espécies rupícolas, conforme anteriormente proposto por H.G.JONES (1968). Ainda segundo H.G.JONES (1968), o gênero *Laelia* seria mantido apenas para as espécies epifitas

mexicanas, das seções *Laelia*, *Podolaelia* e *Calolaelia*. Dessa forma, as espécies previamente circunscritas na seção *Parviflorae*, com exceção das espécies *Laelia harpophylla*, *L. brevicaulis* e *L. kautskyi* (que juntas atualmente formam o gênero *Dungsia* Chiron & V.P.Castro), foram transferidas para o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones. Entretanto, a situação taxonômica do gênero *Hoffmannseggella*, com aproximadamente 32 espécies, ainda está em discussão, e a delimitação das espécies dentro do gênero é complexa, devido à alta variabilidade intra-específica e ao aparecimento de indivíduos com características intermediárias entre espécies previamente aceitas (BARROS 1990).

Os campos rupestres, ambiente onde ocorre a maioria das espécies do gênero *Hoffmannseggella*, geralmente possuem topografia acidentada, clima e solo secos. Estão amplamente associados à Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia, com partes disjuntas da mesma cadeia entre os limites de latitude de 21°10' e 10°S. A Cadeia do Espinhaço é formada de uma área de aproximadamente 1000 km de extensão e entre 50 e 100 km de largura, e está a mais de 800 m acima do nível do mar. Seu limite ao sul é a Serra do Ouro Branco, ao sul da cidade de Ouro Preto, em Minas Gerais, e se estende ao norte até o estado da Bahia (GIULIETTI & PIRANI 1988).

Os campos rupestres não constituem um único tipo de vegetação, mas sim um mosaico de comunidades relacionadas, condicionadas pela topografia local, pelo ângulo de declividade, pelas influências microclimáticas e pela natureza do substrato. As mesmas famílias de plantas ocorrem por todo o campo rupestre, mostrando hábito convergente. Entretanto, há uma extraordinária variedade de gêneros e, principalmente, espécies. Das espécies, muitas são endêmicas (GIULIETTI & PIRANI 1988). JOLY (1970) considerou que os campos rupestres possuem o maior grau de endemismo quando comparados a outros tipos vegetacionais brasileiros.

Segundo GIULIETTI & PIRANI (1988), as regiões montanhosas onde ocorrem os campos rupestres são descontínuas; as espécies são representadas por populações disjuntas, tornando difícil a interpretação do conceito de espécie. Com a formação de barreiras geográficas, surgem obstáculos

para o fluxo gênico entre as populações. As condições ecológicas destes ambientes possivelmente propiciam uma especiação intensa, podendo ser este um dos fatores dos endemismos e isolamentos encontrados em gêneros e espécies que ocupam este hábitat (GIULIETTI & PIRANI 1988).

Estudos sugerem que o gênero *Hoffmannseggella* teria surgido através de uma “explosão” evolutiva, com a penetração das espécies em uma nova área ecológica (os campos rupestres) e transição do hábito epifítico para o hábito rupícola. Paralelamente, teria ocorrido mudança de polinizadores, indicada pela diminuição no tamanho das flores e mudança no padrão de cores (BLUMENSCHNEIN 1960a; BRIEGER 1960, 1961, 1966), sugerindo inclusive que espécies deste gênero seriam ornitófilas, em contraste às das outras seções de *Laelia* que seriam melitófilas (DRESSLER 1981). Além desses fatores, a ampla troca de genes proporcionada eventos de hibridização e poliploidia sugerem que estes foram importantes no processo de evolução do grupo (BARROS 1990).

A origem por poliploidia e hibridação foi originalmente sugerida por BLUMENSCHNEIN (1960a), através de estudos cromossômicos, para espécies de *Hoffmannseggella* (então tratadas como pertencentes à seção *Parviflorae* de *Laelia*): *H. mixta* (Hoehne) V.P.Castro & Chiron, *H. milleri* (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron, *H. crispata* (Thumb.) H.G.Jones e *H. caulescens* (Lindley) H.G.Jones. BLUMENSCHNEIN (1960b) chamou atenção ainda para a grande quantidade de poliplóides dentro do grupo De acordo com PABST & DUNGS (1975) existem oito híbridos naturais documentados dentro da antiga seção *Parviflorae* de *Laelia*, incluindo inúmeros híbridos entre os gêneros *Laelia* e *Cattleya* Lindl. Pelo fato de ainda estarem ocorrendo eventos de hibridização entre as espécies de *Hoffmannseggella*, BARROS (1990) sugeriu que a “explosão” evolutiva do gênero ainda está em andamento. ANDERSON (1948) observou também que distúrbios no hábitat poderiam levar a um aumento na frequência de híbridos através da quebra de barreiras reprodutivas pré-zigóticas, como a especificidade de polinizadores, considerada como a principal barreira reprodutiva inter-específica dentro da família Orchidaceae (DRESSLER 1981).

Em um estudo de cruzamentos artificiais inter-específicos entre os gêneros *Laelia*, *Cattleya*, *Brassavola*, *Epidendrum*, *Schomburgkia* e *Sophronitis*, STORT (1984) obteve diversos híbridos com altas porcentagens de tétrades normais e ainda cruzamentos bem sucedidos entre os híbridos F₁.

Estudos citogenéticos na subtribo Laeliinae são extremamente escassos, sendo documentados os números cromossômicos de $2n=40$, $2n=60$ e $2n=80$, distribuídos entre 12 espécies de *Hoffmannseggella*, uma de *Dungsia*, duas de *Hadrolaelia* e uma de *Laelia* (Tabela 1), cultivadas em casa de vegetação. BLUMENSCHHEIN (1960b) ainda sugeriu o número básico de $x=20$ para *Laelia sensu lato*. Nesse outro estudo foram também observadas por BLUMENSCHHEIN (1957) anormalidades meióticas em algumas espécies, como *Hoffmannseggella crispata*, *H. mixta* e *H. cinnabarina*. Em *H. crispata* (citada como *Laelia flava*), o autor observou, em clones provenientes do município de São Thomé das Letras, em Minas Gerais, desde $n=20$ até $n=26$, além de falta de sincronização na migração dos cromossomos para os polos e tétrades com até dois micrócitos. Em *H. mixta*, o autor observou $n=20-23$, com anáfase mais regular que o observado em *H. crispata* e menor frequência de micrócitos nas tétrades. Apesar de ter observado apenas um clone de *H. cinnabarina*, BLUMENSCHHEIN (1957) documentou a variação de $n=20-24$, com anáfases irregulares e tétrades com micrócitos.

Tabela 1: Espécies de *Laelia* (L.) documentadas por Blumenschein (1960b) quanto ao número cromossômico (2n), com as respectivas denominações atuais, nos gêneros *Hoffmannseggella* (H.), *Dungsia* e *Hadrolaelia*.

DENOMINAÇÃO ANTIGA		DENOMINAÇÃO ATUAL	2n
SEÇÃO	ESPÉCIE	ESPÉCIE	
<i>Parviflorae</i>	<i>L. briegeri</i> Blumensch.	<i>H. briegeri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	80
	<i>L. caulescens</i> Lindl.	<i>H. caulescens</i> (Lindley) H.G.Jones	80
	<i>L. cinnabarina</i> Batem	<i>H. cinnabarina</i> (Batem. ex Lindley) H.G.Jones	40
	<i>L. crispilabia</i> A. Rich.	<i>H. caulescens</i> (Lindley) H.G.Jones	80
	<i>L. esalqueana</i> Blumensch.	<i>H. esalqueana</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. flava</i> Lindl.	<i>H. crispata</i> (Thunb.) H.G.Jones	40
	<i>L. longipes</i> Rchb. f.	<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V.P.Castro & Chiron	40, 60, 80
	<i>L. milleri</i> Blumensch.	<i>H. milleri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. mixta</i> Hoehne	<i>H. mixta</i> (Hoehne) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. ostermayerii</i> Hoehne	<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. rupestris</i> Lindl.	<i>H. rupestris</i> (Lindley) V.P.Castro & Chiron	80
	<i>L. tereticaulis</i> Hoehne	<i>H. tereticaulis</i> (Hoehne) H.G.Jones	80
	<i>L. harpophylla</i> Rchb. f.	<i>Dungsia harpophylla</i> (Rchb. f.) Chiron & V.P.Castro	40
<i>Cattleyodes</i>	<i>L. purpurata</i> Lindl.	<i>Hadrolaelia. purpurata</i> (Lindley & Paxton) Chiron & V.P.Castro	40
<i>Hadrolaelia</i>	<i>L. pumila</i> Rchb. f.	<i>Hadrolaelia. pumila</i> (Hooker) Chiron & V.P.Castro	40
<i>Podolaelia</i>	<i>L. anceps</i> Lindl.	<i>Laelia anceps</i> Lindl.	40

O estudo cariotípico, incluindo procedimentos como bandamentos C e com fluorocromos, além da hibridação *in situ*, tem indicado possíveis origens híbridas e detectado ocorrência de possíveis híbridos naturais em diversos grupos de plantas, como em *Clivia* (Amaryllidaceae) (MURRAY *et al.* 2001) e *Dahlia* (Asteraceae) (MURRAY *et al.* 1999). Dentre as técnicas de bandamento, utiliza-se o bandamento C para identificar a quantidade e localização da

heterocromatina constitutiva (SUMNER 1972) e coloração com fluorocromos para determinar a composição predominante de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4'-6 diamino-2 fenilindol) evidencia seqüências de DNA repetitivas compostas predominantemente por adenina e timina (A-T), enquanto o CMA (cromomicina A3) liga-se preferencialmente a regiões ricas em citosina e guanina (C-G). Utiliza-se, também, compostos não fluorescentes com afinidade para regiões ricas em A-T (distamicina A) e ricas em G-C (actinomicina D), como forma de melhoramento de contraste para observação das bandas CMA e DAPI, respectivamente (MOSCONE *et al.* 1996).

No estudo citológico feito por D'EMERICO *et al.* (1996a, 1996b) em *Orchis* (Orchidaceae), o uso das técnicas convencionais, de bandamento C e por Hoechst 33258, confirmou, não só a origem híbrida da espécie *Orchis x gennarii*, como indicaram também que o gênero *Orchis* poderia ser subdividido em dois grupos distintos, baseados não somente na ocorrência de dois diferentes números diplóides dentro do gênero ($2n=32$ e $2n=36$), como também em diferenças na simetria dos cariótipos e padrões de bandamentos C e por Hoechst 33258.

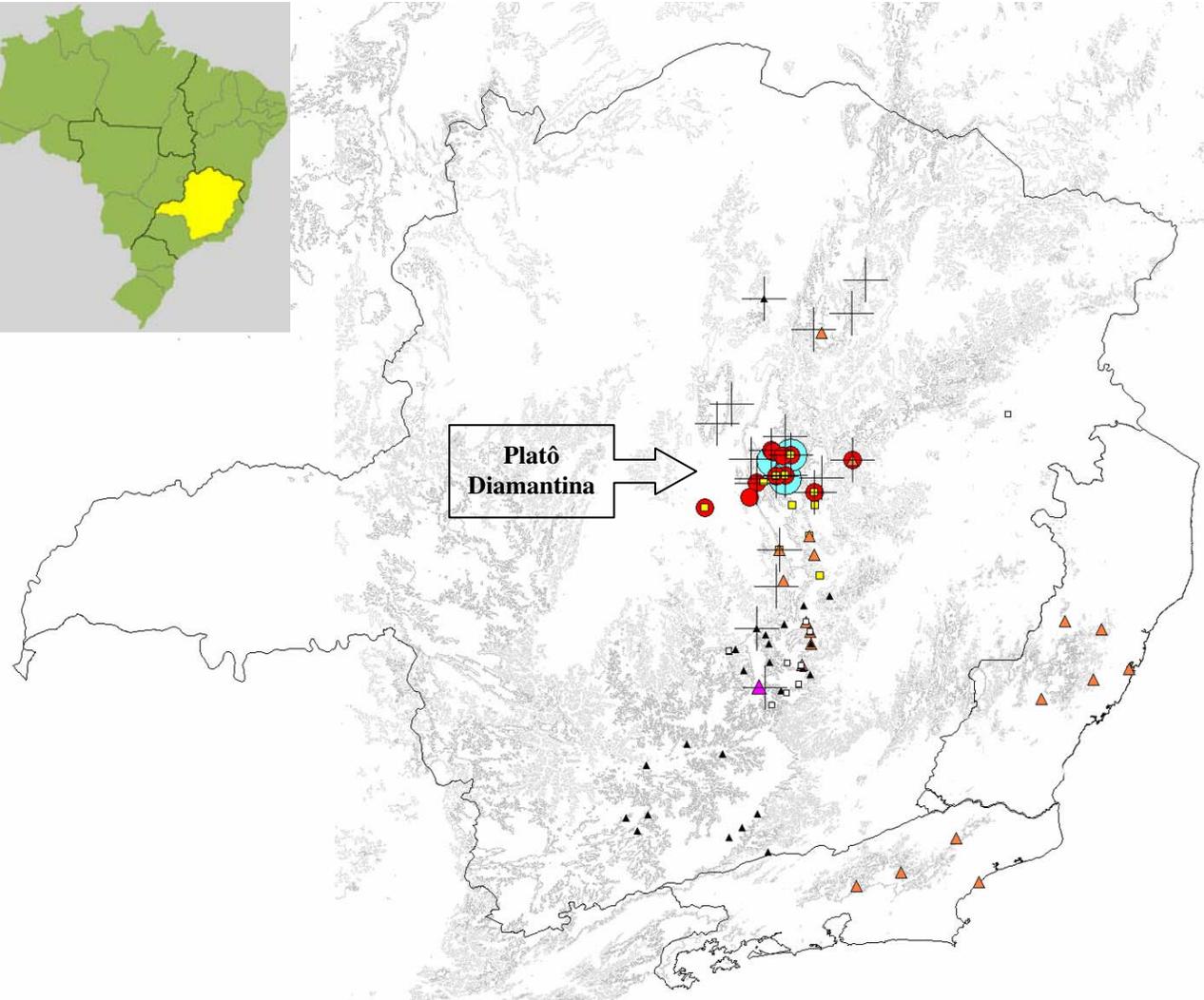
A hibridação *in situ* é um método preciso para localizar seqüências de ácidos nucléicos (tanto DNA quanto RNA) no citoplasma, em organelas, cromossomos ou núcleo de material biológico (LEITCH *et al.* 1994). Foi descrito por GALL & PARDUE (1970) e baseava-se na utilização de sondas marcadas com isótopos radioativos. Este tipo de marcação foi posteriormente substituído por aqueles que usavam sondas marcadas com compostos que se ligam a corantes fluorescentes. Atualmente, dentre as seqüências que são utilizadas nos estudos de hibridação *in situ*, destacam-se aquelas para DNA ribossomal. Os genes de RNA ribossômico (RNAr), presentes como 18S-25S DNAr, compreendendo os genes 18S-5,8S-25S de RNAr e espaçadores intergênicos, e 5S DNAr com o gene 5S RNAr e espaçador, são encontrados universalmente em vegetais, com múltiplas cópias das seqüências codificadoras e espaçadores intergênicos normalmente sendo localizados como poucos e discretos sítios cromossômicos (OSUJI *et al.* 1998). As seqüências 18, 5,8 e 25S de

RNAr resultam da quebra de um único transcrito 45S descodificado por unidades repetidas de DNAr agrupadas em um sítio cromossômico particular, a região organizadora do nucléolo (NEVES *et al.* 2005). A hibridação *in situ* para a região 45S de DNAr tem sido utilizada em diversos grupos de plantas. Em um estudo realizado em *Vicia amoena* (Fabaceae), LI *et al.* (2001), através da análise por hibridação *in situ* dos sítios 45S e 5S de DNAr na tetraplóide *V. amoena* var. *amoena* e seus possíveis parentais diplóides (*V. amoena* var. *sericea*, *V. pseudorubus*, *V. dumetorum*, *V. pisiformis* e *V. cracca*), puderam concluir que a variedade não representava um autotetraplóide derivado de *V. amoena* var. *sericea*, mas sim um alotetraplóide. Através da hibridação *in situ* para 45S DNAr e 5S DNAr, TAGASHIRA & KONDO (2001) puderam observar que a evolução cromossômica em *Zamia* e *Ceratozamia mexicana*, com números cromossômicos $2n=16$, provavelmente se deu por inversão pericêntrica e translocação desigual.

Através da utilização conjunta dos bandamentos C e com fluorocromos, da impregnação por prata e hibridação *in situ* para a sonda de 45S DNAr, os autores RAN *et al.* (1999) puderam identificar e diferenciar os cariótipos de quatro espécies de *Clivia* (Amaryllidaceae), os quais se apresentam extremamente similares através das técnicas de coloração convencional, com $2n=22$ cromossomos, sendo quatro pares metacêntricos e sete pares submetacêntricos.

No presente trabalho, são apresentados os números cromossômicos e comportamento meiótico de sete espécies de *Hoffmannseggella* (*H. angereri*, *H. briegeri*, *H. cinnabarina*, *H. crispata*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*), no Capítulo 1, assim como a caracterização cariotípica das espécies *H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegeri*, *H. caulescens*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*, através das técnicas de bandamento C, CMA/DA/DAPI, DAPI/AMD e hibridação *in situ* para a região 45S de DNAr, no Capítulo 3. Além disso, no Capítulo 2 é apresentado o cariótipo da espécie *H. bradei* em comparação com o cariótipo de uma nova espécie descrita em 2005, denominada *H. viridiflora*, já que ambas são sugeridas como espécies bastante próximas entre si e ocorrem em sincronopatria. A distribuição das espécies estudadas pode ser

visualizada na Figura 1. Além de complementar os dados observados por BLUMENSCHNEIN (1957), o presente trabalho teve como objetivo a observação das características cromossômicas das espécies citadas acima não só objetivando caracterizar e diferenciar as espécies entre si, como também analisar a importância da poliploidia e de possíveis alterações estruturais nos cromossomos para a evolução do grupo, além de averiguar indícios não só de uma suposta origem híbrida como também de processos de hibridação recentes entre espécies.



Legenda

-  *H. angereri* (2n=40)
-  *H. bradei* (2n=40)
-  *H. rupestris* (2n=40/80)
-  *H. briegeri* (2n=80)
-  *H. cinnabarina* (2n=40)
-  *H. crispata* (2n=40)
-  *H. fournieri* (2n=40)
-  *H. liliputana* (2n=40)

Figura 1: Mapa de distribuição das espécies de *Hoffmannseggella* H.G.Jones estudadas. (Mapa elaborado e gentilmente cedido por C.F.Verola, programa DIVA).

4. CAPÍTULO 1

NÚMEROS CROMOSSÔMICOS E COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE SETE ESPÉCIES DE

HOFFMANNSEGGELLA H.G. JONES (LAELIINAE, ORCHIDACEAE)

4.1) RESUMO:

Dentro da família Orchidaceae, composta por cerca de 25.000 espécies, o gênero *Laelia* Lindl., antigamente composto pelas seções *Laelia*, *Podolaelia*, *Calolaelia* (México e América Central), *Cattleyoides*, *Hadrolaelia*, *Microlaelia* e *Parviflorae* (Brasil), foi recentemente desmembrado, sendo mantido o gênero *Laelia* apenas para as espécies mexicanas. As espécies brasileiras foram reclassificadas nos gêneros *Dungisia*, *Hadrolaelia*, *Microlaelia* e *Hoffmannseggella*. Este último gênero (antiga seção *Parviflorae*) é composto por espécies rupícolas, endêmicas da Cadeia do Espinhaço/MG. Estudos sugerem uma evolução rápida para o gênero, com a transição do hábito epifítico para o rupícola, mudança de polinizadores e eventos de hibridização e poliploidia como os principais mecanismos evolutivos envolvidos na origem das espécies de *Hoffmannseggella*. Estudos cromossômicos prévios haviam sugerido o número básico de $x=20$ para o gênero, com alta incidência de poliplóides. No presente trabalho, foram obtidas contagens cromossômicas para sete espécies: *H. angereri* $n=20/2n=40$, *H. briegei* $2n=80$, *H. cinnabarina* $2n=40$, *H. crispata* $n=20$, *H. fournieri* $n=20/2n=40$, *H. liliputana* $2n=40$ e *H. rupestris* $n=40/2n=80$ e $2n=40$), sendo quatro inéditas (*H. angereri*, *H. cinnabarina*, *H. fournieri*, *H. liliputana*). Em *H. rupestris* e *H. briegei*, ambas de origem poliplóide ($2n=80$), foi observada a ocorrência de aneussomatia nos tecidos radiculares. *Hoffmannseggella rupestris* apresentou também citótipos, com as duas populações de Diamantina e uma população de Francisco Sá/MG apresentando $2n=80$ cromossomos e as populações de Botumirim e Grão Mogol/MG apresentando $2n=40$ cromossomos. Anormalidades meióticas foram observadas em várias espécies, com presença de monovalentes, disjunção adiantada de bivalentes e possíveis tetravalentes nas espécies poliplóides. Entretanto, as espécies apresentaram alta normalidade de tétrades, variando de 86,4% em *H. rupestris* a 99,3% em *H. fournieri*.

4.2) INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas conhecidas, possuindo cerca de 25.000 espécies, representando cerca de 7% das fanerógamas existentes (PIJL & DODSON 1966). Na tribo Epidendreae, conforme apresentada por PABST & DUNGS (1975), a subtribo Laeliinae Bentham possuía 1466 espécies, agrupadas em 43 gêneros, com espécies caracterizadas por plantas epifíticas ou terrestres, com caule delgado ou em pseudobulbos, folhas dísticas ou terminais, conduplicadas e usualmente articuladas, e inflorescência, em sua maioria, terminal. As flores podem ser grandes ou pequenas e muitas apresentam nectário em forma de cunículo (DRESSLER 1981). Nesta subtribo, PABST & DUNGS (1975), seguindo o sistema de SCHLECHTER (1917), posicionaram o gênero *Laelia* Lindl., dividindo o mesmo em sete seções, sendo *Laelia*, *Podolaelia* e *Calolaelia* ocorrentes no México e América Central, enquanto que *Cattleyoides*, *Hadrolaelia*, *Microlaelia* e *Parviflorae* eram exclusivamente brasileiras (BARROS 1990). A seção *Parviflorae* era caracterizada por espécies, em sua maioria, rupícolas (VAN DEN BERG *et al.* 2000).

Análises moleculares recentes, utilizando as seqüências de DNA *ITS 1* e *ITS 2*, sugeriram que o gênero *Laelia* seria polifilético, e as espécies brasileiras de *Laelia*, e principalmente da seção *Parviflorae*, deveriam ser incluídas e sinonimizadas sob o gênero *Sophronitis* Lindl. (VAN DEN BERG *et al.* 2000; VAN DEN BERG & CHASE 2000). Entretanto, no seqüenciamento das seqüências *ITS 1* e *ITS 2* foram obtidas poucas diferenças entre as espécies de *Laelia* da seção *Parviflorae* estudadas, de forma que os cladogramas obtidos possuem uma sustentação baixa, além de haverem várias politomias (VAN DEN BERG *et al.* 2000).

CHIRON & CASTRO NETO (2002) sugeriram, com base nas características morfológicas e ambientais, aliadas aos dados moleculares obtidos por VAN DEN BERG *et al.* (2000), que o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones deveria ser reconsiderado para acomodar as espécies rupícolas, conforme anteriormente proposto por H.G.JONES (1968). Ainda segundo este autor, o gênero *Laelia* seria mantido apenas para as espécies epifíticas mexicanas, das seções *Laelia*, *Podolaelia* e

Calolaelia. Desta forma, as espécies que estavam previamente circunscritas na seção *Parviflorae*, com exceção das espécies *Laelia harpophylla*, *L. brevicaulis* e *L. kautskyi* (que juntas atualmente formam o gênero *Dungsia* Chiron & V.P.Castro), foram transferidas para o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones. Entretanto, a situação taxonômica do gênero *Hoffmannseggella*, com aproximadamente 32 espécies, ainda está em discussão, e a delimitação das espécies dentro do gênero é complexa, devido à alta variabilidade intra-específica e ao aparecimento de indivíduos com características intermediárias entre espécies previamente aceitas (BARROS 1990).

Os campos rupestres, ambiente em que ocorrem a maioria das espécies do gênero *Hoffmannseggella*, geralmente possuem topografia acidentada, clima e solo secos. Estão amplamente associados à Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia, com partes disjuntas da mesma cadeia entre os limites de latitude de 21°10' e 10°S. A Cadeia do Espinhaço é formada de uma área de aproximadamente 1000 km de extensão e entre 50 e 100 km de largura, e está a mais de 800 m acima do nível do mar. Seu limite ao sul é a Serra do Ouro Branco, ao sul da cidade de Ouro Preto, em Minas Gerais, e ela se estende ao norte até o estado da Bahia (GIULIETTI & PIRANI 1988).

Os campos rupestres não formam um único tipo de vegetação, mas sim um mosaico de comunidades relacionadas, condicionadas pela topografia local, pelo ângulo de declividade, pelas influências microclimáticas e pela natureza do substrato. As mesmas famílias de plantas ocorrem por todo o campo rupestre, mostrando hábito convergente. Entretanto, há uma extraordinária variedade de gêneros e, principalmente, espécies, sendo que muitas são endêmicas (GIULIETTI & PIRANI 1988). JOLY (1970) considerou que os campos rupestres possuem o maior grau de endemismo quando comparados a outros tipos vegetacionais brasileiros.

Segundo GIULIETTI & PIRANI (1988), as regiões montanhosas onde ocorrem os campos rupestres são descontínuas; as espécies são representadas por populações disjuntas, tornando difícil a interpretação do conceito de espécies. Com a formação de barreiras geográficas, surgem obstáculos

para que ocorra fluxo gênico entre tais populações. As condições ecológicas destes ambientes possivelmente propiciem uma especiação intensa, podendo ser um dos fatores dos endemismos e isolamentos encontrados em gêneros e espécies que ocupam este hábitat (GIULIETTI & PIRANI 1988).

Estudos sugerem que o gênero *Hoffmannseggella* teria surgido através de uma “explosão” evolutiva, com a penetração das espécies em uma nova área ecológica (os campos rupestres) e transição do hábito epifítico para o hábito rupícola. Paralelamente, teria ocorrido mudança de polinizadores, indicada pela diminuição no tamanho das flores e mudança no padrão de cores (BLUMENSCHNEIN 1960a; BRIEGER 1960, 1961, 1966), sugerindo inclusive que espécies deste gênero seriam ornitófilas, em contraste às outras seções de *Laelia* que seriam melitófilas (DRESSLER 1981). Além desses fatores, a ampla troca de genes proporcionada eventos de hibridização e poliploidia sugerem que estes foram importantes no processo de evolução do grupo (BARROS 1990).

A origem por poliploidia e hibridação foi originalmente sugerida por BLUMENSCHNEIN (1960a), através de estudos cromossômicos, para espécies de *Hoffmannseggella* (antigamente incluídas na seção *Parviflorae* de *Laelia*): *H. mixta* (Hoehne) V.P.Castro & Chiron, *H. milleri* (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron, *H. crispata* (Thumb.) H.G.Jones e *H. caulescens* (Lindley) H.G.Jones. BLUMENSCHNEIN (1960b) chamou atenção ainda para a grande quantidade de poliplóides dentro do subgênero *Cyrtolaelia* de *Laelia* (atual gênero *Hoffmannseggella*). De acordo com PABST & DUNGS (1975) existem oito híbridos naturais documentados dentro da antiga seção *Parviflorae* de *Laelia*, incluindo inúmeros híbridos entre os gêneros *Laelia* e *Cattleya* Lindl. Pelo fato de ainda estarem ocorrendo eventos de hibridização entre as espécies de *Hoffmannseggella*, BARROS (1990) sugeriu que a “explosão” evolutiva do gênero ainda está em andamento. ANDERSON (1948) observou também que distúrbios no hábitat poderiam levar a um aumento na frequência de híbridos através da quebra de barreiras reprodutivas pré-zigóticas, como a especificidade de polinizadores, considerada como a principal barreira reprodutiva inter-específica dentro da família Orchidaceae (DRESSLER 1981).

Em um estudo de cruzamentos artificiais inter-específicos entre os gêneros *Laelia*, *Cattleya*, *Brassavola*, *Epidendrum*, *Schomburgkia* e *Sophronitis*, STORT (1984) obteve diversos híbridos com altas porcentagens de tétrades normais e ainda cruzamentos bem sucedidos entre os híbridos F₁.

Estudos citogenéticos na subtribo Laeliinae são extremamente escassos, sendo documentados os números cromossômicos de $2n=40$, $2n=60$ e $2n=80$, distribuídos entre 12 espécies de *Hoffmannseggella*, uma de *Dungsia*, duas de *Hadrolaelia* e uma de *Laelia* (Tabela 1), cultivadas em casa de vegetação. BLUMENSCHHEIN (1960b) ainda sugeriu o número básico de $x=20$ para o antigo gênero *Laelia*. Nesse outro estudo foram também observadas por BLUMENSCHHEIN (1957) anormalidades meióticas em algumas espécies, como *Hoffmannseggella crispata*, *H. mixta* e *H. cinnabarina*.

No presente trabalho, são analisados os números cromossômicos e comportamento meiótico de sete espécies de *Hoffmannseggella* (*H. angereri*, *H. briegei*, *H. cinnabarina*, *H. crispata*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*), distribuídas na Cadeia do Espinhaço com o objetivo de caracterizar e diferenciar as espécies entre si, analisar a importância da poliploidia para a evolução do grupo e averiguar a existência de indícios que possam respaldar a suposta origem híbrida de algumas espécies, bem como processos de hibridização interespecífica recentes. Concomitantemente, verificou-se também se algumas das características observadas por BLUMENSCHHEIN (1957) em espécies mantidas sob condições de casa de vegetação, se mantinham nas mesmas espécies coletadas diretamente do ambiente natural, os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço.

Tabela 1: Espécies de *Laelia* (L.) documentadas por Blumenschein (1960b) quanto ao número cromossômico (2n), com as respectivas denominações atuais, nos gêneros *Hoffmannseggella* (H.), *Dungsia* e *Hadrolaelia*.

DENOMINAÇÃO ANTIGA		DENOMINAÇÃO ATUAL	2n
SEÇÃO	ESPÉCIE	ESPÉCIE	
<i>Parviflorae</i>	<i>L. briegei</i> Blumensch.	<i>H. briegei</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	80
	<i>L. caulescens</i> Lindl.	<i>H. caulescens</i> (Lindley) H.G.Jones	80
	<i>L. cinnabarina</i> Batem	<i>H. cinnabarina</i> (Batem. ex Lindley) H.G.Jones	40
	<i>L. crispilabia</i> A. Rich.	<i>H. caulescens</i> (Lindley) H.G.Jones	80
	<i>L. esalqueana</i> Blumensch.	<i>H. esalqueana</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. flava</i> Lindl.	<i>H. crispata</i> (Thunb.) H.G.Jones	40
	<i>L. longipes</i> Rchb. f.	<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V.P.Castro & Chiron	40, 60, 80
	<i>L. milleri</i> Blumensch.	<i>H. milleri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. mixta</i> Hoehne	<i>H. mixta</i> (Hoehne) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. ostermayerii</i> Hoehne	<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V.P.Castro & Chiron	40
	<i>L. rupestris</i> Lindl.	<i>H. rupestris</i> (Lindley) V.P.Castro & Chiron	80
	<i>L. tereticaulis</i> Hoehne	<i>H. tereticaulis</i> (Hoehne) H.G.Jones	80
	<i>L. harpophylla</i> Rchb. f.	<i>Dungsia harpophylla</i> (Rchb. f.) Chiron & V.P.Castro	40
<i>Cattleyodes</i>	<i>L. purpurata</i> Lindl.	<i>Hadrolaelia. purpurata</i> (Lindley & Paxton) Chiron & V.P.Castro	40
<i>Hadrolaelia</i>	<i>L. pumila</i> Rchb. f.	<i>Hadrolaelia. pumila</i> (Hooker) Chiron & V.P.Castro	40
<i>Podolaelia</i>	<i>L. anceps</i> Lindl.	<i>Laelia anceps</i> Lindl.	40

4.3) MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1) Espécies coletadas

Foram coletados meristemas radiculares e/ou botões florais e ovários imaturos das espécies do gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones listadas na Tabela 2, em populações com grande número de indivíduos. Foram coletados materiais testemunho das espécies e populações encontradas em estágio reprodutivo e depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), com números de coletores citados na Tabela 2. A identificação botânica foi feita por Christiano Franco Verola (doutorando do Curso de Pós Graduação em Ecologia/UNICAMP).

A coleta de raízes para tratamento só foi possível no período em que as plantas encontravam-se em seu estado vegetativo. No período de floração poucas raízes novas foram encontradas. Neste período foram coletados apenas botões florais e ovários imaturos.

Além das espécies cujo material foi coletado diretamente no campo, foram coletados meristemas radiculares ou botões florais de exemplares cultivados na casa de vegetação do Departamento de Genética/IB/UNICAMP (Tabela 2). Dentre estes, citam-se três, previamente identificados como *Laelia crispata* 2, *Laelia* rosa 02 e *Laelia* sp., que após acompanhamento de floração por dois anos consecutivos, foram identificadas por Christiano Franco Verola como sendo populações de *H. rupestris* e foram tratadas como Pop 1, Pop 2 e Pop 3, respectivamente.

4.3.2) Pré-tratamento, fixação e armazenamento

Os meristemas radiculares foram coletados entre 6h e 9h da manhã., enquanto os botões florais e ovários imaturos foram coletados tanto no período da manhã quanto da tarde. Os meristemas radiculares e ovários imaturos foram pré-tratados em 8-Hq 0,002M por 24h a 4°C. As raízes, os ovários imaturos e os botões florais foram fixados em solução Carnoy contendo etanol, ácido acético glacial e clorofórmio (6:3:1), por no mínimo 24h, à temperatura ambiente, e armazenados em freezer.

4.3.3) Análise mitótica

Para a análise mitótica, as raízes e ovários imaturos pré-tratados foram lavados em água destilada e digeridos em HCl 5N por 20 minutos. Após outra lavagem, o ápice meristemático, ou o ovário imaturo, foi fragmentado sobre a lâmina em uma gota de ácido acético 45%. O material foi esmagado e a lamínula retirada em Nitrogênio líquido. Depois de secas, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa 2% (GUERRA, 1983) por aproximadamente 10 minutos. Depois de lavadas e secas, as lâminas foram montadas com meio rápido de montagem (Entellan ou Allklan). Foram observadas cerca de 20 células de cada espécie para determinação do número cromossômico, provenientes de diferentes clones, com exceção das espécies *H. liliputana* e *H. crispata*, e das Pop1, 2 e 3 de *H. rupestris* que apresentaram pouco material disponível. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e as melhores células foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX51, utilizando filme PB ISO 25 (Imagelink – Kodak) ou ISO 50 (PanF – Ilford).

4.3.4) Análise meiótica e normalidade de tétrades

Para a análise meiótica, polínias foram retiradas dos botões florais fixados e esmagadas em carmim acético 1,2%, sendo as lamínulas seladas com esmalte incolor. As células foram fotografadas em Fotomicroscópio Olympus BX51, em filme PB ISO 25 (Imagelink – Kodak) ou ISO 50 (PanF – Ilford).

Para a análise de normalidade de tétrades, polínias em fases mais adiantadas foram esmagadas também em carmim acético 1,2%. Cinco diferentes polínias (uma por lâmina), pertencentes a diferentes clones, foram analisadas de cada espécie/população e em cada lâmina foram observados 20 campos distribuídos por toda a lâmina, escolhidos de forma aleatória, em objetiva de 40X, para a análise de cerca de 1000 tétrades por população. O desvio-padrão (DP) foi

calculado com base na porcentagem de tétrades normais e anormais observadas, dentre as cinco polínias analisadas e entre as diferentes populações.

4.4) RESULTADOS

Foram obtidas contagens cromossômicas de sete espécies de *Hoffmannseggella* (Tabela 2).

Espécie	número	população	n	2n	REFERÊNCIA
<i>H. angereri</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron*	CL27	Diamantina/MG Cachoeira dos Cristais	20	40	inédita
	CL28	Milho Verde/MG Córrego do Inferno		40	inédita
<i>H. briereri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron *	C.F.V. 0056	Serro/MG Distrito de Pedro Lessa		64-84	2n=80, Blumenschein 1960b
<i>H. cinnabarina</i> (Batem. ex Lindley) H.G.Jones *	C.F.V. 0069	Catas Altas/MG Serra do Caraça		40	inédita
<i>H. crispata</i> (Thunb.) H.G.Jones	C.F.V. 0110	São Thomé das Letras/MG Serra de São Thomé	20		2n=40, Blumenschein 1960b
<i>H.ournieri</i> (Cogniaux) V.P.Castro & Chiron	J.Y.C. 03/052	Ouro Preto/MG Serra do Itatiaia	20	40	inédita
<i>H. liliputana</i> (Pabst) H.G.Jones	J.Y.C. 03/059	Ouro Branco/MG Serra do Ouro Branco		40	inédita
<i>H. rupestris</i> (Lindley) V.P.Castro & Chiron	J.Y.C. 03/020	Diamantina/MG Biribiri	ca.40	52-75	2n=80, Blumenschein 1960b
	J.Y.C. 03/032	Diamantina/MG Afloramento de Soberbo	ca.40	54-76	
	J.Y.C. 03/043	Diamantina/MG Caminho dos Escravos		80	
	pop1*	Francisco Sá/MG		ca.70	
	pop2*	Botumirim/MG		40	
pop3*	Grão Mogol/MG		40		

Tabela 2: Espécies de *Hoffmannseggella* analisadas quanto ao número cromossômico, com número do coletor, localização das populações, número de bivalentes durante a meiose (n), número cromossômico mitótico (2n) e comparação com dados obtidos anteriormente na literatura (Referência). * - Espécies que tiveram seu material coletado a partir de exemplares mantidos em casa de vegetação.

4.4.1) *Hoffmannseggella angereri*

Esta espécie (Fig. 1A) apresentou 2n=40 cromossomos (Figs. 1B e 1C) em metáfase mitótica em ambas as populações amostradas (Tabela 2).

Na meiose, a espécie apresentou predominantemente $n=20\text{II}$ (Fig. 1D), mas foram observadas algumas anormalidades meióticas, como células apresentando $n=19\text{II}$ (Fig. 1E), $n=19\text{II} + 2\text{I}$ (Fig. 1F), $n=19\text{II} + 3\text{I}$ (Fig. 1G), $n=20\text{II} + 1\text{I}$ (Fig. 1H), $n=20\text{II} + 2\text{I}$ (Fig. 1I) e $n=21\text{II}$ (Fig. 1J). As duas populações apresentaram alta normalidade de tétrades, sendo 99,1% para a população CL28 e 95,5% para CL27, mas foram observadas políades com até 2 micrócitos (Fig 1K).

O material utilizado para a análise desta espécie, de ambas as populações, foi obtido na casa de vegetação do Departamento de Genética/IB/UNICAMP. Esta espécie ocorre também na região de Diamantina, porém em locais de difícil acesso, não sendo possível a coleta de material para análise cromossômica diretamente no campo. Junto à população localizada próximo à Cachoeira dos Cristais foi também encontrada uma população de *H. rupestris*. Em casa de vegetação, estas espécies apresentam períodos de floração sobrepostos.

4.4.2) *Hoffmannseggella briegei*

Esta espécie foi encontrada, no campo, apenas em estado vegetativo, ou com flores abertas (Fig. 2A), não sendo possível coletar botões florais. Também não foram obtidos bons resultados com as raízes coletadas diretamente no campo. Dessa forma, foram utilizados indivíduos mantidos em casa de vegetação, provenientes de Serro/MG.

Foi observada variação no número de cromossomos obtidos em metáfase mitótica, de $2n=64$ até $2n=84$, sendo o número mais freqüente $2n=78$ (26,32%). A variação de números foi observada ocorrendo dentro de um mesmo meristema radicular, e se repetiu em diferentes clones. São apresentadas fotos com $2n=73$ (Fig. 2B) e $2n=75$ (Fig. 2C) cromossomos.

4.4.3) *Hoffmannseggella cinnabarina*

O material para a análise mitótica desta espécie (Fig. 2D) foi obtido a partir de indivíduos cultivados em casa de vegetação. A população analisada é proveniente de Catas Altas – MG, da

Serra do Caraça, e apresentou $2n=40$ cromossomos (Fig. 2E).

4.4.4) *Hoffmannseggella crispata*

Desta espécie (Fig. 2I) foi possível dispor apenas de botões florais, pois o material foi coletado no município de São Thomé das Letras – MG por outro coletor (C.F.Verola). Não foi possível analisar as várias fases da meiose, encontrando-se apenas tétrades de micrósporos, que se apresentaram normais (Fig. 2H). No entanto, através da observação da primeira divisão mitótica do grão de pólen foi possível de se estabelecer $n=20$ cromossomos (Figs. 2F e 2G).

4.4.5) *Hoffmannseggella fournieri*

Nesta espécie (Fig. 3A) foi obtida a contagem de $n=19II + 2I$ (Fig. 3B) e $2n=40$ cromossomos (Fig. 3C). A análise meiótica foi feita em células em diacinese. Nesta fase, alguns cromossomos encontram-se não pareados em bivalentes (Fig. 3B, setas). Entretanto a espécie apresentou alta normalidade de tétrades, com 99,3% de normalidade.

4.4.6) *Hoffmannseggella liliputana*

Nesta espécie (Fig. 3D) foram encontrados $2n=40$ cromossomos (Fig. 3E). Contrariamente ao esperado, conseguiu-se pouco material desta espécie, pois foram coletados fora da época reprodutiva. A coleta de meristemas radiculares também mostrou-se bastante difícil, pois os indivíduos ocorrem incrustados em fendas de rochas (Fig. 3D).

4.4.7) *Hoffmannseggella rupestris*

Através da análise mitótica de *H. rupestris* (Fig. 4A a 4I), realizada a partir de meristemas radiculares, foram obtidos números cromossômicos aproximados de duas populações de Diamantina, uma próxima a Biribiri (n° de coleta: 03/020 e 03/036) (Fig. 5A a 5D) e no morro do

Soberbo (n^{os} de coleta 03/0032, 03/033 e 03/041) (Fig. 6A a 6D). Ambas apresentaram 2n=ca.70 cromossomos. Foram encontradas células variando de 52 a 76 cromossomos, sendo mais freqüentes os números 66 (10%), 67 (7,5%), 68 (7,5%), 69 (12,5%) e 74 (10%), em um total de 40 células analisadas. Assim como observado em *H. briegei*, a variação nos números cromossômicos foi observada dentro de um mesmo meristema radicular, e repetiu-se em diferentes clones amostrados. Ambas as populações apresentaram esta variação, oscilando de 52 a 75 cromossomos na população de Biribiri e de 54 a 76 cromossomos na de Soberbo. Os cromossomos apresentaram um padrão de condensação proximal, partindo provavelmente da região centromérica, o que pode ser observado principalmente nas pró-metáfases (Figs. 5B e 6A). Apesar da variação encontrada em meristemas radiculares, o tecido de ovário observado na população 03/043 (Diamantina, Caminho dos Escravos) apresentou 2n=80 cromossomos (Cap. 3).

Através da análise meiótica foram obtidos números cromossômicos de três populações de Diamantina: afloramentos de Biribiri (Figs. 5E a 5J), Soberbo (Fig. 6E) e Caminho dos Escravos (n^o de coleta 03/043) (Figs. 6J e 6K). Foram observados n=ca.40 cromossomos nas três populações, sendo freqüente a observação, na população de Biribiri, de conformações em diacinese e metáfase I que indicam a possibilidade de existirem pelo menos dois tetravalentes (Figs. 5E, 5G, 5H e 5I). Foram também observadas anáfases com cromossomos retardatários (Figs. 5K e 5L; Figs. 6F e 6G).

A análise de tétrades, nas três populações mencionadas acima, mostrou altas porcentagens de normalidade, variando de 86,4 a 89,2% (Tabela 3). Foi observada alta variação na normalidade de tétrades entre flores de uma mesma população, demonstrada pelo desvio-padrão de 11,4 a 6,6 (Tabela 3). Entretanto não foi observada grande variação na normalidade de tétrades entre as populações, com desvio-padrão de 1,53 (Tabela 3).

Espécie	População	TN	%	TA	%	Total
<i>H. rupestris</i>	Biribiri	991	86,4 ± 11,4	120	13,6 ± 11,4	1111
	Soberbo	734	89,2 ± 6,6	94	10,8 ± 6,6	828
	Caminho dos Escravos	995	88,8 ± 7,7	108	11,2 ± 7,7	1103
DP=1,531						

Tabela 3– Normalidade de tétrades de *Hoffmannseggella rupestris* em diferentes populações de Diamantina, indicando número (TN) e porcentagem média (%) de tétrades normais, número (TA) e porcentagem média (%) de tétrades anormais, total de tétrades analisadas e desvio-padrão (DP) calculado entre as populações.

As tétrades anormais geralmente apresentaram um ou dois micrócitos (Figs. 5M e 5N, Figs. 6H e 6L), sempre adicionais aos quatro micrósporos presentes na tétrade normal (Fig. 6I).

A espécie *H. rupestris* foi a espécie encontrada com distribuição mais ampla por toda a região de Diamantina e também a que apresentou maiores populações. Em abril foram encontrados alguns indivíduos com frutos e, em julho, indivíduos com flores, em todas as populações visitadas. Também foram observados alguns indivíduos ainda com frutos, principalmente em uma região do município de Diamantina próxima a Biribiri, em um afloramento ao lado da Cachoeira dos Cristais.

Foi observada, em todas as populações, grande variação morfológica (Fig. 4) tanto no que se refere à parte vegetativa, com pseudobulbos e folhas variando em comprimento (Fig. 4D) e coloração (pseudobulbos desde amarelados até avermelhados), quanto na reprodutiva, isto é, as flores. Estas espécies apresentaram grande variação no padrão de coloração, variando desde um magenta homogêneo distribuído ao longo das tépalas (Fig. 4F) até rosa claro (Fig. 4H e 4I), além da combinação das duas características anteriores com manchas brancas na região central das tépalas (Fig. 4A, 4E e 4G). A intensidade e a tonalidade da coloração amarela no interior do labelo também variou desde amarelo claro até amarelo ouro. Outra característica variável que pode ser

observada também na Fig. 4D, é o comprimento do escapo floral, variando desde o mesmo comprimento da folha até bem mais longo. Por este motivo, em alguns casos foram dados números de coleta diferentes dentro da mesma área e época de coleta.

Dentre as populações que tiveram material amostrado a partir de indivíduos cultivados em casa de vegetação, a Pop1, proveniente de coleta realizada próxima à Usina, em Francisco Sá / MG, apresentou $2n \approx 70$ cromossomos, tendo sido observados os números $2n=72$ (Fig. 7A), $2n=73$ (Fig. 7B) e $2n=69$ (Fig. 7C). Como as raízes foram obtidas a partir de um único indivíduo, conseguiu-se poucas células. Este material está identificado na coleção mantida pelo Departamento de Genética/IB/UNICAMP como *Laelia crispata* 2.

A Pop2, proveniente de Botumirim/MG, foi a primeira a ser testada a partir de indivíduos mantidos em casa de vegetação. Esta espécie apresentou $2n=40$ cromossomos (Figs. 7D a 7F) e, assim como as outras espécies estudadas, apresentou padrão de condensação proximal dos cromossomos, partindo, provavelmente, da região centromérica em direção às extremidades. Esta espécie está identificada na casa de vegetação como *Laelia rosa* 02.

A Pop3, identificada em casa de vegetação como *Laelia* – Grão Mogol, apresentou o número de $2n=40$ cromossomos em pró-metáfases mitóticas (Figs. 7G a 7J), obtidas a partir das polínias. É interessante notar que as células mitóticas obtidas não foram submetidas a pré-tratamento, entretanto apresentaram bom espalhamento. Em algumas células meióticas em anáfase I, foram observadas anormalidades (Fig. 7K), como fragmentos ou cromossomos provavelmente perdidos, que não seriam incorporados aos micrósporos.

4.5) DISCUSSÃO

Os dados obtidos até o momento confirmam o número básico de $x = 20$ para o gênero *Hoffmannseggella*, estudado anteriormente por BLUMENSCHNEIN (1960b) sob a denominação *Laelia* seção *Parviflorae*. A maior parte dos números cromossômicos obtidos é inédita para as espécies (*H. angereri*, *H. fournieri* e *H. liliputana*). Os dados obtidos apóiam os relatos de BLUMENSCHNEIN (1960a e 1960b) para *H. crispata* ($n=20$ e $2n=40$) e populações poliplóides de *H. rupestris* ($n=40$ e $2n=80$). Provavelmente a espécie *H. briegei* também possui $2n=80$, conforme citado por BLUMENSCHNEIN (1960a e b), número que está dentro da variação ($2n=64-84$) obtida no presente trabalho, para células de meristema radicular. Provavelmente, *H. briegei* apresente o mesmo padrão encontrado em *H. rupestris*, no qual há variação aneuplóide ($2n=52-76$) nas células de meristema radicular, mas $2n=80$ cromossomos em células provenientes de ovários imaturos.

A aneussomatia, encontrada nas células provenientes de meristema radicular em *H. rupestris* e *H. briegei*, poderia apenas refletir a dificuldade em trabalhar com este tipo de material, mas é notável que não tenha sido observada em outras espécies, assim como em tecido proveniente de ovários imaturos. Parece mais plausível supor que os meristemas radiculares estejam sujeitos à aneussomatia, e que os tecidos do ovário apresentem um número cromossômico constante ($2n=80$ no caso de *H. rupestris*), o que garantiria a estabilidade reprodutiva sexuada na espécie. A ocorrência de diferentes números cromossômicos em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento dos mesmos foi observada no híbrido *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae), por LIM & LOH (2003). Neste híbrido, células multiplóides foram observadas em folhas, raízes e coluna, mas não no ápice do escapo floral, caule, perianto e pedicelo. A variação de números cromossômicos entre indivíduos e até mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo indivíduo foi documentada também em *Ornithogalum divergens* Boreau (Liliaceae), por COUDERC *et al.* (1985). Nesse trabalho, o estudo de biologia reprodutiva demonstrou que esta variação intra-individual de números cromossômicos (em ovários, estames e raízes) dificultou a fecundação e a formação de frutos tanto

na autopolinização quanto na polinização cruzada, mas facilitou os cruzamentos interespecíficos. Os autores sugerem que a variabilidade intraindividual, no padrão cromossômico, facilita os cruzamentos entre espécies que sejam suficientemente próximas geneticamente, mesmo que normalmente distintas por fórmulas cariotípicas.

A existência de diferentes citótipos em *H. rupestris* é documentada no presente trabalho, com as populações dos municípios de Diamantina/MG e Francisco Sá/MG apresentando $2n=ca.80/70$ cromossomos e as populações de Botumirim/ MG e de Grão Mogol/MG apresentando $2n=40$ cromossomos. É possível que dentro de uma mesma população de *H. rupestris* existam indivíduos com outros citótipos diferentes, como $2n=40$ ($2x$), 60 ($3x$) e 80 ($4x$), da mesma forma que foi documentado para *H. longipes* por BLUMENSCHNEIN (1960b), em indivíduos cultivados em casa de vegetação. Caso existissem diferentes citótipos dentro de uma mesma população ou em populações muito próximas, seria possível que estes citótipos estivessem cruzando entre si, formando uma série poliplóide. Para obtenção do número $2n=ca.70$ cromossomos, deveria haver cruzamentos entre indivíduos com $2n=60$ e $2n=80$, com união de gametas $3x/2$ e $2x$. Em um trabalho de revisão, RAMSEY & SCHEMSKE (1998) observaram que triplóides freqüentemente produzem grande quantidade de pólen $3x/2$ e baixas freqüências de pólen haplóide (x) e diplóide ($2x$). Entretanto, observaram também que a fertilidade de pólen estava altamente correlacionada à quantidade de pólen euplóide (x e $2x$). Além disso, o levantamento de estudos de cruzamentos envolvendo triplóides, híbridos e não híbridos, demonstrou que cruzamentos realizados entre indivíduos $3x$ e $4x$ resultaram em indivíduos predominantemente $4x$.

Outra hipótese, que poderia explicar não só a aneuploidia, como também as anormalidades meióticas encontradas, seria a de que *H. rupestris* constitui um sistema híbrido, no qual duas espécies diplóides diferentes teriam gerado híbridos que, ou estariam retrocruzando com os parentais, ou estariam cruzando entre si. Observando os dados obtidos em meiose, pode-se sugerir que *H. rupestris* seja um aloploplóide segmental, no qual, dentre os dois conjuntos distintos de

genomas que originaram o aloploplóide, existem pelo menos dois pares de cromossomos homeólogos - cromossomos com um certo grau de homologia - que se associam formando os tetravalentes durante a metáfase I. Ainda na revisão realizada por RAMSEY & SCHEMSKE (1998), os autores observaram também que a frequência de poliplóides espontâneos é maior em sistemas híbridos que em não-híbridos, e novos poliplóides em sistemas não-híbridos são muito raros e tipicamente triplóides. Essa hipótese estaria de acordo com a sugestão de BLUMENSCHNEIN (1960a) de que várias espécies da seção teriam surgido por poliploidia ou hibridação.

De acordo com STACE (2000), o grau de homologia existente em um aloploplóide segmental geralmente resulta em um certo grau de fertilidade do híbrido, o qual pode ser inferido a partir das análises de normalidade de tétrades realizadas para *H. rupestris*. A ocorrência de tétrades anormais com formação de micrócitos indica que esta espécie provavelmente possui um certo grau de esterilidade. Tétrades que possuem micrócitos são resultantes de erros durante a divisão meiótica e é provável que os outros núcleos da tétrade tenham sofrido perda de material genético (FORNIMARTINS *et al.* 1992, STORT 1984). É possível também que tétrades que são aparentemente normais por este método de coloração tenham sofrido uma divisão desbalanceada, na qual os micrósporos tenham material genético a mais ou a menos, resultando em gradiente de esterilidade. As anormalidades observadas durante a divisão meiótica no presente trabalho, como cromossomos retardatários, tetravalentes e as tétrades com micrócitos, estão frequentemente associadas a híbridos ou espécies de origem híbrida (HOSHINO 1988, MURRAY *et al.* 1998, STORT 1984). O método utilizado (carmim acético 1,2%) permite apenas visualizar a presença dos micrósporos nas tétrades e, eventualmente, micronúcleos e micrócitos. Para a demonstração da viabilidade do produto final da microsporogênese, isto é, dos grãos de pólen, seriam necessários testes de germinação em agar sólido ou mesmo nas próprias plantas (STORT 1984) para obter maior precisão nos dados, ou então ter-se uma estimativa da viabilidade dos grãos através da coloração do citoplasma dos mesmos, o que não pôde ser efetuado por falta de material.

É interessante observar também que a porcentagem de tétrades normais, pela análise do desvio-padrão, variou muito dentro de cada população amostrada (Biribiri, Soberbo e Caminho dos Escravos) e pouco entre as populações de *H. rupestris*. Entretanto, não se pode garantir que cada uma das flores das quais foram retiradas as polínias representem indivíduos diferentes, não somente porque não houve este cuidado durante a coleta, como também porque espécimes próximos, aparentemente diferentes, podem ter sido originados por propagação vegetativa, representando clones de um único indivíduo.

Alta variação intrapopulacional foi encontrada também com relação às características morfológicas de *H. rupestris*. Apesar de não terem sido realizados testes morfométricos, é visível a grande variação que ocorre entre indivíduos. Chama a atenção especialmente a variação no comprimento do escapo floral, pois inflorescências tão longas quanto as folhas, pouco mais longas quanto as folhas ou bem mais longas que as folhas são características utilizadas por PABST & DUNGS (1975) para separar diferentes alianças dentro da seção *Parviflorae* de *Laelia*, onde se enquadrava *H. rupestris*.

Essa variação morfológica pode influenciar diretamente no trabalho do taxonomista, pois este freqüentemente utiliza material herborizado para os estudos, sem poder observar a amplitude de variação da espécie no campo. A própria espécie *H. rupestris* já foi sinonimizada, juntamente com *H. tereticaulis* Hoehne, sob *L. crispata* (Thunb.) Garay por PABST & DUNGS (1975). O nome *L. crispata* foi um erro relacionado ao tipo utilizado (VAN DEN BERG & CHASE 2000), mas tanto VAN DEN BERG & CHASE (2000) quanto MIRANDA (www.mirandaorchids.com) e BLUMENSCHNEIN (1960b) adotam *H. tereticaulis* como sendo uma espécie diferente. De acordo com MIRANDA (www.mirandaorchids.com), a diferença que separa as duas espécies é apenas a quantidade de flores por inflorescência (poucas em *H. rupestris* e mais de 20 em *H. tereticaulis*), e esta é uma característica difícil de observar apenas através de material herborizado.

Diferentemente das espécies originadas por poliploidia, quais sejam *H. rupestris* ($2n=80$) e *H. briegeri* ($2n=64-84$), o restante das espécies (*H. angereri*, *H. cinnabarina*, *H. crispata*, *H. fournieri* e *H. liliputana*) apresentou $n=20$ / $2n=40$ cromossomos. Isso parece contradizer a observação de BLUMENSCHNEIN (1960b) de que a maioria das espécies da antiga seção *Parviflorae* de *Laelia* é poliplóide. Ainda assim, a representatividade dos poliplóides é altíssima neste gênero, quando comparado a outros gêneros da sub-família Epidendroideae. No levantamento realizado por BLUMENSCHNEIN (1957), incluindo tanto seus próprios dados como aqueles obtidos na literatura, de 92 espécies documentadas quanto ao número cromossômico dentro da subfamília, apenas sete apresentaram número poliplóide (com $n=40$ ou mais), sendo três destas pertencentes ao atual gênero *Hoffmannseggella*. Neste gênero, entretanto, de 16 espécies estudadas, tanto no presente trabalho quanto em trabalhos anteriores, foram observadas cinco espécies poliplóides, ou com citótipos poliplóides, representando 31,25% das espécies estudadas.

Das espécies com $2n=40$ cromossomos, apenas *H. angereri* é da região de Diamantina. O restante das espécies (*H. cinnabarina*, *H. crispata*, *H. fournieri* e *H. liliputana*) possui uma distribuição mais ao sul da Cadeia do Espinhaço. Em um trabalho de revisão feito para o gênero *Paepalanthus*, subgênero *Xeractis*, HENSOLD (1986) observou que as formas mais primitivas do gênero são encontradas na porção mais ao sul e a leste da Cadeia do Espinhaço. As formas mais avançadas foram encontradas no Platô de Diamantina e Serra do Cipó, com uma tendência à especialização em direção a um período de floração mais curto, hábito acaulescente, xeromorfia e uma inflorescência mais atrativa. De acordo com HENSOLD (1986), a porção mais ao sul do Espinhaço serviu ou como local de origem do subgênero ou como refúgio, na medida em que os ciclos úmidos se tornaram cada vez mais secos. De fato, as espécies e populações provenientes de Diamantina (Tabela 2) parecem apresentar características cromossômicas provavelmente derivadas, como a evolução de poliploidia e aneuploidia (COSTA Cap. 2).

Apesar de *H. angereri* e *H. fournieri* apresentarem alta porcentagem (95,5% a 99,3%) de tétrades normais, foram observadas anormalidades meióticas, com células apresentando variação no número de bivalentes e presença de monovalentes. Estas anormalidades podem ser um indicativo de que estas espécies também tenham origem híbrida, ou estejam hibridizando com uma espécie de alta similaridade genética, já que a grande maioria dos cromossomos possui similaridade suficiente para formar bivalentes. Em um estudo com híbridos envolvendo os gêneros *Laelia*, *Cattleya*, *Brassavola*, *Epidendrum*, *Schomburgkia* e *Sophranitis*, STORT (1984) observou que os híbridos apresentaram números haplóides variando de 7 a 40 cromossomos, porém, a maioria dos híbridos apresentou com maior frequência os números 19, 20 e 21. Deve-se salientar também que em muitos híbridos foram observadas pela autora altas porcentagens de tétrades aparentemente normais, chegando a 99,85%.

Em um grupo tão complexo como este, a observação das espécies em campo é essencial, para observar distribuição, floração e variação morfológica. Nas populações da região de Diamantina, em vários locais foram encontradas espécies simpátricas e com sobreposição no período de floração. A verdadeira dinâmica destas espécies em campo deve ser estudada, principalmente para ajudar na definição taxonômica do grupo. O gênero *Hoffmannseggella* representa também um ótimo material para estudos evolutivos, pois dentre as espécies estudadas no presente trabalho, grande parte delas apresentou algum tipo de anormalidade cromossômica. O que isto realmente representa para as espécies ainda é algo que não pode ser estabelecido, sendo necessários estudos mais amplos, não só com relação ao cariótipo, seqüenciamento genético, morfologia e biologia reprodutiva como também distribuição geográfica detalhada das espécies e influência de condições ambientais, como variações de temperatura, regimes de chuva e até mesmo predadores e perturbações de hábitat causadas por interferência humana.

4.6) BIBLIOGRAFIA

ANDERSON E. **1948**. Hybridization of the habitat. *Evolution* **2**: 1-9.

BARROS F. DE. **1990**. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras.

Acta Botanica Brasilica. **4 (1)**: 177-187.

BLUMENSCHNEIDER A. **1957**. Estudos citológicos na família Orchidaceae. *Tese de Doutorado*.

Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____. **1960a**. Estudo sobre a evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae). *Tese*

de Livre Docência. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____. **1960b**. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações*

Científicas do Instituto de Genética/ ESALQ/ USP **1**: 45-50.

BRIEGER F.G. **1960**. Contribuições para a taxonomia das orquídeas. *Publicações Científicas do*

Instituto de Genética/ ESALQ/ USP **1**: 1-31.

_____. **1961**. A evolução filogenética nos trópicos. *In: Cadeira de Citologia e Genética*

Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (F.

G. BRIEGER *et al.* (coords.)). *Atas do Primeiro Simpósio Sul Americano de Genética* 154-161.

_____. **1966**. Evolução filogenética, com referência especial às plantas superiores. *In:*

Elementos de Genética (C. PAVAN & A. B. DA CUNHA (coords)). Companhia Editora Nacional

& Universidade de São Paulo. Pp. 464-515.

CHIRON G.R. & CASTRO NETO V.P. **2002**. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindl.

Richardiana **11 (1)**: 4-28.

COUDERC H., GORENFLOT R., MORET J., SIAMI A. **1985**. Caractéristiques et conséquences de la

variation chromosomique chez l’*Ornithogalum divergens* Boreau. *Bulletin de la Société*

Botanique de France **132 (2)**: 63-71.

DRESSLER R.L. **1981**. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press,

Cambridge.

- FORNI-MARTINS E.R., PINTO-MAGLIO C.A.F., CRUZ N.D.DA. **1992**. Biologia da reprodução em plantas de cerrado: microsporogênese. *Anais do 8º Congresso da SBSP*: 77-82.
- GIULIETTI A.M. & PIRANI J.R. **1988**. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brasil. In: *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (W.R. Heyer and P.E. Vanzolini eds.). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- GUERRA M. **1983**. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura*, **35**: 190-193.
- HENSOLD N.C. **1986**. *The systematics of Paepalanthus subg. Xeractis (Eriocaulaceae)*. Ph.D. Thesis, Univ. Michigan, Michigan.
- HOSHINO T. **1988**. Chromosomal observations on *Fuchsia* species and artificial híbrids. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1153-1154.
- JOLY A.B. **1970**. *Conheça a vegetação brasileira*. EDUSP e Polígono, São Paulo.
- JONES H.G. **1968**. Studies in neotropical orchidology. *Acta Botanica Academiae Hungaricae* **14 (1-2)**: 63-70.
- LIM W.L. & LOH C.S. **2003**. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist* **159 (1)**: 279-287.
- MURRAY B., GATT M., DING H., HAMMETT K. **1998**. Polyploidy and evolution in wild and cultivated *Dahlia* species. *Annals of Botany* **81**: 647-656.
- PABST G.F.J. & DUNGS F. **1975**. Orchidaceae Brasilienses – Band I. *Brücke-Verlag Kurt Schmiersow*, Hildesheim.
- PIJL L.VAN DER & DODSON C.H. **1966**. *Orchid flower: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables.
- RAMSEY J. & SCHEMSKE D.W. **1998**. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467-501.

- SCHLECHTER R. **1917**. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11 (5)**: 87-96.
- STACE C.A. **2000**. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* **49**: 451-477.
- STORT M.N.S. **1984**. Sterility barriers of some artificial F₁ orchid hybrids: male sterility. I. Microsporogenesis and pollen germination. *American Journal of Botany* **71 (3)**: 309-318.
- VAN DEN BERG C. & CHASE M.W. **2000**. Nomenclatural notes on Laeliinae-I. *Lindleyana* **15 (2)**: 115-119.
- _____, HIGGINS W.E., DRESSLER R.L., WHITTEN W.M., ARENAS M.A.S., CULHAM A. & CHASE M.W. **2000**. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15 (2)**: 96-114.

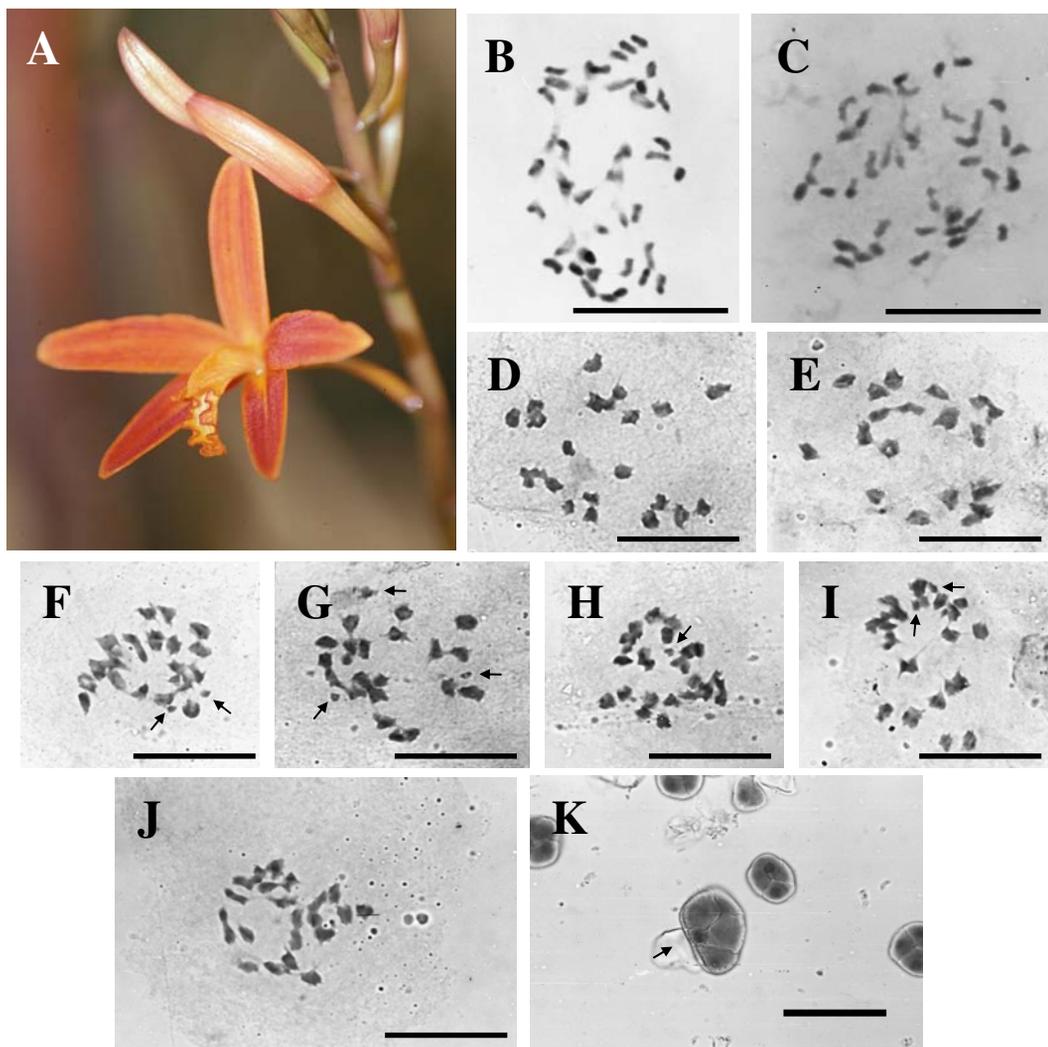


Figura 1 – *Hoffmannseggella angereri*, (A) indivíduo com flor, (B e C) metáfases mitóticas ($2n=40$) da população de Milho Verde e de Diamantina / Cachoeira dos Cristais, respectivamente; (D-J) metáfases I com (D) 20II, (E) 19II, (F) 19II+2I, (G) 19II+3I, (H) 20II+1I, (I) 20II+2I, (J) 21II, setas indicam monovalentes; (K) tétrades, seta indica micrócito. Barra=10 μ m.

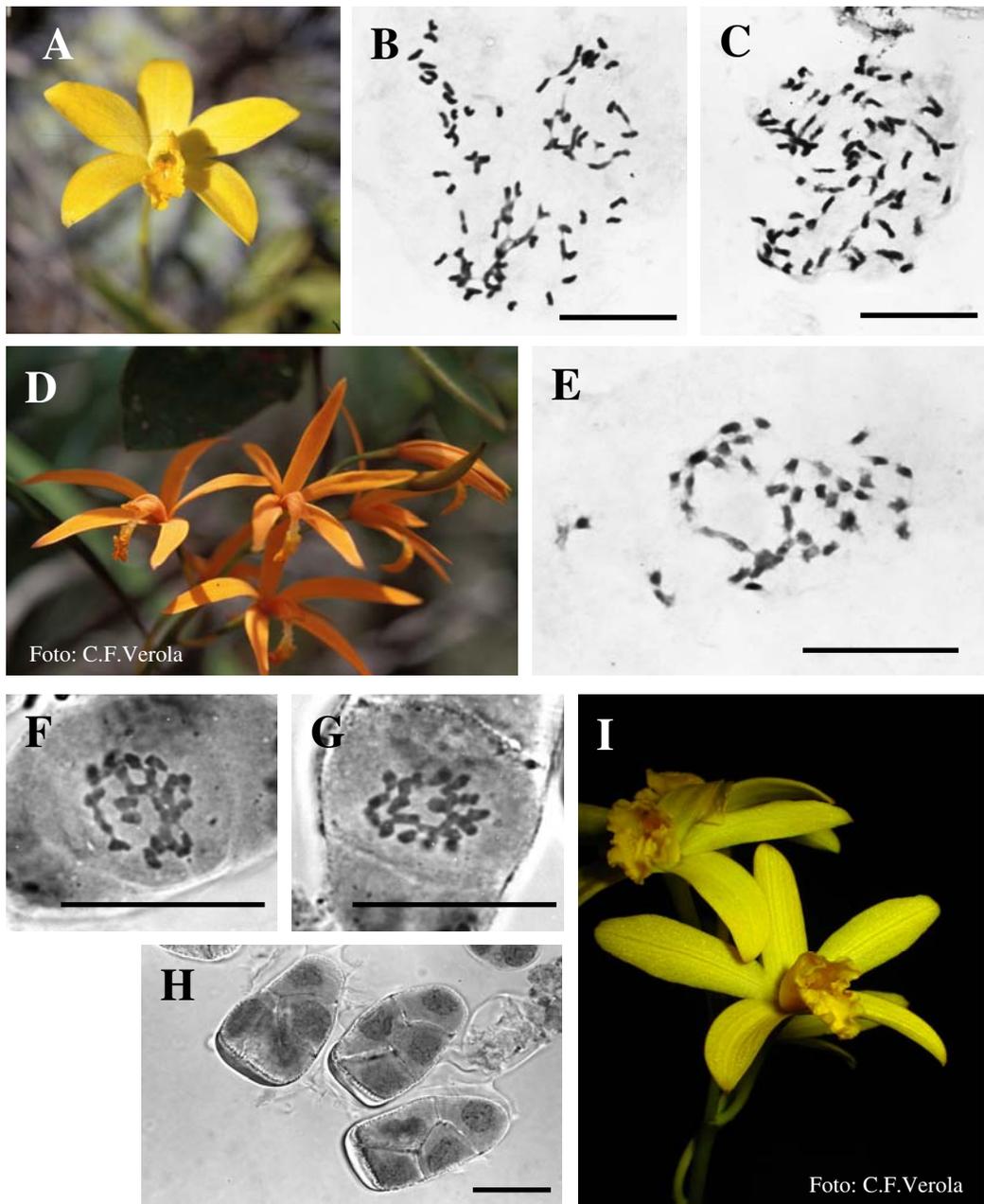


Figura 2 – (A – C) *Hoffmannseggella briegeri*: (A) detalhe da flor, (B e C) Metáfases mitóticas com $2n=73/75$ cromossomos respectivamente; (D - E) *H. cinnabarina*: (D) inflorescência e (E) metáfase mitótica com $2n=40$ cromossomos; (F - I) *H. crispata*: (F - G) metáfases polínicas, com $n=20$ cromossomos, (H) tétrades normais, com 4 micrósporos, (I) detalhe da flor. Barra= $10\mu\text{m}$.

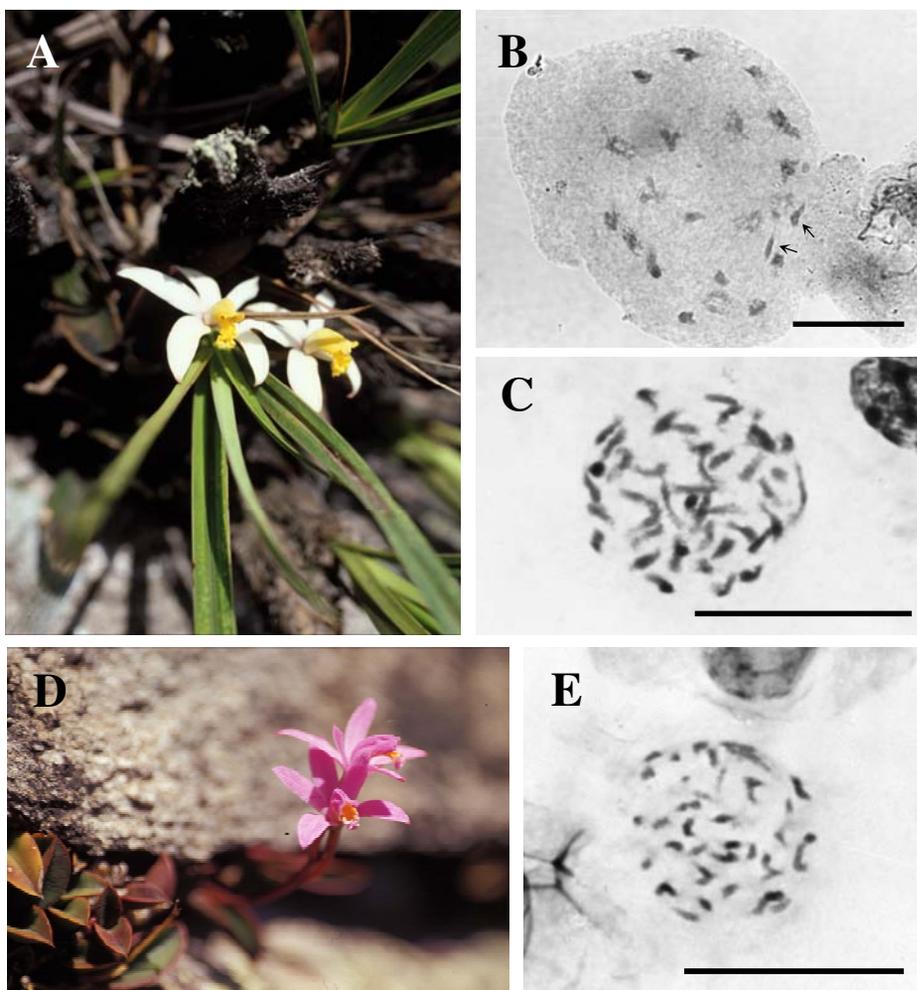


Figura 3 – (A – C) *Hoffmannseggella fournieri*: (A) Hábito, (B) diacinese com $n=19\text{II} + 2\text{I}$ (setas), (C) metáfase mitótica com $2n=40$ cromossomos; (D – E) *H. liliputana*: (D) Hábito, (E) pró-metáfase mitótica com $2n=40$ cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$.

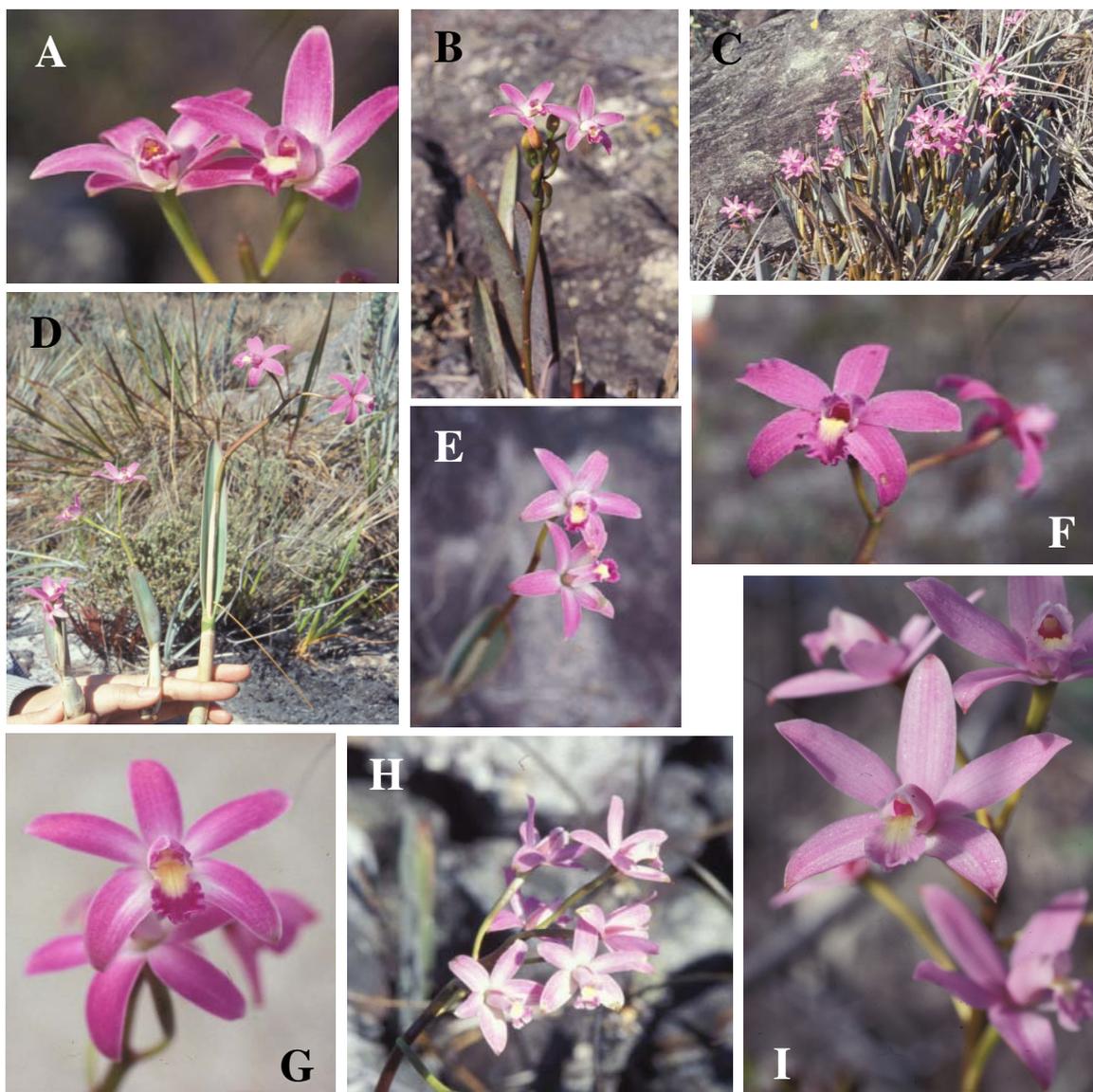


Figura 4 – Indivíduos de *Hoffmannseggella rupestris* coletados em diferentes localidades; (A – C) Diamantina, estrada para Biribiri, (D – F) Diamantina, afloramento de Soberbo, demonstrando variação morfológica entre indivíduos (D) e detalhes da flor mostrando variação na coloração (E e F); (G) Datas, (H) Diamantina - Curralinho, (I) Diamantina afloramento próximo ao Caminho dos Escravos.

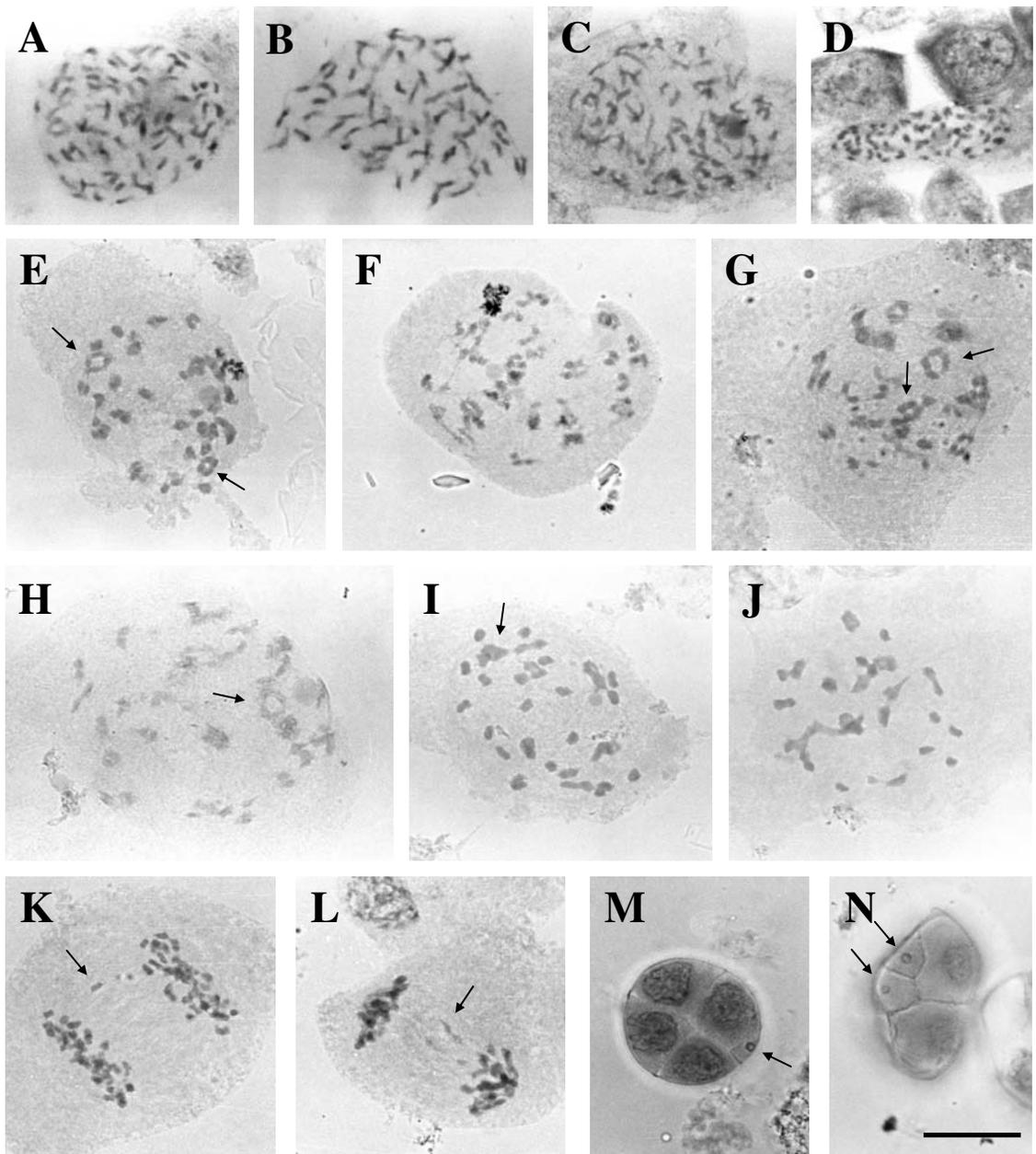


Figura 5 – *Hoffmannseggella rupestris* de Diamantina, população do afloramento de Biribiri. (A – D) Metáfases/Pró-metáfases mitóticas com $2n \approx 70$ cromossomos. (E – H) Diacineses com $n \approx 40$ bivalentes, setas indicam possíveis tetravalentes. (I – J) Metáfases I também com $n \approx 40$ bivalentes, setas indicam possíveis tetravalentes. (K- L) Anáfases I com cromossomos retardatários (setas). (M – N) Tétrades anormais com micróctos (setas). Barra = $10\mu\text{m}$.

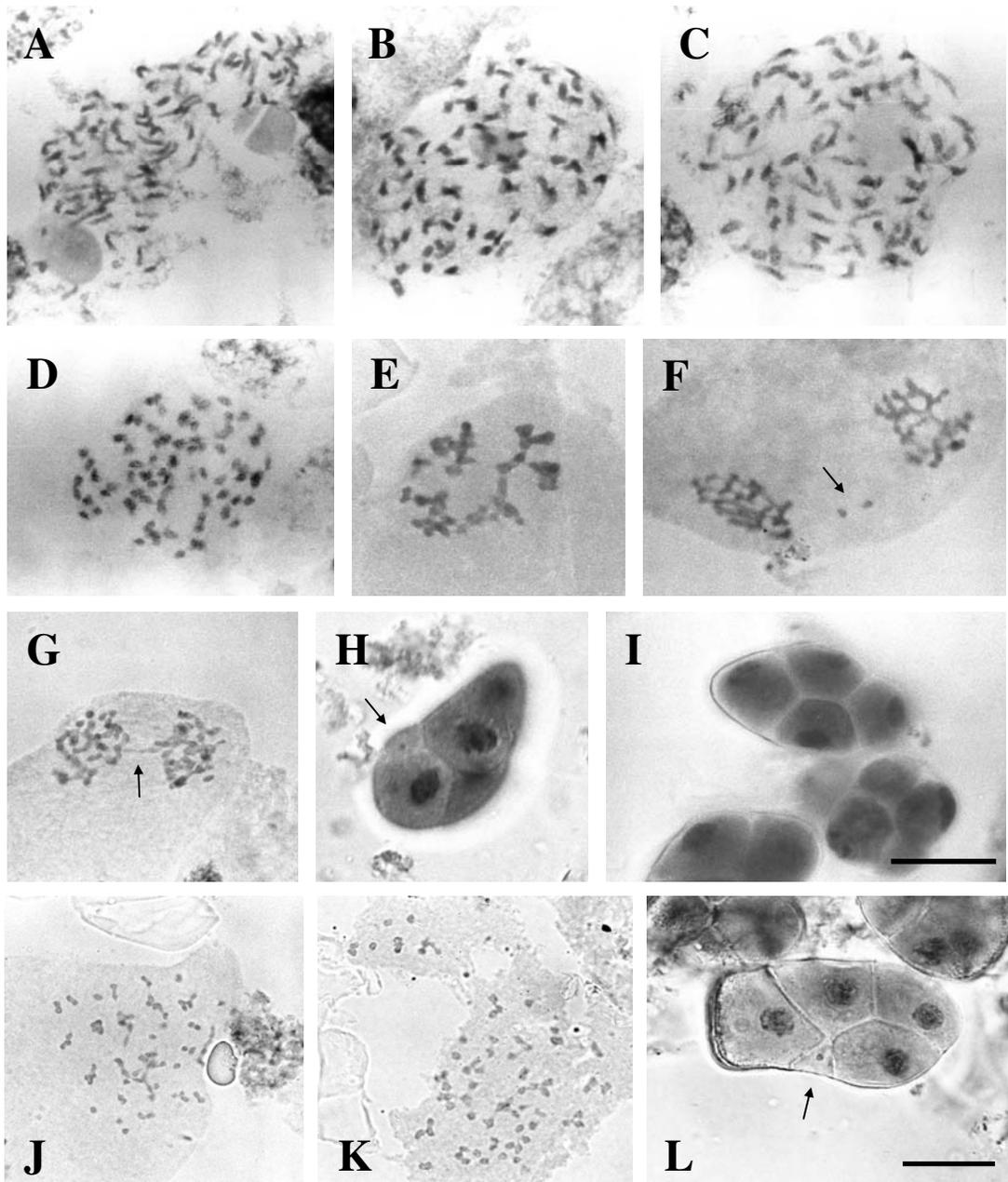


Figura 6 – *Hoffmannseggella rupestris* de Diamantina, (A – I) população do afloramento de Soberbo. (A – D) Metáfases/Pró-metáfases mitóticas com $2n \approx 70$ cromossomos. (E) Metáfase I. (F- G) Anáfases I com cromossomos retardatários (setas). (H) Tétrade anormal com micrócito (seta). (I) Tétrades normais. (J – L) População do afloramento próximo ao Caminho dos Escravos. (J – K) Metanáfases com $n \approx 40$ cromossomos. (L) Tétrade anormal com micrócito (seta). Barra = $10\mu\text{m}$.

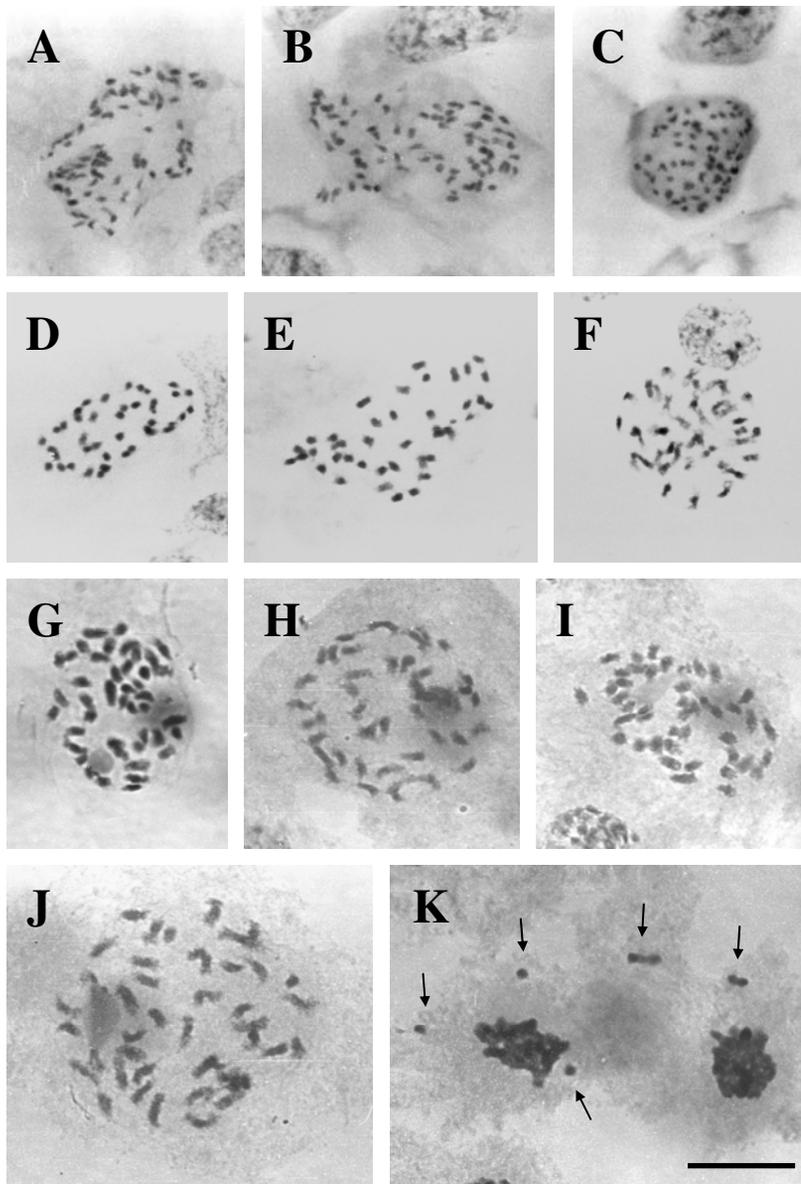


Figura 7 – *Hoffmannseggella rupestris* (A – C) Metáfases mitóticas da Pop. 1, de Francisco Sá/MG, com $2n \approx 70$ cromossomos; (D – F) metáfases mitóticas da Pop. 2, de Botumirim/MG, com $2n = 40$ cromossomos; (G – J) metáfases mitóticas obtidas em polínias de indivíduos da Pop. 3, de Grão Mogol/MG, com $2n = 40$ cromossomos; e (K) anáfase I da Pop. 3 com cromossomos ou fragmentos de cromossomos perdidos (setas). Barra = $10\mu\text{m}$.

5. CAPÍTULO 2

HOFFMANNSEGGELLA VIRIDIFLORA VEROLA & SEMIR - EVOLUÇÃO POR ANEUPLOIDIA A
PARTIR DE UMA ESPÉCIE SINCRONOPÁTRICA?

5.1) RESUMO:

A espécie *Hoffmannseggella viridiflora* Verola & Semir (Laeliinae, Orchidaceae) foi recentemente descoberta e descrita por Verola & Semir, e é caracterizada pela coloração esverdeada das sépalas, tamanho reduzido do perianto, posição ereta das peças florais e forma espatulada das pétalas com ápice ondulado. Esta espécie foi observada ocorrendo em siconopatria com *H. bradei* (Pabst) V.P.Castro & Chiron, em Diamantina/MG, na estrada para Conselheiro Mata. Os estudos morfológicos e fenológicos sugerem proximidade entre as duas espécies. No presente trabalho, foram observados diferentes números cromossômicos entre as espécies, com *H. bradei* apresentando $2n=40$ cromossomos e *H. viridiflora* apresentando $2n=44$ cromossomos. Esta é a primeira documentação de origem aneuplóide dentro do gênero, constituído principalmente por espécies com $2n=40$ e $2n=80$ cromossomos. Pela observação de anormalidades meióticas em *H. bradei*, sugere-se que a nova espécie provavelmente tenha se originado a partir de *H. bradei*, através da união de gametas desbalanceados, com $n=22$ cromossomos. A comparação dos cariótipos de ambas as espécies permite supor que a origem de *H. viridiflora* não se deu apenas por duplicação de alguns pares cromossômicos, mas sim que poderiam ter ocorrido rearranjos cromossômicos após a duplicação ou ainda poderia haver outra espécie parental, além de *H. bradei*, envolvida no surgimento da nova espécie.

5.2) INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas conhecidas, possuindo cerca de 25.000 espécies, representando cerca de 7% das fanerógamas existentes (PIJL & DODSON 1966). Na tribo Epidendreae, conforme apresentada por PABST & DUNGS (1975), a subtribo Laeliinae Bentham possui 1466 espécies, agrupadas em 43 gêneros, com espécies caracterizadas por plantas epifíticas ou terrestres, com caule delgado ou em pseudobulbos, folhas dísticas ou terminais, duplicadas e usualmente articuladas, inflorescência, em sua maioria, terminal. As flores podem ser grandes ou pequenas e muitas apresentam nectário em forma de cunículo (DRESSLER 1981). Nesta subtribo, PABST & DUNGS (1975), seguindo o sistema proposto por SCHLECHTER (1917), haviam situado o gênero *Laelia* Lindl., porém recentemente CHIRON & CASTRO NETO (2002) sugeriram, através de características morfológicas, ambientais e moleculares, que o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones deveria ser reconsiderado para acomodar as espécies rupícolas. O gênero *Hoffmannseggella* já havia sido criado por H.G.JONES (1968) para acomodar as espécies rupícolas do gênero *Laelia*, sendo o gênero *Laelia* mantido apenas para as espécies epifitas mexicanas, das seções *Laelia*, *Podolaelia* e *Calolaelia*. Desta forma, as espécies que estavam previamente circunscritas na seção *Parviflorae*, com exceção das espécies *Laelia harpophylla*, *L. brevicaulis* e *L. kautskyi* (que juntas atualmente formam o gênero *Dungsia* Chiron & V.P.Castro), foram transferidas para o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones. Entretanto, a situação taxonômica do gênero *Hoffmannseggella*, com aproximadamente 32 espécies, ainda está em discussão, e a delimitação das espécies dentro do gênero é complexa, devido à alta variabilidade intra-específica e ao aparecimento de indivíduos com características intermediárias entre espécies previamente aceitas (BARROS 1990).

Todas as espécies do gênero *Hoffmannseggella* são endêmicas dos campos rupestres e são encontradas principalmente na região do município de Diamantina/MG. VEROLA & SEMIR (submetido) descreveram uma nova espécie, *H. viridiflora* Verola & Semir, sincronopátrica com *H. bradei* (Pabst) V.P. Castro & Chiron e apresentaram dados morfológicos comparativos entre essas

duas espécies, assim como entre outras espécies proximamente relacionadas, como, *H. esalqueana* (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron, *H. itambana* (Pabst) V.P.Castro & Chiron e *H. verboonenii* (Miranda) V.P.Castro & Chiron. Dentre as principais características que delimitam a nova espécie estão a cor esverdeada das pétalas e sépalas, além do labelo, as pétalas espatuladas e as peças do perianto eretas. Entretanto, os próprios autores sugerem que a nova espécie poderia representar apenas uma variação morfológica de *H. bradei*, principalmente porque *H. viridiflora* apresenta baixa representatividade no local onde foram coletadas as duas espécies.

Estudos citogenéticos na subtribo Laeliinae são extremamente escassos, sendo documentados os números cromossômicos de $2n=40$, $2n=60$ e $2n=80$ (BLUMENSCH. 1960b, COSTA Cap. 1), com o número básico de $x=20$ para o grupo. Além da ocorrência de poliploidia, foi também observada a ocorrência de aneussomatia em *H. brieri* e *H. rupestris* (COSTA Cap1) e anormalidades durante o processo meiótico em várias espécies (BLUMENSCH. 1960b, COSTA Cap1) . O presente trabalho teve como objetivo o estudo cromossômico das espécies *H. bradei* e *H. viridiflora* visando contribuir na diferenciação das espécies entre si e na compreensão dos mecanismos evolutivos que podem estar envolvidos na origem de *H. viridiflora*.

5.3) MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1) Espécies coletadas

Foram coletados meristemas radiculares e/ou botões florais e ovários imaturos das espécies *Hoffmannseggella bradei*, de três populações em Diamantina (Morro do Cruzeiro J.Y.C. 03/031, Caminho dos Escravos J.Y.C. 03/057 e Conselheiro Mata CL05) e *H. viridiflora*, de material cultivado em casa de vegetação proveniente de Diamantina (Conselheiro Mata – UEC 139238). A coleta de raízes só foi possível no período em que as plantas encontravam-se em seu estado vegetativo. No período de floração poucas raízes novas foram encontradas. Neste período foram coletados apenas botões florais e ovários imaturos.

Material testemunho das espécies e populações encontradas em estágio reprodutivo, após terem sido identificados, foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

5.3.2) Pré-tratamento, fixação e armazenamento

Os meristemas radiculares foram coletados entre 6h e 9h da manhã., enquanto botões florais e ovários imaturos foram coletados tanto no período da manhã quanto da tarde. Os meristemas radiculares e ovários imaturos foram pré-tratados em 8-Hidroxiquinoleína (8-Hq) 0,002M por 24h, a 4°C. As raízes, os ovários imaturos e os botões florais foram fixados em solução Carnoy contendo etanol, ácido acético glacial e clorofórmio (6:3:1), por no mínimo 24h, à temperatura ambiente, e armazenados em freezer.

5.3.3) Análise mitótica

Para a análise mitótica, as raízes e ovários imaturos pré-tratados foram lavados em água destilada e digeridos em HCl 5N por 20 minutos. Após outra lavagem, o ápice meristemático, ou o ovário imaturo, foi fragmentado sobre a lâmina com uma gota de ácido acético 45%. O material foi

esmagado e a lamínula retirada em Nitrogênio líquido. Depois de secas, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa 2% (GUERRA, 1983) por aproximadamente 10 minutos. Após lavadas e secas, as lâminas foram montadas com meio rápido de montagem (Entellan ou Allklan). As lâminas foram observadas em microscópio óptico e as melhores células fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX51, utilizando filme PB ISO 25 (Imagelink – Kodak) ou ISO 50 (PanF – Ilford).

5.3.4) Elaboração de ideogramas

Após os tratamentos citados acima, foram elaborados os ideogramas para as espécies *H. bradei* e *H. viridiflora*. Para isso, foi escolhida uma célula em metáfase mitótica de cada espécie, com bom espalhamento e boa morfologia cromossômica. Para *H. bradei* foi amostrada a população de Conselheiro Mata. As imagens das células foram digitalizadas, com auxílio de câmera acoplada ao microscópio óptico Olympus BX50, e medidas através do programa Image Pro-Plus 4.0. O ideograma foi elaborado com base na média, obtida a partir de 10 medições repetidas na mesma célula, para cada par cromossômico, incluindo tamanho do cromossomo, posição do centrômero e de constrições secundárias. A nomenclatura para a morfologia cromossômica foi atribuída de acordo com GUERRA (1986). Para caracterização do cariótipo foram também utilizadas medidas como o CTC (comprimento total da cromatina), calculado através da soma do tamanho individual de todos os cromossomos, o IC (índice centromérico), calculado dividindo-se o tamanho do braço curto do cromossomo pelo tamanho individual do cromossomo e multiplicando-se por 100, e o TF% (índice de assimetria), calculado através da soma de todos os índices centroméricos de cada par e dividida pelo número de pares cromossômicos (HUZIWARA, 1962).

5.3.5) Análise meiótica e normalidade de tétrades

Pela disponibilidade de material, os procedimentos para análise meiótica e de normalidade de tétrades foram realizados apenas nas populações de *H. bradei*. Para a análise meiótica, polínias

foram retiradas dos botões florais fixados e esmagadas em carmim acético 1,2%, sendo as lamínulas seladas com esmalte incolor. As células foram fotografadas em Fotomicroscópio Olympus BX51, em filme PB ISO 25 (Imagelink – Kodak) ou ISO 50 (PanF – Ilford).

Para a análise de normalidade de tétrades, polínias em fase mais adiantada foram esmagadas também em carmim acético 1,2%. Cinco diferentes polínias (uma por lâmina) foram analisadas de cada espécie/população e em cada lâmina foram observados 20 campos distribuídos por toda a lâmina, escolhidos de forma aleatória, em objetiva de 40X, para a análise de cerca de 1000 tétrades por população. O desvio-padrão (DP) foi calculado com base na porcentagem de tétrades normais e anormais observadas, dentre as cinco polínias analisadas e entre as diferentes populações.

5.4) RESULTADOS

5.4.1) *Hoffmannseggella bradei*

A espécie (Figs 1A e 1B) apresenta $2n=40$ cromossomos (Fig. 1D), nas três populações estudadas, e apresentou variação gradual no complemento absoluto dos cromossomos (Tabela 1 e Fig. 1G), observando 9 pares metacêntricos, 5 pares submetacêntricos, 4 pares acrocêntricos e 2 pares telocêntricos, com a fórmula cariotípica $9m + 5sm + 4a + 2t$. Foi visualizado apenas um par cromossômico contendo constrição secundária, presente no menor par telocêntrico (Tabela 1). O comprimento total da cromatina (CTC) foi igual a $72,55\mu\text{m}$ e o índice de assimetria (TF%) foi de 34,50. O padrão de condensação cromatínica em prófase é proximal, partindo provavelmente do centrômero e direcionando-se às extremidades dos cromossomos.

Resultados interessantes foram obtidos na análise meiótica (Figs. 2A a 2F). Foram observados $n=20/21$ bivalentes (Figs. 2A a 2C), no mesmo indivíduo, com algumas anormalidades no processo, principalmente na população do Caminho dos Escravos (Fig. 1B). Além da variação no número de bivalentes, foram ainda observados um bivalente com disjunção precoce durante a metáfase I (Figs. 2D e 2E), e um bivalente fora da placa metafásica (Fig. 2F). De 1042 placas metafásicas analisadas, em 38,4% delas foi observada a migração adiantada de um bivalente e em 28,7% foi observado um bivalente fora da placa metafásica.

Na análise de normalidade de tétrades da população do Morro do Cruzeiro, foram observados 94,3% de tétrades normais (Fig. 2G), de um total de 903 tétrades analisadas. O desvio-padrão (DP) calculado entre as cinco lâminas observadas foi de 10,67. Este valor relativamente alto para o desvio-padrão pode ser explicado principalmente por uma das lâminas, que apresentou apenas 75,3% de tétrades normais. O restante das lâminas apresentou de 97,3% a 100% de tétrades normais.

A análise de normalidade de tétrades, da população do Caminho dos Escravos, demonstrou 96,9% de tétrades normais (Fig. 2H), em 902 tétrades observadas. O desvio-padrão foi de 3,9, sendo observados de 90,1% a 100% de tétrades normais em cada lâmina. As tétrades anormais encontradas

apresentaram um (Fig. 2I) ou dois micrócitos adicionais aos quatro micrósporos normalmente presentes na tétrade.

A população coletada no Morro do Cruzeiro, em Diamantina (Fig. 1A) (n° de coleta: 2003/031 e 2003/038), foi a única a apresentar flores no período de julho, enquanto nos outros dois locais de coleta, no mesmo município, os indivíduos apresentaram floração em dezembro.

Par	BC	BL	Total	DP	IC	DP	Tipo	CS
1	0,85	1,47	2,32	±0,07	36,56	±0,43	Submetacêntrico	-
2	0,89	1,41	2,29	±0,08	38,71	±0,79	Submetacêntrico	-
3	0,93	1,11	2,04	±0,16	45,65	±0,17	Metacêntrico	-
4	0,89	1,14	2,03	±0,09	43,99	±0,33	Metacêntrico	-
5	0,96	1,05	2,02	±0,08	47,79	±0,37	Metacêntrico	-
6	0,89	1,08	1,97	±0,09	45,39	±0,29	Metacêntrico	-
7	0,91	1,04	1,95	±0,08	46,72	±0,66	Metacêntrico	-
8	0,44	1,46	1,90	±0,09	23,21	±0,98	Acrocêntrico	-
9	0,51	1,38	1,89	±0,07	26,83	±0,80	Acrocêntrico	-
10	0,40	1,45	1,85	±0,07	21,58	±0,77	Acrocêntrico	-
11	0,68	1,15	1,84	±0,10	37,19	±0,22	Submetacêntrico	-
12	0,70	1,11	1,82	±0,12	38,66	±0,20	Submetacêntrico	-
13	0,84	0,97	1,81	±0,07	46,49	±0,08	Metacêntrico	-
14	0,82	0,95	1,77	±0,08	46,19	±0,43	Metacêntrico	-
15	0,42	1,29	1,71	±0,07	24,79	±0,63	Acrocêntrico	-
16	0,78	0,88	1,66	±0,06	47,07	±0,80	Metacêntrico	-
17	0,50	1,15	1,65	±0,07	30,54	±0,53	Submetacêntrico	-
18	0,65	0,88	1,54	±0,10	42,59	±0,95	Metacêntrico	-
19	0	1,16	1,16	±0,06	0	±0	Telocêntrico	-
20	0	1,05	1,05	±0,08	0	±0	Telocêntrico	*

Tabela 1: Medidas realizadas nos 20 pares cromossômicos de *Hoffmannseggella bradei*, contendo tamanho médio (em μm) dos braços curtos (BC), longos (BL) e comprimento total do cromossomo (Total), índice centromérico (IC) médio calculado, desvio padrão (DP) para o comprimento total dos cromossomos e IC, classificação quanto à morfologia cromossômica (Tipo) e presença (*) de constrição secundária (CS).

5.4.2) *Hoffmannseggella viridiflora*

Na análise mitótica desta espécie foram observados $2n=44$ cromossomos (Figs. 1E e 1F), com constrições secundárias em dois pares (setas). A espécie apresentou variação gradual entre os cromossomos (Tabela 2, Fig. 1H), com 8 pares de cromossomos metacêntricos, 8 submetacêntricos, 3 acrocêntricos e 3 telocêntricos e fórmula cariotípica de $8m + 8sm + 3a + 3t$, comprimento total da cromatina (CTC) igual a 65,75, e índice de assimetria (TF%) igual a 31,56. Esta espécie, em casa de vegetação, floresceu em dezembro (Verola & Semir, submetido).

Par	BC	BL	Total	DP	IC	DP	Tipo	CS
1	0,90	1,17	2,07	$\pm 0,12$	43,47	$\pm 0,38$	Metacêntrico	-
2	0,33	1,69	2,02	$\pm 0,10$	16,35	$\pm 0,34$	Acrocêntrico	-
3	0,44	1,55	2,00	$\pm 0,15$	22,19	$\pm 0,20$	Acrocêntrico	-
4	0,58	1,38	1,96	$\pm 0,10$	29,52	$\pm 0,66$	Submetacêntrico	-
5	0,62	1,17	1,79	$\pm 0,09$	34,62	$\pm 0,36$	Submetacêntrico	-
6	0,40	1,33	1,73	$\pm 0,10$	23,12	$\pm 0,98$	Acrocêntrico	-
7	0,61	0,99	1,60	$\pm 0,19$	38,22	$\pm 0,92$	Submetacêntrico	*
8	0,72	0,87	1,59	$\pm 0,13$	45,31	$\pm 0,60$	Metacêntrico	-
9	0,73	0,86	1,59	$\pm 0,08$	45,80	$\pm 0,53$	Metacêntrico	-
10	0,53	0,98	1,51	$\pm 0,18$	35,32	$\pm 0,29$	Submetacêntrico	-
11	0,42	1,05	1,47	$\pm 0,14$	28,47	$\pm 0,09$	Submetacêntrico	-
12	0,65	0,78	1,43	$\pm 0,06$	45,19	$\pm 0,59$	Metacêntrico	-
13	0,63	0,79	1,42	$\pm 0,21$	44,47	$\pm 0,91$	Metacêntrico	-
14	0,65	0,74	1,39	$\pm 0,08$	47,06	$\pm 0,73$	Metacêntrico	-
15	0,48	0,87	1,35	$\pm 0,06$	35,70	$\pm 0,97$	Submetacêntrico	-
16	0,50	0,78	1,28	$\pm 0,08$	39,27	$\pm 0,33$	Submetacêntrico	-
17	0,58	0,67	1,25	$\pm 0,07$	46,10	$\pm 0,89$	Metacêntrico	-
18	0,55	0,70	1,25	$\pm 0,31$	44,41	$\pm 0,10$	Metacêntrico	-
19	0,34	0,82	1,16	$\pm 0,07$	29,74	$\pm 0,83$	Submetacêntrico	*
20	0	1,05	1,05	$\pm 0,05$	0	± 0	Telocêntrico	-
21	0	1,05	1,05	$\pm 0,05$	0	± 0	Telocêntrico	-
22	0	0,90	0,90	$\pm 0,05$	0	± 0	Telocêntrico	-

Tabela 2: Medidas realizadas nos 22 pares cromossômicos de *Hoffmannseggella viridiflora*, contendo tamanho médio (em μm) dos braços curtos (BC), longos (BL) e comprimento total do cromossomo (Total), índice centromérico (IC) médio calculado, desvio padrão (DP) para o comprimento total dos cromossomos e IC, classificação quanto à morfologia cromossômica (Tipo) e presença (*) de constrição secundária (CS).

5.5) DISCUSSÃO

A documentação de diferentes números cromossômicos entre *H. bradei* ($2n=40$) e *H. viridiflora* ($2n=44$), reforça a hipótese de VEROLA & SEMIR (submetido) de que *H. viridiflora* representa uma nova espécie, e não simplesmente uma variação morfológica de *H. bradei*. A nova espécie representa também a primeira documentação de origem por aneuploidia para o gênero. Até o momento, a poliploidia parecia ser o principal mecanismo de evolução cariotípica no gênero (BLUMENSCHNEIN 1960a, COSTA Cap.1). O envolvimento da aneuploidia na origem de uma nova espécie, com acréscimo de um par cromossômico ao complemento, reforça ainda mais a hipótese de BARROS (1990) de que a “explosão” evolutiva do grupo ainda está em andamento.

Além da similaridade morfológica e do fato de serem sincronopátricas, as características cromossômicas parecem indicar que *H. viridiflora* tenha provavelmente se originado a partir de *H. bradei*, com envolvimento de inúmeras alterações estruturais nos cromossomos, ou ainda, que *H. bradei* seja um dos possíveis parentais de *H. viridiflora*. Apesar da espécie *H. bradei* apresentar $2n=40$ cromossomos, foram observadas algumas anormalidades meióticas em algumas populações. É possível presumir que o número cromossômico da nova espécie tenha sido originado pelas anormalidades cromossômicas observadas durante o processo de divisão meiótica de *H. bradei*.

A alta porcentagem (96,9%) de tétrades normais em *H. bradei* não condiz com as observações realizadas na meiose, na qual foi obtida a contagem de $n=20/21$ cromossomos. Algumas células foram observadas com $n=20$ bivalentes e outras com $n=21$ bivalentes durante a metáfase I. É possível que células com $n=21$ bivalentes, devido a erros na disjunção cromossômica, tenham originado tétrades desbalanceadas, porém férteis. Se algum bivalente errático permanecesse no mesmo pólo de divisão, sem, portanto, ter sofrido a separação dos homólogos, micrósporos com $n=22$ cromossomos seriam gerados e, unidos entre si gerariam um embrião com $2n=44$ cromossomos. De acordo com STEBBINS (1971), um dos principais mecanismos para a evolução por aumento aneuplóide é a não-disjunção de bivalentes meióticos, particularmente aqueles pequenos,

de forma que ambos os membros do par são igualmente incluídos em um único gameta. Se tal gameta carregando um cromossomo extra se une a um gameta normal, a planta resultante é trissômica para um cromossomo pequeno. Tais trissômicos são instáveis, mas sob algumas condições, particularmente na progênie de cruzamentos entre diferentes raças ou espécies, eles podem persistir indefinidamente na população. Isto gera a oportunidade para translocações ocorrerem, as quais transferem material genético essencial de um diferente tipo cromossômico para um dos três cromossomos replicados. O último será então perpetuado como um cromossomo normal, essencial ao complemento.

Além da variação numérica em metáfases I, foram freqüentemente observados dois monovalentes, que geralmente segregaram um para cada pólo da célula. Entretanto, estes apresentaram uma separação muito adiantada em relação aos outros bivalentes. Pela proximidade entre estes monovalentes, assumiu-se que estes provavelmente pareiam, mas por um período bem curto, mas é possível que estes nem sequer formem bivalentes durante a metáfase I, ou então não tenha ocorrido a formação de quiasmas entre eles, ou ainda, se formou, este foi terminal e finalizou precocemente. Estes monovalentes podem ser um indicativo de que *H. bradei* teria origem híbrida, ou estaria hibridizando com uma espécie de alta similaridade genética, já que a grande maioria dos cromossomos possui similaridade suficiente para formar bivalentes, entretanto, através dos dados cromossômicos obtidos, não é possível supor quais seriam os parentais, já que não são observadas espécies sincronopátricas com a *H. bradei* com $2n=40$ cromossomos. Seria possível supor que *H. bradei* possui origem híbrida, mas que um dos parentais está extinto ou já isolado geograficamente ou fenologicamente. Em um estudo com híbridos envolvendo os gêneros *Laelia*, *Cattleya*, *Brassavola*, *Epidendrum*, *Schomburgkia* e *Sophranitis*, STORT (1984) observou que os híbridos apresentaram números haplóides variando de 7 a 40 cromossomos, porém, a maioria dos híbridos apresentou, com maior freqüência, os números 19, 20 e 21. Deve-se salientar também que em

muitos híbridos foram observadas pela autora altas porcentagens de tétrades, aparentemente normais, chegando a 99,85%.

É interessante observar também que junto às populações de *H. bradei* são freqüentemente encontradas populações de *H. rupestris*. Esta espécie floresce em julho, não sendo, portanto, sincronopátrica com *H. bradei* e *H. viridiflora* na população de Conselheiro Mata. Entretanto, *H. rupestris* é sincronopátrica com a população de *H. bradei* observada no Morro do Cruzeiro. Por apresentar $2n=80/ n=ca.40$ cromossomos (Cap. 1), seria difícil supor que *H. rupestris* e *H. bradei* pudessem, por eventos de hibridização, ter dado origem a *H. viridiflora*.

Através da comparação dos ideogramas de ambas as espécies (*H. bradei* e *H. viridiflora*), pode-se observar que, apesar de *H. viridiflora* provavelmente ter se originado por aneuploidia, as espécies possuem valores de comprimento total da cromatina (CTC) próximos (72,55 e 65,75 μ m, respectivamente), sendo este inclusive menor para a espécie nova. Isto ocorre porque, provavelmente, além da adição, houve também rearranjos cromossômicos, que podem ser supostos pela comparação entre as fórmulas cariotípicas de ambas as espécies (9m+5sm+4a+2t em *H. bradei* e 8m + 8sm + 3a + 3t na espécie nova). Apesar da grande similaridade do número e tipos cromossômicos na fórmula cariotípica, a análise dos ideogramas evidencia muitas diferenças. Por exemplo, os sete maiores pares cromossômicos de *H. bradei* são submetacêntricos (2) ou metacêntricos (5), enquanto que em *H. viridiflora* encontra-se apenas um par metacêntrico, sendo os demais acrocêntricos (3) e submetacêntricos (3). As diferenças na distribuição dos tipos cromossômicos ocorrem também entre os pares cromossômicos de tamanho intermediário e pequeno. Durante o processo de rearranjo, é possível também que segmentos cromossômicos tenham sido perdidos, ocasionando a diminuição no valor do CTC. Além disso, pôde-se observar diferença no valor de TF% (34,50 para *H. bradei* e 31,56 para *H. viridiflora*). Estes valores indicam que a espécie *H. viridiflora* é discretamente mais assimétrica que a espécie *H. bradei*. De acordo com STEBBINS (1971), no processo evolutivo, espécies derivadas tendem a ter cariótipos mais

assimétricos que espécies ancestrais, o que poderia reforçar a hipótese de que *H. viridiflora* é uma espécie derivada com relação a *H. bradei*.

Em um grupo tão complexo como este, a observação em campo das espécies é essencial, pois permite entender melhor a distribuição geográfica, floração e variação morfológica. Nas populações da região de Diamantina, em vários locais foram encontradas espécies simpátricas e com sobreposição no período de floração. A verdadeira dinâmica dessas espécies em campo deve ser estudada, principalmente para ajudar na definição taxonômica do grupo. Possivelmente, as *Hoffmannseggella* representam também um ótimo material para estudos evolutivos, pois dentre as espécies estudadas por BLUMENSCHNEIN (1957, 1960a e 1960b) e no presente trabalho (Cap. 1), grande parte delas apresentou alguma anormalidade cromossômica. O que isto realmente representa para as espécies ainda é algo que não pode ser estabelecido, porém a descoberta de uma nova espécie, *H. viridiflora*, provavelmente derivada por aneuploidia cromossômica, indica que tais anormalidades podem ser fundamentais para a compreensão da evolução do grupo como um todo. Estudos mais amplos, não só com relação ao cariótipo, seqüenciamento genético, morfologia e biologia reprodutiva como também distribuição geográfica detalhada das espécies e influência de condições ambientais, como variações de temperatura, regimes de chuva e até mesmo predadores e perturbações de habitat causadas por interferência humana seriam fundamentais para que se pudesse compreender a origem e delimitação taxonômica das espécies do gênero *Hoffmannseggella*.

5.6) BIBLIOGRAFIA

- BARROS F. DE. **1990**. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta bot. bras.* **4 (1)**: 177-187.
- BLUMENSCHNEIDER A. **1957**. Estudos citológicos na família Orchidaceae. *Tese de Doutorado*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- _____. **1960a**. Estudo sobre a evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae). *Tese de Livre Docência*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- _____. **1960b**. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética/ ESALQ/ USP* **1**: 45-50.
- CHIRON G.R. & CASTRO NETO V.P. **2002**. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindl. *Richardiana* **11 (1)**: 4-28.
- DRESSLER R.L. **1981**. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- GUERRA M. **1983**. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura*, **35**: 190-193.
- GUERRA M. **1986**. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev. Brasil. Genet.* **9 (4)**: 741-743.
- HUZIWARA Y. **1962**. Karyotype analysis in some genera of compositeae – VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* **49**:116-119.
- JONES H.G. **1968**. Studies in neotropical orchidology. *Acta Botanica Academiae Hungaricae* **14 (1-2)**: 63-70.
- PABST G.F.J & DUNGS F. **1975**. Orchidaceae Brasilienses – Band I. *Brücke-Verlag Kurt Schmiersow*, Hildesheim.
- PIJL L.VAN DER & DODSON C.H. **1966**. *Orchid flower: their pollination and evolution*. University of

Miami Press, Coral Gables.

SCHLECHTER R. **1917**. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11** (5): 87-96.

STEBBINS G.L. **1971**. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

STORT M.N.S. **1984**. Sterility barriers of some artificial F₁ orchid hybrids: male sterility. I. Microsporogenesis and pollen germination. *American Journal of Botany* **71** (3): 309-318.

VEROLA C.F. & SEMIR J. A new specie of *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Laeliinae) from Brazilian "Campos Rupestres" vegetation. *Novon* (Submetido)

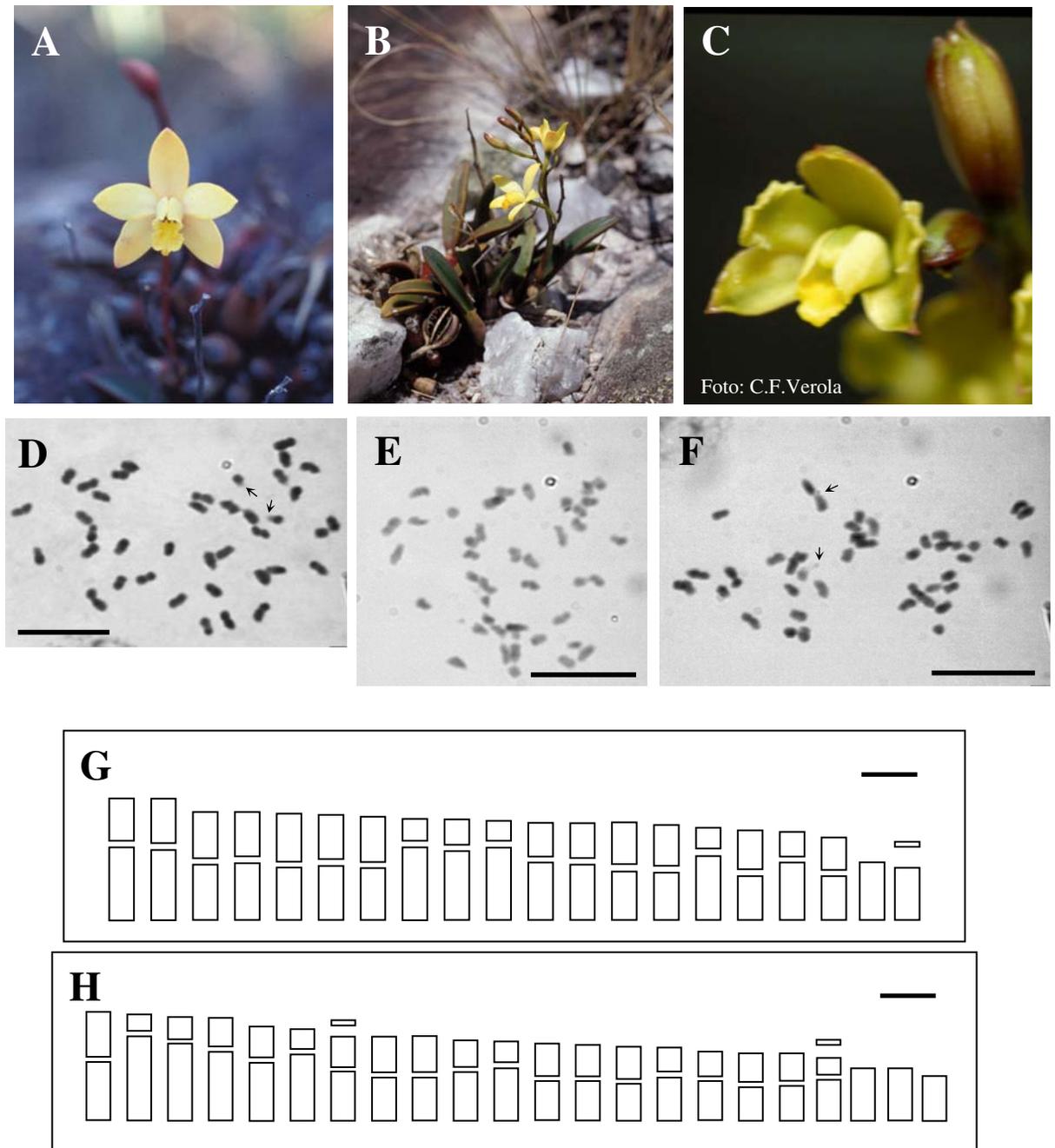


Figura 1 – *Hoffmannseggella bradei*, coletadas em Diamantina, no morro do Cruzeiro (A) e no Caminho dos Escravos (B) e *H. viridiflora* (C), coletada na estrada para Conselheiro Mata; (D) metáfase mitótica e (G) cariótipo de *H. bradei* com $2n=40$ cromossomos, setas indicam satélites; (E e F) metáfases mitóticas, setas indicam satélites em pares distintos, e (H) cariótipo de *H. viridiflora*, com $2n=44$ cromossomos. Em D, E e F: barra = $10\mu\text{m}$; em G e H: barra = $1\mu\text{m}$.

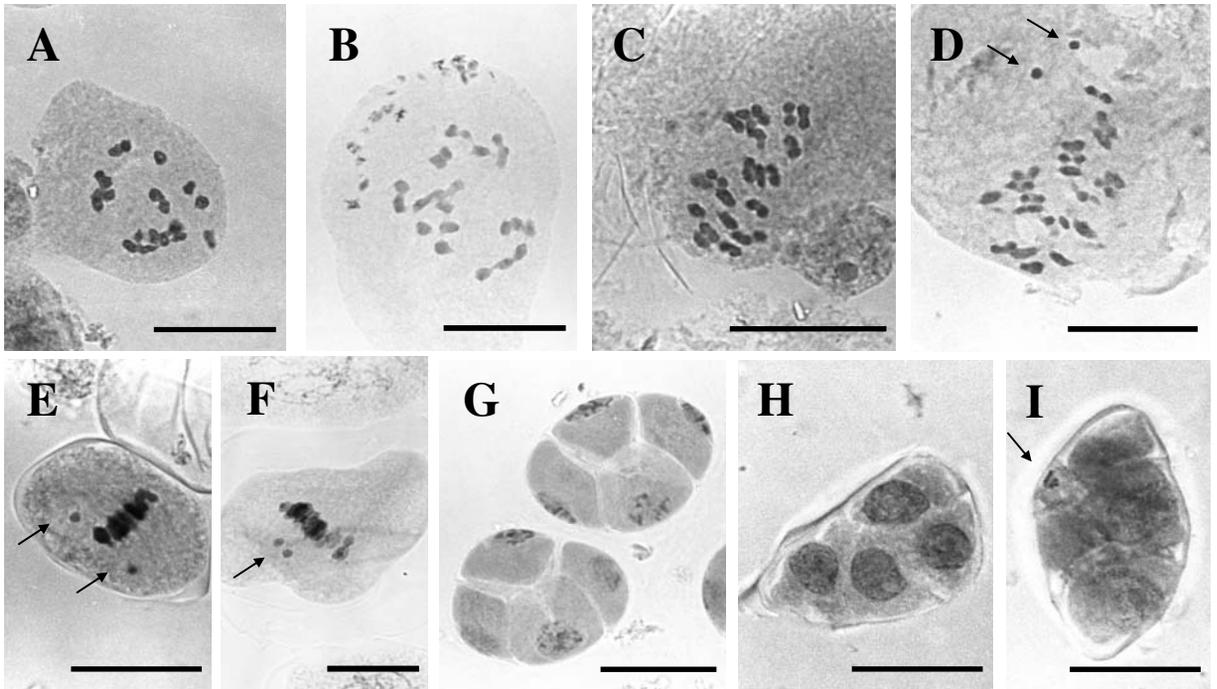


Figura 2 – *Hoffmannseggella bradei*, coletadas em Diamantina, (A, B, G e I) no morro do Cruzeiro e (C, D, E, F e H) no Caminho dos Escravos, mostrando em: (A, B e C) metáfases I com $n=20II$, (D) metáfase I com $n=21II$ (D e E) e migração adiantada de cromossomos (setas), (F) cromossomos fora da placa metafásica (seta), (G e H) tétrades normais, (I) tétrade anormal com um micrócito (seta). Barra = $10\mu\text{m}$.

6. CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE SETE ESPÉCIES DE *HOFFMANNSEGGELLA* H.G. JONES
POR BANDAMENTOS C E POR FLUOROCROMOS E HIBRIDAÇÃO *IN SITU* PARA A REGIÃO 45S
DE DNAR

6.1) RESUMO

Dentro da família Orchidaceae, composta por cerca de 25.000 espécies, o gênero *Hoffmannseggella* (antiga seção *Parviflorae* do gênero *Laelia* Lindl.) é composto por espécies rupícolas, endêmicas da Cadeia do Espinhaço/MG. Estudos sugerem uma evolução rápida para o gênero, com a transição do hábito epifítico para o rupícola, mudança de polinizadores e eventos de hibridização e poliploidia como os principais mecanismos evolutivos envolvidos na origem das espécies de *Hoffmannseggella*. Estudos cromossômicos prévios haviam sugerido o número básico de $x=20$ para o gênero, com espécies apresentando $2n=40$, 60 e 80 cromossomos, com alta incidência de poliplóides, aneussomatia nos tecidos radiculares em *H. briegeri* ($2n=80$) e *H. rupestris* ($2n=80$), ocorrência de citótipos em *H. rupestris* ($2n=40/80$) e anormalidades meióticas em várias espécies, com presença de monovalentes, disjunção adiantada de bivalentes e possíveis tetravalentes nas espécies poliplóides. Através dos procedimentos de bandamentos C, CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD foi possível observar grandes diferenças entre os cariótipos das espécies *H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegeri*, *H. caulescens*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*. Em geral, as espécies apresentaram muitas bandas C (predominantemente centroméricas e subteloméricas), poucas bandas CMA/DA⁺ (subteloméricas), e grande variação no número de bandas DAPI/AMD⁺ (predominantemente teloméricas). Apenas *H. bradei* apresentou somente duas bandas heterocromáticas, uma CMA/DA⁺ DA/DAPI e uma DAPI/AMD⁺. *H. rupestris* foi a única espécie estudada a apresentar bandas CMA/DA⁺ centroméricas e *H. briegeri* apresentou polimorfismo para bandas CMA/DA/DAPI. Com relação aos sítios 45S de DNAr, as espécies com $2n=40$ apresentaram dois sítios, enquanto as espécies com $2n=80$ apresentaram 4 sítios.

6.2) INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas conhecidas, possuindo cerca de 25.000 espécies, que representam cerca de 7% das fanerógamas existentes (PIJL & DODSON 1966). Na tribo Epidendreae, conforme apresentada por PABST & DUNGS (1975), a subtribo Laeliinae Bentham possui 1466 espécies, agrupadas em 43 gêneros, com espécies caracterizadas por plantas epifíticas ou terrestres, com caule delgado ou em pseudobulbos, folhas dísticas ou terminais, conduplicadas e usualmente articuladas, inflorescência, na maioria dos casos terminal. As flores podem ser grandes ou pequenas e muitas apresentam nectário em forma de cunículo (DRESSLER 1981). Nesta subtribo, PABST & DUNGS (1975), seguindo o sistema proposto por SCHLECHTER (1917) haviam posicionado o gênero *Laelia* Lindl., dividindo o mesmo em sete seções, sendo as seções *Laelia*, *Podolaelia* e *Calolaelia* ocorrentes no México e América Central, e as seções *Cattleyoides*, *Hadrolaelia*, *Microlaelia* e *Parviflorae* exclusivamente brasileiras (BARROS 1990). A seção *Parviflorae* era caracterizada por espécies, em sua maioria, rupícolas (VAN DEN BERG *et al.* 2000).

Análises moleculares recentes, utilizando as seqüências de DNA *ITS 1* e *ITS 2*, sugeriram que o gênero *Laelia* seria polifilético, e as espécies brasileiras, principalmente as da seção *Parviflorae*, deveriam ser incluídas e sinonimizadas sob o gênero *Sophronitis* Lindl. (VAN DEN BERG *et al.* 2000; VAN DEN BERG & CHASE 2000). Entretanto, no seqüenciamento das seqüências *ITS 1* e *ITS 2* foram obtidas poucas diferenças entre as espécies de *Laelia* da seção *Parviflorae* estudadas, de forma que os clados obtidos possuem uma sustentação baixa, além de haver várias politomias (VAN DEN BERG *et al.* 2000).

CHIRON & CASTRO NETO (2002) sugeriram, através de características morfológicas e ambientais, aliadas aos dados moleculares obtidos por VAN DEN BERG *et al.* (2000), que o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones deveria ser reconsiderado para acomodar as espécies rupícolas, já que este havia sido já criado por H.G.JONES (1968) para acomodar as espécies rupícolas do gênero

Laelia, sendo o gênero *Laelia* mantido apenas para as espécies epífitas mexicanas, das seções *Laelia*, *Podolaelia* e *Calolaelia*. Dessa forma, as espécies previamente circunscritas na seção *Parviflorae*, com exceção de *Laelia harpophylla*, *L. brevicaulis* e *L. kautskyi* (que juntas atualmente formam o gênero *Dungsia* Chiron & V.P.Castro), foram transferidas para o gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones. Entretanto, a situação taxonômica do gênero *Hoffmannseggella*, com aproximadamente 32 espécies, ainda está em discussão, e a delimitação das espécies dentro do gênero é complexa, devido à alta variabilidade intra-específica e ao aparecimento de indivíduos com características intermediárias entre espécies previamente aceitas (BARROS 1990).

Estudos sugerem que o gênero *Hoffmannseggella* teria surgido através de uma “explosão” evolutiva, com a penetração das espécies em uma nova área ecológica (os campos rupestres) e transição do hábito epifítico para o hábito rupícola. Paralelamente, teria ocorrido mudança de polinizadores, indicada pela diminuição no tamanho das flores e mudança no padrão de cores (BLUMENSCHNEIN 1960a; BRIEGER 1960, 1961, 1966), sugerindo inclusive que espécies deste gênero seriam ornitófilas, em contraste às espécies das outras seções que seriam melitófilas (DRESSLER 1981). Além desses fatores, a ampla troca de genes proporcionada eventos de hibridização e poliploidia sugerem que estes foram importantes no processo de evolução do grupo (BARROS 1990).

A origem por poliploidia e hibridação foi originalmente sugerida por BLUMENSCHNEIN (1960a), através de estudos cromossômicos, para as espécies *Hoffmannseggella mixta* (Hoehne) V.P.Castro & Chiron, *H. milleri* (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron, *H. crispata* (Thumb.) H.G.Jones e *H. caulescens* (Lindley) H.G.Jones. BLUMENSCHNEIN (1960b) chamou atenção ainda para a grande quantidade de poliplóides dentro do subgênero *Cyrtolaelia* (atual gênero *Hoffmannseggella*). De acordo com PABST & DUNGS (1975) existem oito híbridos naturais documentados dentro da antiga seção *Parviflorae*, incluindo inúmeros híbridos entre os gêneros *Laelia* e *Cattleya* Lindl. Pelo fato de ainda estarem ocorrendo eventos de hibridização entre as espécies de *Hoffmannseggella*, BARROS (1990) sugeriu que a “explosão” evolutiva da seção ainda

está em andamento. ANDERSON (1948) observou também que distúrbios no hábitat poderiam levar ao aumento na frequência de híbridos, através da quebra de barreiras reprodutivas pré-zigóticas, como a especificidade de polinizadores, considerada como a principal barreira reprodutiva inter-específica dentro da família Orchidaceae (DRESSLER 1981).

Em um estudo de cruzamentos artificiais inter-específicos entre os gêneros *Laelia sensu lato*, *Cattleya*, *Brassavola*, *Epidendrum*, *Schomburgkia* e *Sophranitis*, STORT (1984) obteve diversos híbridos com altas porcentagens de tétrades normais e ainda cruzamentos bem sucedidos entre os híbridos F₁.

Estudos citogenéticos na subtribo Laeliinae são extremamente escassos, sendo documentados, para o antigo gênero *Laelia*, os números cromossômicos de $2n=40$, $2n=60$ e $2n=80$, distribuídos atualmente entre 14 espécies de *Hoffmannseggella*, uma de *Dungsia*, duas de *Hadrolaelia* e uma de *Laelia* (Tabela 1). BLUMENSCHNEIN (1960b) ainda sugeriu o número básico de $x=20$ para *Laelia sensu lato*. Entretanto, dados cariotípicos como posição de centrômero, tamanho dos cromossomos e padrões de bandamento não são encontrados e, em algumas espécies, como *H. crispata*, *H. mixta* e *H. cinnabarina*, foram observadas anormalidades meióticas nos estudos de BLUMENSCHNEIN (1957).

Em estudo recente com espécies de *Hoffmannseggella* distribuídas na Cadeia do Espinhaço, COSTA (Cap. 1) confirmou o número básico de $x=20$ e observou diversas anomalias cromossômicas, como a presença de aneussomatia nos tecidos radiculares das espécies de origem poliplóide (*H. briergeri* e *H. rupestris*), e diversas anormalidades meióticas, como disjunção adiantada de bivalentes, presença de monovalentes, variação no número de bivalentes e monovalentes e possíveis tetravalentes nas espécies poliplóides. COSTA (Cap. 2) documentou também a provável evolução por aneuploidia da espécie *H. viridiflora* ($2n=44$) a partir de *H. bradei* ($2n=40$).

Tabela 1: Espécies de *Hoffmannseggella* (*H.*), *Dungsia*, *Hadrolaelia*, e *Laelia* documentadas por BLUMENSCHNEIN (1960b) e COSTA (Cap. 1, Cap. 2) quanto ao número cromossômico (2n),

ESPÉCIE	REFERÊNCIA	2N
<i>H. angereri</i> (Pabst) V.P. Castro & Chiron	Costa (Cap.1)	40
<i>H. bradei</i> (Pabst) V.P. Castro & Chiron	Costa (Cap. 2)	40
<i>H. briegeri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b), Costa (Cap. 1)	80
<i>H. caulescens</i> (Lindley) H.G.Jones	Blumenschein (1960b)	80
<i>H. cinnabarina</i> (Batem. ex Lindley) H.G.Jones	Blumenschein (1960b), Costa (Cap. 1)	40
<i>H. crispata</i> (Thunb.) H.G.Jones	Blumenschein (1960b), Costa (Cap. 1)	40
<i>H. esalqueana</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b)	40
<i>H. fournieri</i> (Cogniaux) V.P.Castro & Chiron	Costa (Cap. 1)	40
<i>H. liliputana</i> (Pabst) H.G.Jones	Costa (Cap. 1)	40
<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b)	40, 60, 80
<i>H. milleri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b)	40
<i>H. mixta</i> (Hoehne) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b)	40
<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b)	40
<i>H. rupestris</i> (Lindley) V.P.Castro & Chiron	Blumenschein (1960b), Costa (Cap. 1)	40, 80
<i>H. tereticaulis</i> (Hoehne) H.G.Jones	Blumenschein (1960b)	80
<i>H. viridiflora</i> Verola & Semir	Costa (Cap. 2)	44
<i>Dungsia harpophylla</i> (Rchb. f.) Chiron & V.P.Castro	Blumenschein (1960b)	40
<i>Hadrolaelia purpurata</i> (Lindley & Paxton) Chiron & V.P.Castro	Blumenschein (1960b)	40
<i>Hadrolaelia pumila</i> (Hooker) Chiron & V.P.Castro	Blumenschein (1960b)	40
<i>Laelia anceps</i> Lindl.	Blumenschein (1960b)	40

O estudo cariotípico, incluindo procedimentos como bandamentos C e com fluorocromos, além da hibridação *in situ*, tem indicado possíveis origens híbridas e detectado ocorrência de possíveis híbridos naturais em diversos grupos de plantas, como em *Clivia* (Amaryllidaceae)

(MURRAY *et al.* 2001) e *Dahlia* (Asteraceae) (MURRAY *et al.* 1999). Dentre as técnicas de bandamento, utiliza-se o bandamento C para identificar a quantidade e localização da heterocromatina constitutiva (SUMNER 1972) e coloração com fluorocromos para determinar a composição predominante de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4'-6 diamino-2 fenilindol) evidencia seqüências de DNA repetitivas compostas predominantemente por adenina e timina (A-T), enquanto o CMA (cromomicina A3) liga-se preferencialmente a regiões ricas em citosina e guanina (C-G). Utiliza-se, também, compostos não fluorescentes com afinidade para regiões ricas em A-T (distamicina A) e ricas em G-C (actinomicina D), como forma de melhoramento de contraste para observação das bandas CMA e DAPI, respectivamente (MOSCONE *et al.* 1996).

No estudo citológico feito por D'EMERICO *et al.* (1996a, 1996b) em *Orchis* (Orchidaceae), o uso das técnicas convencional, do bandamento C e bandamento por Hoechst 33258, confirmou, não só a origem híbrida da espécie *Orchis xgennarii*, como indicaram também que o gênero *Orchis* poderia ser subdividido em dois grupos distintos, baseados não somente na ocorrência de dois diferentes números diplóides dentro do gênero ($2n=32$ e $2n=36$), como também nas diferenças de simetria dos cariótipos e padrões de bandamentos C e Hoechst 33258.

A hibridação *in situ* é um método preciso para localizar seqüências de ácidos nucléicos (tanto DNA quanto RNA) no citoplasma, em organelas, cromossomos ou núcleo de material biológico (LEITCH *et al.* 1994). Esta metodologia e foi inicialmente desenvolvida por GALL & PARDUE (1970) e baseava-se na marcação das sondas com isótopos radioativos. Este tipo de marcação foi posteriormente substituído por outra que utiliza fluorocromos para sua detecção. Dentre as sondas mais utilizadas em citogenética vegetal destacam-se aquelas por genes de DNAr. Os genes de RNA ribossômico (RNAr), presentes como 18S-25S DNAr, compreendendo os genes 18S-5,8S-25S de RNAr e espaçadores intergênicos, e 5S DNAr com o gene 5S RNAr e espaçador, são encontrados universalmente em vegetais, com múltiplas cópias das seqüências codificadoras e espaçadores

intergênicos normalmente sendo localizados como poucos e discretos sítios cromossômicos (OSUJI *et al.* 1998). As seqüências 18, 5,8 e 25S de RNAr resultam da quebra de um único transcrito 45S descodificado por unidades repetidas de DNAr agrupadas em um sítio cromossômico particular, a região organizadora do nucléolo (NEVES *et al.* 2005). A hibridação *in situ* para a região 45S de DNAr tem sido utilizada em diversos grupos de plantas. Em um estudo realizado em *Vicia amoena* (Fabaceae), LI *et al.* (2001), através da análise por hibridação *in situ* dos sítios 45S e 5S de DNAr na tetraplóide *V. amoena* var. *amoena* e seus possíveis parentais diplóides (*V. amoena* var. *sericea*, *V. pseudorubus*, *V. dumetorum*, *V. pisiformis* e *V. cracca*), concluíram que a variedade não representava um autotetraplóide derivado de *V. amoena* var. *sericea*, mas sim um alotetraplóide. Através da hibridação *in situ* para 45S DNAr e 5S DNAr, TAGASHIRA & KONDO (2001) observaram que a evolução cromossômica em *Zamia* e *Ceratozamia mexicana*, com números cromossômicos $2n=16$, provavelmente se deu por inversão pericêntrica e translocação desigual.

Através da utilização conjunta dos bandamentos C e com fluorocromos, impregnação por prata e hibridação *in situ* para a sonda de 45S DNAr, RAN *et al.* (1999) identificaram e diferenciaram os cariótipos de quatro espécies de *Clivia* (Amaryllidaceae), os quais se apresentam extremamente similares através das técnicas de coloração convencional, com $2n=22$ cromossomos, sendo quatro pares metacêntricos e sete pares submetacêntricos.

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização cariotípica de sete espécies de *Hoffmannseggella* (*H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegeri*, *H. caulescens*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. rupestris*) através das técnicas de bandamento C, CMA/DA/DAPI, DAPI/AMD e hibridação *in situ* para a região 45S de DNAr, objetivando uma melhor diferenciação cariotípica entre as espécies e análise de possíveis padrões evolutivos dentro do gênero.

6.3) MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1) Espécies coletadas

Foram coletados meristemas radiculares e/ou botões florais e ovários imaturos das espécies do gênero *Hoffmannseggella* H.G.Jones listadas na Tabela 2, em populações com grande número de indivíduos. Foram coletados materiais testemunho das espécies e populações encontradas em estágio reprodutivo e depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). A identificação botânica foi feita por Christiano Franco Verola (doutorando do Curso de Pós Graduação em Ecologia/ UNICAMP).

A coleta de raízes para tratamento só foi possível no período em que as plantas encontravam-se em seu estado vegetativo. No período de floração poucas raízes novas foram encontradas. Neste período foram coletados apenas botões florais e ovários imaturos.

Além das espécies cujo material foi coletado diretamente no campo, foram coletados meristemas radiculares ou botões florais de exemplares existentes em casa de vegetação do Departamento de Genética/IB/UNICAMP (Tabela 2).

6.3.2) Pré-tratamento, fixação e armazenamento

Os meristemas radiculares foram coletados entre 6h e 9h da manhã, enquanto que botões florais e ovários imaturos foram coletados tanto no período da manhã quanto da tarde. Os meristemas radiculares e os ovários imaturos foram pré-tratados em 8-Hidroxiquinoleína (8-Hq) 0,002M por 24h a 4°C. As raízes, os ovários imaturos e os botões florais foram fixados em solução Carnoy contendo etanol, ácido acético glacial e clorofórmio (6:3:1), por no mínimo 24h, à temperatura ambiente, e armazenados em freezer.

6.3.3) Bandamento C

O procedimento para o bandamento C seguiu o protocolo de SCHWARZACHER *et al.* (1980) e MOSCONE *et al.* (1993). As raízes e os ovários foram digeridos em solução enzimática, contendo celulase (4%) e pectinase (40%), por 3h a 37 °C, e posteriormente esmagados em uma gota de ácido acético, entre lâmina e lamínula. A lamínula foi retirada após congelamento em nitrogênio líquido. As lâminas foram envelhecidas por pelo menos um dia antes de sua utilização no bandamento. Para a hidrólise, as lâminas foram mergulhadas em ácido acético 45% em banho-maria pré-aquecido a 60 °C, durante 20 min., lavadas em água corrente por 15min. Posteriormente, foram mergulhadas em solução saturada de hidróxido de bário à temperatura ambiente, durante 10 minutos. As lâminas foram então lavadas novamente por 15-30 min em água corrente, lavadas depois rapidamente em água destilada, transferidas para um recipiente com solução de 2xSSC, pré-aquecido a 60 °C em banho Maria, durante 80 minutos, novamente lavadas em água corrente por 15 min., rapidamente em água destilada, e coradas com Giemsa 5%, por aproximadamente 5 min. A montagem das lâminas depois de secas foi feita também em resina (Entellan ou Allklan).

6.3.4) Bandamento fluorescente

a) Tripla coloração CMA/DA/DAPI

Para o bandamento CMA/DA/DAPI seguiu-se o protocolo de SCHWEIZER(1980), SCHWEIZER & AMBROS (1994) e MOSCONE *et al.* (1996). As lâminas foram preparadas mediante digestão das pontas de raízes e ovários com solução enzimática seguida de esmagamento, e envelhecidas por pelo menos três dias. Foram adicionadas às lâminas algumas gotas da solução de CMA (cromomicina A3) 0,5 mg/ml que foram cobertas com lamínula e deixadas corando por 60 min. no escuro. As lâminas foram lavadas rapidamente com água destilada apenas para remover a lamínula, secas e então foi adicionada a solução de DA (distamicina A), 0,1 mg/ml. As lâminas foram novamente

cobertas com lamínula e deixadas corando por 15-30 min. Após rápida lavagem, foi adicionada a solução do fluorocromo DAPI (4'-6 diamidino-2 fenilindol) 2 mg/ml por 30 minutos. Após nova lavagem as lâminas foram montadas em meio de montagem contendo glicerol diluído em solução tampão McIlvaine (1:1) e $MgCl_2$ 2,5 M. Estas lâminas foram mantidas na estufa a 37 °C por 3-5 dias e armazenadas, no escuro, a 4 °C. As células foram então fotografadas em microscópio de fluorescência, utilizando filme colorido Pro Image ISO 100, ou utilizando câmera digital refrigerada Evolution MP 5,0 Mp e programa de captura de imagens Image Pro-Plus 4.0.

b) Dupla coloração DAPI/AMD

A contracoloração de DAPI com actinomicina D (AMD) seguiu o protocolo de SCHWEIZER & AMBROS (1994) e MOSCONE *et al.* (1996). As lâminas foram cobertas com solução de AMD (0,2 mg de actinomicina D, diluída em 1ml de tampão fosfato de sódio pH 7 contendo 1mM de EDTA), cobertas com lamínula e deixadas corando por 15-20 min. As lâminas foram rapidamente lavadas com água destilada, secas e foi então colocada a solução DAPI seguindo os mesmos procedimentos de coloração DAPI e montagem das lâminas da tripla coloração.

c) Coloração seqüencial

Para coloração seqüencial, ou seja, utilização de uma mesma lâmina para realização de diferentes técnicas de bandamento (CMA/DA/DAPI seguida por DAPI/AMD e bandamento C), foi realizado o seguinte procedimento, seguindo o protocolo de SCHWEIZER (1981), SCHWARZACHER & SCHWEIZER (1982), BERG & GREILHUBER (1992) e MOSCONE *et al.* (1996):

1. Para remoção das lamínulas, as lâminas foram prensadas levemente com papel macio para remover o excesso de óleo de imersão. Então, as lâminas foram imersas em xilol por 30 seg. para remover os traços de óleo de imersão. Depois de secas, elas foram imersas em água destilada até que a lamínula se soltasse, lavadas rapidamente com água destilada e secas.

2. Para a descoloração do material, as lâminas foram imersas em solução 3:1 de etanol/ ácido acético glacial e mantidas "overnight" a 4 °C, e depois lavadas em etanol absoluto por 2-3 min. As lâminas foram secas e então submetidas a nova coloração.

6.3.5) Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (LEITCH *et al.*, 1994)

A) *Preparação da sonda:*

Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de cerca de 12 kb contendo 25S-5,8S-18S com seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídeo pUC em *E. coli*, resistente a ampicilina. O plasmídeo foi separado pela técnica da miniprep e a concentração medida em um fluorômetro. A marcação foi feita por "nick translation" (Bionick Gibco) com biotina-14-dUTP.

B) *Tratamento da lâmina e HIS:*

Para a hibridação *in situ*, as lâminas foram preparadas com digestão enzimática e armazenadas em freezer. Antes de iniciar a hibridação as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase : 99 2xSSC), a 37 °C por 1h. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 min no agitador e depois mergulhadas em Paraformaldeído 4%, à temperatura ambiente, por mais 10 min. Depois de lavadas novamente em 2xSSC, as lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas estarem secas, foi acrescentada a mistura de hibridação, preparada enquanto as lâminas secavam. A mistura de hibridação contém formamida 100%, dextran sulfato 50%, 20xSSC, sonda (40 ng μl^{-1}), DNA de bloqueio, SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridação nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, alternando as temperaturas de 90 °C por 10 min e depois a 45°C por mais 10 min e finalmente a 37 °C. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37 °C, em câmara úmida e no escuro, por toda a noite.

C) *Banhos pós-hibridação:*

Em seguida, foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42 °C por 5 min, depois formamida 20% (20 ml de formamida para 80 ml de 0,1xSSC) a 42 °C por 10 min. O terceiro banho foi feito em 0,1xSSC a 42 °C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42 °C por 5 min. Depois, foram feitos um banho com 4xSSC 0,2% tween a 42 °C, e outro com 4xSSC 0,2% tween à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos em agitador.

D) *Detecção da hibridação:*

Para a detecção da hibridação, com as lâminas ainda molhadas, pingou-se 100 µl de BSA 5% por 5 min. Depois foi eliminado o excesso batendo a lâmina sobre um papel absorvente e foram acrescentados 50 µl da solução de detecção (avidina-FITC 1:100 BSA 5%). As lâminas foram colocadas em estufa a 37 °C por 1h. Após duas lavagens com 4xSSC 0,2% tween por 10 min., as lâminas foram montadas utilizando 25 ml de solução de iodeto de propídio (25 ml de antifading - Vectashield 1:1 glicerol - e 1 ml de iodeto de propídio – 50 mg/ml).

Para melhor visualização das bandas C, CMA/DA⁺ e DAPI/AMD⁺ e por não ser possível realizar as medidas cromossômicas nas espécies estudadas, os cromossomos foram classificados em 11 tipos diferentes de cromossomos metacêntricos, conforme apresentado na Figura 1. Após a identificação de todos os tipos cromossômicos encontrados, os pares cromossômicos foram organizados em fórmulas cariotípicas. Cromossomos sem um homólogo foram arranjados como pares heteromórficos e representados por dois tipos cromossômicos, enquanto pares homomórficos foram representados por tipos únicos de cromossomos.

6.4) RESULTADOS

Foram obtidos dados de bandamentos C, CMA/DA/DAPI, DAPI/AMD e hibridação *in situ* para seis espécies de *Hoffmannseggella* (Tabela 2), e apenas dados de bandamento CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD para uma espécie, *H. caulescens* (Tabela 2). Com exceção de *H. bradei*, as espécies em geral apresentaram grande número de bandas C, sendo a maioria delas centroméricas. Foram observadas também várias bandas subteloméricas e algumas bandas intercalares, porém as últimas foram vistas, quando presentes, sempre em apenas um par cromossômico. O número de bandas CMA/DA⁺ observado variou de apenas uma em *H. bradei* até 18 em *H. rupestris*. As bandas CMA/DA⁺ foram observadas sempre na região subtelomérica dos cromossomos, à exceção de *H. rupestris* que apresentou bandas CMA/DA⁺ centroméricas. Apenas *H. briegei* teve material proveniente de duas populações diferentes analisado para bandamento CMA/DA/DAPI, e apresentou diferenças no número de bandas CMA/DA⁺ entre as diferentes populações, entretanto tal diferença não foi observada com relação às bandas C. Por limitações na quantidade de material disponível para os estudos não foi possível realizar o restante dos bandamentos e hibridação *in situ* em uma das populações para confirmar o polimorfismo. O número de bandas DAPI/AMD⁺ variou de uma, em *H. bradei*, a 88, em *H. caulescens*. Diferentemente das bandas C, a grande maioria das bandas DAPI/AMD⁺ foi observada na região subtelomérica dos cromossomos, algumas na região centromérica e poucas intercalares. O número de sítios 45S de DNAr observado foi bastante reduzido, sendo observados dois sítios nas espécies com 2n=40 cromossomos (*H. angereri*, *H. bradei*, *H. fourneri*, *H. liliputana*) e quatro sítios, dois amplificados e dois reduzidos, nas espécies de origem poliplóide, com 2n=80 cromossomos (*H. briegei* e *H. rupestris*).

Espécie	Número	2n	C	Fórmula	CMA/DA/DAPI	Fórmula	DAPI/AMD	Fórmula	45S DNAr
<i>H. angereri</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron*	CL27	40	63	1A + 3B + 5C + 2D + 6E + 1F + 1G + 1AG	7CMA/DA ⁺ DA/DAPI ^o 4CMA/DA ^o DA/DAPI ⁺	16A + 3B + 1AB	4 DAPI/AMD ⁺	17A + 2J + 1AK	2
<i>H. bradei</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	J.Y.C. 03/031	40	2	19A + 1B	1CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺	19A + 1AB	1 DAPI/AMD ⁺	19A + 1AB	2
<i>H. briegeri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron*	CL09	80	110	3A + 10B + 11C + 3D + 10E + 2G + 1H	2CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺ 2CMA/DA ⁺ DA/DAPI ^o	38A + 2B	14DAPI/AMD ⁺	34A + 2B + 1C + 1D + 2I	4
	C.F.V 0056	80	110		3CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺ 7CMA/DA ⁺ DA/DAPI ^o	35A + 5B			
<i>H. caulescens</i> (Lindl.) H.G.Jones*	C.F.V. 0044	80			2CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺ 2CMA/DA ⁺ DA/DAPI ^o	38A + 2B	88 DAPI/AMD ⁺	11A + 12B + 4C + 9D + 2E + 2G	
	J.Y.C. 03/052	40	50	3A + 4B + 7C + 4E + 2G	2CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺ 2CMA/DA ⁺ DA/DAPI ^o	18A + 2B	74 DAPI/AMD ⁺	1A + 1B + 18D	2
<i>H. liliputana</i> (Pabst) H.G.Jones	J.Y.C. 03/059	40	56	1A + 2B + 7C + 1D + 8E + 1I					2
		60			3CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺	28A + 1B + 1AB	19DAPI/AMD ⁺	22A + 5B + 1G + 1J + 1AB	
<i>H. rupestris</i> (Lindley) V.P.Castro & Chiron	J.Y.C. 03/020	80	118	2A + 4B + 15C + 15E + 3G + 1H					
	J.Y.C. 03/043	80			3CMA/DA ⁺ DA/DAPI ⁺ 15CMA/DA ⁺ DA/DAPI ^o 7DA/DAPI ⁺ CMA/DA ^o	31A + 2B + 5C + 1K + 1KB	7DAPI/AMD ⁺	36A + 3B + 1AB	4

Tabela 2: Espécies de *Hoffmannseggella* analisadas quanto ao número cromossômico mitótico (2n) (COSTA, Cap. 1), número de bandas C (C), bandas CMA/DA/DAPI, bandas DAPI/AMD, fórmulas cariotípicas para cada bandamento (Fórmula) e número de sítios de 45S DNAr. * - Espécies que tiveram seu material coletado a partir de exemplares mantidos em casa de vegetação.

6.4.1) *Hoffmannseggella angereri*

H. angereri apresentou 63 bandas C (Tabela 2), sendo 34 subteloméricas, 27 centroméricas e duas intercalares (Fig. 2a), sendo a fórmula cariotípica de $1A + 3B + 5C + 2D + 6E + 1F + 1G + 1AG$, com heteromorfismo de bandas (1AG), e também foi a única espécie que apresentou o tipo F de cromossomo. Apresentou, também, heteromorfismo com relação às bandas CMA/DA, aparecendo sete bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI^o (Fig. 2b e 2c). A fórmula cariotípica obtida foi de $16A + 3B + 1AB$. Através da coloração DAPI/AMD a espécie apresentou a fórmula $17A + 2J + 1AK$. Foram observados quatro cromossomos muito fortemente corados com DAPI (tipo J), sendo provavelmente por completo, ou quase por completo DAPI/AMD⁺, e mais um segmento similar a um satélite (Figs. 2d e 2e), também DAPI/AMD⁺, que representou o tipo K de cromossomo também exclusivo desta espécie. *H. angereri* apresentou dois sítios de hibridação para a região 45S de DNAr (Fig. 2f).

6.4.2) *Hoffmannseggella bradei*

Indivíduos da população do Morro do Cruzeiro, Diamantina, apresentaram duas bandas C (Tabela 2), amplificadas (Fig. 2g), subteloméricas, provavelmente correspondentes às constrições secundárias, sob a fórmula $19A + 1B$. Nos bandamentos CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD, foram visíveis apenas uma banda CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻ (Figs. 2h e 2i), na fórmula $19A + 1AB$, e uma DAPI/AMD⁺ (Fig. 2j), também na fórmula $19A + 1AB$, representando um heteromorfismo cromossômico. *H. bradei* apresentou dois sítios de hibridação para 45S DNAr (Fig. 2k).

6.4.3) *Hoffmannseggella briegeri*

Nas populações de Datas e de Serro/MG, a espécie apresentou 110 bandas C (60 subteloméricas, 48 centroméricas e 2 intercalares) (Figs. 3a e 3i), sob a fórmula cariotípica $3A +$

10B + 11C + 3D + 10E + 2G + 1H. A espécie apresentou polimorfismo para bandas CMA/DA/DAPI. Na população de Datas/MG, foram observadas duas bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻ subtelo méricas e duas bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI^o também subtelo méricas (Figs. 3b, 3c, 3d e 3e), com a fórmula 38A + 2B para bandas CMA/DA⁺. Através da coloração dupla foram observadas 14 bandas DAPI/AMD⁺ (Figs. 3f e 3g), ocorrentes segundo a fórmula 34A + 2B + 1C + 1D + 2I. Na população de Serro, a espécie apresentou 3 bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻ e 7 bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI^o, todas subtelo méricas (Figs. 3i e 3j), com a fórmula 35A + 5B para bandas CMA/DA⁺. Através do procedimento de hibridação *in situ* para 45S DNAr foram observados 4 sítios, dois amplificados e dois de tamanho reduzido (Fig. 3k) na população de Datas/MG.

6.4.4) *Hoffmannseggella caulescens*

A espécie apresentou 2n=80 cromossomos e foram visualizadas, na tripla coloração com fluorocromos CMA/DA/DAPI, duas bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻ e duas bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI^o, sempre subtelo méricas (Figs. 4a e 4b), sob a fórmula 38A + 2B. Na dupla coloração DAPI/AMD foram observadas 88 bandas DAPI/AMD⁺ (Figs. 4c), distribuídas na fórmula 11A + 12B + 4C + 9D + 2E + 2G, sendo o tipo cromossômico E para bandas DAPI/AMD⁺ observados apenas nesta espécie.

6.4.5) *Hoffmannseggella fournieri*

A espécie *H. fournieri*, proveniente da Serra do Itatiaia em Ouro Preto/MG, apresentou 50 bandas C (24 subtelo méricas e 26 centroméricas), observadas sob a fórmula 3A + 4B + 7C + 4E + 2G (Fig. 4d). Através da tripla coloração CMA/DA/DAPI, foram visualizadas duas bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻ e duas CMA/DA⁺ DA/DAPI^o, subtelo méricas (Figs 4e e 4f), com a fórmula 18A + 2B. Com a dupla coloração DAPI/AMD, foram observadas 74 bandas DAPI/AMD⁺ (Figs. 4g

e 4h), na fórmula 1A + 1B + 18D. *H. fournieri* apresentou apenas dois sítios de hibridação para a sonda 45S de DNAr (Fig. 4i).

6.4.6) *Hoffmannseggella liliputana*

Durante os procedimentos de coloração com fluorocromos foi constatada a ocorrência de indivíduos com $2n=60$ cromossomos, além dos indivíduos com $2n=40$, observados através da coloração de Giemsa (COSTA Cap. 1), bandamento C e hibridação *in situ* para a região 45S de DNAr. Nas células observadas com $2n=40$ cromossomos, foram visualizadas 56 bandas C (24 subteloméricas, 30 centroméricas e 2 intercalares) (Fig. 4j), obtendo-se a fórmula 1A + 2B + 7C + 1D + 8E + 1I. O tipo cromossômico I para bandamento C foi observado somente nesta espécie. Nas células com $2n=60$ cromossomos foram observadas três bandas CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻ subteloméricas (Figs. 4k e 4l), na fórmula 28A + 1B + 1AB, e 19 bandas DAPI/AMD⁺ (Fig. 4m), sob a fórmula 22A + 5B + 1G + 1J + 1AB. Os indivíduos com $2n=60$ cromossomos apresentaram heteromorfismo tanto para bandas CMA/DA⁺ quanto DAPI/AMD⁺. Células com $2n=40$ cromossomos também apresentaram apenas dois sítios de hibridação para a sonda 45S de DNAr (Fig. 4n).

6.4.7) *Hoffmannseggella rupestris*

Indivíduos da população de Biribiri, em Diamantina, apresentaram 118 bandas C (50 subteloméricas, 66 centroméricas e 2 intercalares) (Fig. 5a), sendo observada a fórmula cariotípica 2A + 4B + 15C + 15E + 3G + 1H. O bandamento CMA/DA/DAPI realizado na população do Caminho dos Escravos em Diamantina/MG demonstrou haver cerca de 18 bandas CMA/DA⁺ (Fig. 5b), sob a fórmula 31A + 2B + 5C + 1K + 1KB, sendo apenas 3 CMA/DA⁺ DA/DAPI⁻, localizadas aparentemente em constrições secundárias, indicando heteromorfismo cromossômico. As outras 15

bandas são vistas como “dots” CMA/DA⁺ DA/DAPI^o, sendo cinco delas subteloméricas e 10 visualizadas na região centromérica dos cromossomos. Foram observadas também sete bandas CMA/DA^o DA/DAPI⁺ (Fig. 5c), sempre terminais. As sete bandas DA/DAPI⁺ foram confirmadas através do bandamento DAPI/AMD⁺ (Fig. 5d), que apresentou a fórmula 36A + 3B + 1AB, havendo um par de cromossomos heteromórficos para bandas DA/DAPI⁺. *H. rupestris* apresentou quatro sítios de hibridação para a região 45S de DNAr, dois bem visíveis, amplificados, e dois menores (Fig. 5e).

6.5) DISCUSSÃO

A análise do padrão de bandas C, CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD foi bastante útil na diferenciação cariotípica das espécies do gênero *Hoffmannseggella* estudadas no presente trabalho. Apesar do número reduzido de espécies analisadas, pode-se observar que, mesmo quando apresentam o mesmo número cromossômico, as espécies possuem padrões de bandamento distintos, ou seja, possuem diferentes arranjos cromossômicos em relação às regiões de heterocromatina constitutiva (bandas C) e seqüências repetitivas ricas em A-T (bandamento DAPI/AMD) e C-G (bandamento CMA/DA/DAPI).

Apesar das diferenças específicas encontradas, o gênero apresentou um padrão geral de bandas heterocromáticas, apresentando grande número de bandas, predominantemente centroméricas, com exceção de *H. bradei*, que será discutida posteriormente. A predominância de bandas heterocromáticas na região do centrômero foi observada em diversos grupos de plantas, como *Capsicum* (Solanaceae) (MOSCONE *et al.* 1993) e alguns grupos de orquídeas, como na subtribo Limodorinae (D'EMERICO *et al.* 1999), no gênero *Dactylorhiza* (D'EMERICO *et al.* 2002) e na espécie *Psycmorchis pusilla* (FÉLIX & GUERRA 1999). Tanto em plantas como em animais, o centrômero está geralmente associado a blocos de heterocromatina contendo famílias de DNA satélite altamente repetitivas em tandem e componentes de retroelementos (HESLOP-HARRISON *et al.* 2003, JIANG *et al.* 2003) e algumas das seqüências repetitivas centroméricas foram recentemente identificadas como componentes essenciais do centrômero funcional (SHARMA & RAINA 2005). NAGAKI *et al.* (2003) identificaram uma família de DNA satélite centromérica altamente repetitiva, de 180 pb, em *Arabidopsis thaliana* (Leguminoseae) como sendo o componente chave do complexo centrômero/cinetócoro.

Além da grande quantidade de bandas heterocromáticas centroméricas, o gênero *Hoffmannseggella* apresentou também grande quantidade de bandas C subtroméricas. Existem diversas famílias de DNA satélite relacionadas às regiões intercalares e subtroméricas dos

cromossomos de plantas (SHARMA & RAINA 2005). Famílias de DNA altamente repetitivo foram identificadas como componentes das seqüências associadas aos telômeros (TASs) em diversos grupos de plantas. Diferentes tipos de estrutura de cromatina estão justapostas nas regiões TAS. Estas regiões provavelmente funcionam como zona controladora entre os telômeros e domínios cromossômicos internos. Elas desempenham papel protetor no caso de perda de telômero e podem estar envolvidas na regulação da atividade de genes subteloméricos (SYKOROVA *et al.* 2003).

É interessante observar que as espécies de *Hoffmannseggella* que apresentaram maior número de bandas C foram as espécies poliplóides (*H. rupestris* e *H. briegei*), com $2n=80$ cromossomos. Nelas, o número de bandas observado é praticamente o dobro do número de bandas observado nas espécies diplóides (*H. angereri*, *H. fournieri* e *H. liliputana*), podendo-se concluir que o aumento na ploidia provavelmente não foi acompanhado por aumento ou redução significativas no número de regiões de heterocromatina constitutiva em cada cromossomo. Depois das poliplóides *H. rupestris* e *H. briegei*, a espécie que apresentou maior número de bandas C foi *H. angereri*, seguida por *H. liliputana*, *H. fournieri* e, em último, *H. bradei*. Em seu trabalho com o gênero *Capsicum*, MOSCONE *et al.* (1993) observaram uma correspondência entre o aumento no número de bandas heterocromáticas e o caráter derivado das espécies. Dessa forma, seria possível que *H. bradei* representasse uma linhagem ancestral com relação às outras espécies, que seriam derivadas. Isto poderia explicar a grande diferença no número de bandas apresentadas por *H. bradei*, entretanto seriam necessários outros estudos, desde morfológicos até mesmo genéticos - como foi o caso de *Capsicum*, no qual os dados cromossômicos foram comparados a dados de isozima (MOSCONE *et al.* 1993) - para que se pudesse confirmar essa hipótese. Comparando apenas as bandas heterocromáticas subteloméricas, foi possível observar que as espécies seguem a mesma ordem, em número de bandas, que a apresentada quando comparados os números totais, ou seja, incluindo as bandas centroméricas e intercalares. Entretanto, foi interessante observar que *H. fournieri* e *H. liliputana* ($2n=40$) apresentaram o mesmo número de bandas subteloméricas (24),

porém estas estão distribuídas de maneira diversa nos cromossomos. Ambas as espécies são, dentre as espécies amostradas, as únicas que ocorrem fora da região de Diamantina, e ocorrem próximas entre si, na região de Ouro Preto/MG. Através da análise das bandas heterocromáticas, poder-se-ia especular que estas espécies seriam proximamente relacionadas entre si, e que os rearranjos cromossômicos envolvendo as regiões subteloméricas de heterocromatina constitutiva teriam sido importantes fatores na diferenciação destas espécies.

Com relação aos bandamentos por fluorocromos, as espécies em geral apresentaram poucas bandas CMA/DA⁺, variando de uma, observada em *H. bradei*, a 18 bandas, observadas em *H. rupestris*. Com exceção de *H. rupestris*, as regiões ricas em C-G foram observadas sempre nas regiões subteloméricas dos cromossomos. Curiosamente, o número de bandas CMA/DA⁺ parece não estar correlacionado à ploidia, com exceção de *H. liliputana*, na qual indivíduos triplóides, com 2n=60 cromossomos, apresentaram três bandas CMA/DA⁺. Regiões coradas positivamente com CMA, ou seja, ricas em C-G, geralmente estão associadas à região organizadora do nucléolo (RON) (RAN *et al.* 1999, GUERRA 2000). Em geral, para as espécies de *Hoffmannseggella* estudadas no presente trabalho, é provável que algumas das regiões CMA/DA⁺ representem sítios 45S de DNAr, entretanto, como o número de bandas CMA/DA⁺ é maior que o de sítios 45S de DNAr, parece haver regiões repetitivas em C-G não relacionadas às RONS. Assim como observado através do bandamento C, *H. bradei* é a única exceção, na qual existem mais sítios para 45S de DNAr (dois) que bandas CMA/DA⁺ (uma). Com relação à localização das regiões ricas em C-G, *H. rupestris* foi a única a apresentar bandas na região centromérica, possivelmente derivadas por eventos de inversão cromossômica.

H. briegei, a única espécie que teve duas diferentes populações analisadas através dos bandamentos C e CMA/DA/DAPI, apresentou diferente número de bandas CMA/DA⁺ para cada população, porém não apresentou diferenças com relação ao número de bandas heterocromáticas. Seria importante que todos os procedimentos pudessem ser realizados em ambas as populações,

porém não houve material disponível. Como não houve repetição do polimorfismo no procedimento de bandamento C, seria possível que o polimorfismo encontrado fosse mais individual que populacional, sendo necessária uma coleta mais criteriosa para confirmar estes dados.

Dentre os procedimentos de bandamento, a coloração com fluorocromos DAPI/AMD foi uma das que evidenciou mais diferenças entre as espécies estudadas, o que foi surpreendente já que bandas DAPI⁺ costumam ser menos freqüentes em plantas, havendo espécies que nem apresentam este tipo de bandas (DAVIES *et al.* 1997, FORNI-MARTINS & GUERRA 1999, GUERRA 2000, VANZELA & GUERRA 2000). O número de bandas DAPI/AMD⁺ variou desde uma única banda, em *H. bradei*, até 88, em *H. caulescens*. Em todas as espécies estudadas, a grande maioria das regiões ricas em A-T foi observada nas regiões subteloméricas dos cromossomos. Da mesma forma que já citado para as regiões heterocromáticas, seqüências de DNA satélite ricas em A-T podem representar seqüências associadas aos telômeros (TASs), como foi observado em *Silene latifolia* (Caryophyllaceae) e tabaco (Solanaceae) (SHARMA & RAINA 2005). Chama a atenção também a presença, em *H. angereri* e *H. liliputana*, de cromossomos inteiramente corados positivamente com DAPI/AMD. Interessante que estes cromossomos não foram corados positivamente através do procedimento de bandamento C. De acordo com GUERRA (2000), as bandas observadas com fluorocromos são geralmente coradas positivamente após o bandamento C, mas em algumas espécies um número pequeno de bandas fluorescentes foi observado em locais não detectados através do bandamento C, como em *Aconitum sanyoense* (Ranunculaceae) (OKADA 1991) e *Cestrum fasciculatum* (Solanaceae) (BERG & GREILHUBER 1993). Além de quatro cromossomos, *H. angereri* apresentou ainda um segmento, similar a um satélite cromossômico, DAPI/AMD⁺. É possível que estes cromossomos não sejam inteiramente ricos em A-T, porém sejam predominantemente formados por seqüências de DNA repetitivo ricas em A-T. Estes cromossomos poderiam futuramente se comportar como cromossomos supranumerários, tendo em vista que são tipicamente compostos por seqüências de DNA repetitivo (CAMACHO *et al.* 2000). Além disso, a visão mais aceita para a

origem dos cromossomos B é de que eles são originados dos cromossomos A, a partir de fragmentos cêntricos de fusões dos cromossomos A ou de um cromossomo A fragmentado (CAMACHO *et al.* 2000).

Outro dado interessante que pôde ser observado através do bandamento DAPI/AMD, em *H. liliputana*, foi a impossibilidade de arranjar os cromossomos em conjuntos trissômicos. O número cromossômico triplóide dos indivíduos analisados ($2n=60$), juntamente com a observação de 3 bandas CMA/DA⁺, pareceu indicar uma origem autopoliplóide. Entretanto, ao analisar os dados de bandas DAPI/AMD⁺, não foram observados conjuntos trissômicos, e a fórmula foi elaborada por pares cromossômicos. Dessa forma, é possível que esses indivíduos tenham origem alopoliplóide, ou, caso tenham origem autopoliplóide, tenham sofrido rearranjos cromossômicos nas regiões que envolvem as regiões repetitivas em A-T.

Apesar da grande variação observada através das técnicas de bandamento, o gênero *Hoffmannseggella* apresentou-se bastante estável com relação aos sítios de 45S DNAr. As espécies com $2n=40$ cromossomos apresentaram apenas dois sítios, enquanto as espécies com $2n=80$ cromossomos apresentaram 4 sítios.

As espécies de *Hoffmannseggella* estudadas apresentaram grandes diferenças nos padrões de bandas C, CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD, ao contrário do observado através da hibridação *in situ*. Através dos padrões de bandas C e por fluorocromos foi possível diferenciar os cariótipos e até mesmo sugerir proximidade entre algumas espécies, como foi o caso de *H. furnieri* e *H. liliputana*, assim como propor a ancestralidade de *H. bradei* com relação às outras espécies. Pode-se sugerir também, que rearranjos cromossômicos, envolvendo regiões de heterocromatina constitutiva e de DNA repetitivo, principalmente seqüências ricas em A-T teriam sido fatores importantes na diferenciação das espécies. É importante reforçar que seria fundamental uma série de outros estudos assim como a aplicação destas técnicas em várias outras espécies, para que se pudesse confirmar os padrões evolutivos aqui propostos.

6.6) BIBLIOGRAFIA

ANDERSON E. **1948**. Hybridization of the habitat. *Evolution* **2**: 1-9.

BARROS F. DE. **1990**. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta bot. bras.* **4 (1)**: 177-187.

BERG C., GREILHUBER J. **1992**. Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome* **35**: 921-930.

_____, GREILHUBER J. **1993**. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum*, e *C. elegans*. *Plant Systematics and Evolution* **185**: 133-151.

BLUMENSCHNEIN A. **1957**. Estudos citológicos na família Orchidaceae. *Tese de Doutorado*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____. **1960a**. Estudo sobre a evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae). *Tese de Livre Docência*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____. **1960b**. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética/ ESALQ/ USP* **1**: 45-50.

BRIEGER F.G. **1960**. Contribuições para a taxonomia das orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética/ ESALQ/ USP* **1**: 1-31.

_____. **1961**. A evolução filogenética nos trópicos. In: Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (F. G. BRIEGER *et al.* (coords.)). *Atas do Primeiro Simpósio Sul Americano de Genética* 154-161.

_____. **1966**. Evolução filogenética, com referência especial às plantas superiores. In: *Elementos de Genética* (C. PAVAN & A. B. DA CUNHA (coords)). Companhia Editora Nacional & Universidade de São Paulo. Pp. 464-515.

CAMACHO J.P.M., SHARBEL T.F., BEUKEBOOM L.W. **2000**. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **355**: 163-178.

- CHIRON G.R. & CASTRO NETO V.P. **2002**. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindl. *Richardiana* **11 (1)**: 4-28.
- DAVIES B.J., O'BRIEN I.E.W., MURRAY B.G. **1997**. Karyotypes, chromosome bands and genome size variation in New Zealand endemic gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution* **208**: 169-185.
- D'EMERICO S., BIANCO P. AND PIGNONE D. **1996a**. Cytomorphological characterization of diploid and triploid individuals of *Orchis X gennarii* Reichenb. fil. (Orchidaceae). *Caryologia* **49 (2)**: 153-161.
- _____, PIGNONE D., BIANCO P. **1996b**. Karyomorphological analysis and heterochromatin characteristics disclose phyletic relationships among $2n=32$ and $2n=36$ species of *Orchis* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **200 (1-2)**: 111-124.
- _____, GRÜNANGER P., SCRUGLI A., PIGNONE D. **1999**. Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe *Limodorinae* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **217**: 147-161.
- _____, COZZOLINO S., PELLEGRINO G., PIGNONE D., SCRUGLI A. **2002**. Karyotype structure, supernumerary chromosomes and heterochromatin distribution suggest a pathway of karyotype evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **138**: 85-91.
- DRESSLER R.L. **1981**. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- FÉLIX L.P., GUERRA M. **1999**. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressler: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. *Caryologia* **52**: 165-168.
- FORNI-MARTINS ER. & GUERRA M. **1999**. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species. *Caryologia* **52 (1-2)**: 97-103.

- GALL J.C., PARDUE M.L. **1970**. Nucleic acid hybridisation in cytological preparations. In: *Methods in Enzymology* (L. Grossman and K. Moldave eds.). Academic Press, New York.
- GUERRA M. **2000**. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* **23** (4): 1029-1041.
- HESLOP-HARRISON J.S., BRANDES A., SCHWARZACHER T. **2003**. Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of *Arabidopsis* species. *Chromosome Research* **11**: 241-253.
- JIANG J., BIRCHLER J.A., PARROTT W.A., DAWE R.K. **2003**. A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science* **8**: 570-575.
- JONES H.G. **1968**. Studies in neotropical orchidology. *Acta Botanica Academiae Hungaricae* **14** (1-2): 63-70.
- LEITCH A.R., SCHWARZACHER T., JACKSON D., LEITCH I.J. **1994**. *In situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- LI R., TAYLOR S., JENKINS G. **2001**. Unravelling the phylogeny of tetraploid *Vicia amoena* (Fabaceae) and its diploid relatives using chromosomal landmarks. *Hereditas* **134**: 219-224.
- MOSCONE E.A., LAMBROU M., HUNZIKER A.T., EHRENDORFER F. **1993**. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **186**: 213-229.
- _____, LAMBROU M., EHRENDORFER F. **1996**. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **202**: 37-63.
- MURRAY B., GATT M., HAMMETT K. **1999**. Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany* **84**: 39-48.
- _____, RAN Y.D., HAMMETT K.R.W. **2001**. Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany* **87** (4): 457-462.

- NAGAKI K., TALBERT P.B., ZHONG C.X., DAWE R.K., HENIKOFF S., JIANG J. **2003**. Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. *Genetics* **163**:1221-1225.
- NEVES N., DELGADO M., SILVA M., CAPERTA A., MORAIS-CECÍLIO L., VIEGAS W. **2005**. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 104-111.
- OKADA H. **1991**. Correspondence of Giemsa C-band with DAPI/CMA fluorochrome staining pattern in *Aconitum sanyoense* (Ranunculaceae). *Cytologia* **56**: 135-141.
- OSUJI J.O., CROUCH J., HARRISON G., HESLOP-HARRISON J.S. **1998**. Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5,8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. *Annals of Botany* **82**: 243-248.
- PABST G.F.J & DUNGS F. **1975**. *Orchidaceae Brasilienses – Band I*. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- PIJL L.VAN DER & DODSON C.H. **1966**. *Orchid flower: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables.
- RAN Y., MURRAY B.G., HAMMETT K.R.W. **1999**. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica* **106**: 139-147.
- SCHLECHTER R. **1917**. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11 (5)**: 87-96.
- SCHWARZACHER T., AMBROS P., SCHWEIZER D. **1980**. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* **134**: 293-297.
- _____, SCHWEIZER D. **1982**. Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **141**: 91-113.
- SCHWEIZER D. **1976**. Reverse fluorescent banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.

- _____. **1980.** Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**: 190-193.
- _____. **1981.** Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genetics* **57**:1-14.
- _____, AMBROS P.F. **1994.** Chromosome banding. Stain combinations for specific regions. *In: Gosden J.R. (Ed.). Chromosome analysis protocols. Methods in Molecular Biology* **29**: 97-112. Humana Press, Totowa.
- SHARMA S., RAINA S.N. **2005.** Organization and Evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 15-26.
- STORT M.N.S. **1984.** Sterility barriers of some artificial F₁ orchid hybrids: male sterility. I. Microsporogenesis and pollen germination. *American Journal of Botany* **71 (3)**: 309-318.
- SUMMER A.T. **1972.** A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
- SYKOROVA E., CARTAGENA J., HORAKOVA M., FUKUI K., FAJKUS J. **2003.** Characterization of telomere-subtelomere junctions in *Silene latifolia*. *Molecular Genetic and Genomics* **269**: 13-20.
- TAGASHIRA N. & KONDO K. **2001.** Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Systematics and Evolution* **227**: 145-155.
- VAN DEN BERG C. & CHASE M.W. **2000.** Nomenclatural notes on Laeliinae-I. *Lindleyana* **15 (2)**: 115-119.
- _____, HIGGINS W.E., DRESSLER R.L., WHITTEN W.M., ARENAS M.A.S., CULHAM A. & CHASE M.W. **2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15 (2)**: 96-114.

VANZELA A.LL & GUERRA M. **2000**. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology* **23(2)**: 453-456.

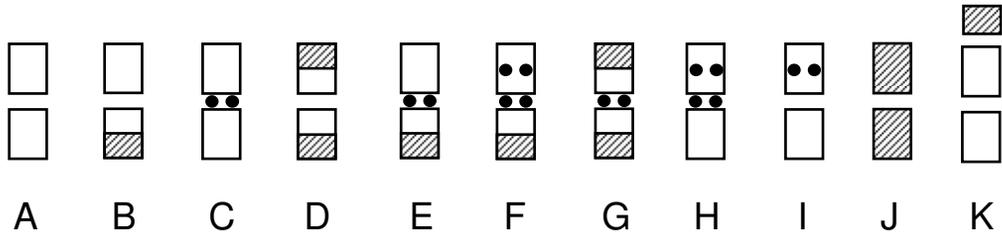


Figura 1 – Representação esquemática indicando cada tipo cromossômico observado nas espécies de *Hoffmannseggella* através dos bandamentos C, CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD. Áreas hachuradas representam bandas heterocromáticas e círculos indicam “dots” de heterocromatina.

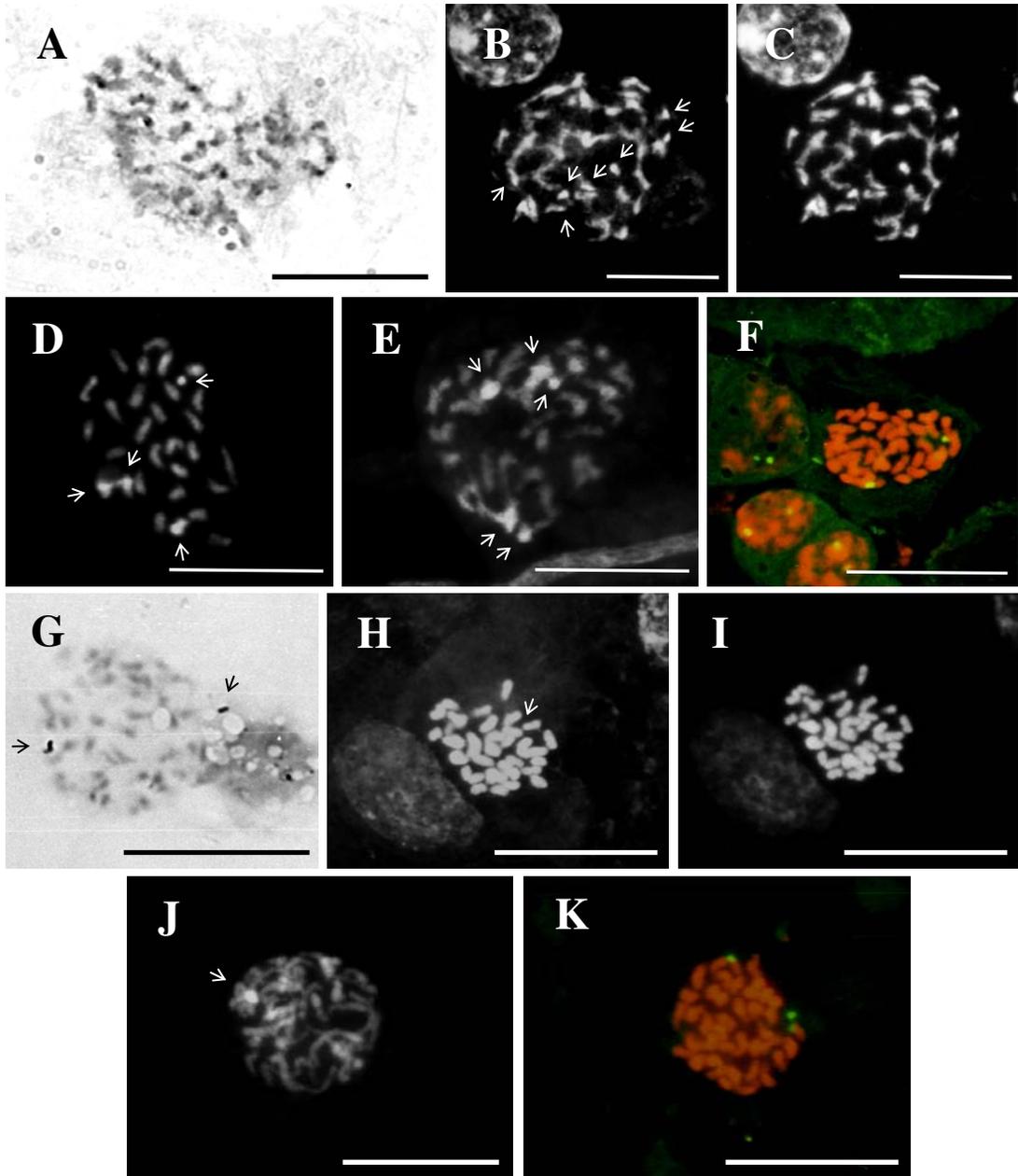


Figura 2: *Hoffmannseggella angereri* (A-F) e *H. bradei* (G-K). (A e G) bandamento C, (B e H) bandamento CMA/DA/DAPI, (C e I) bandamento DA/DAPI, (D, E e J) bandamento DAPI/AMD, (F e K) FISH 45S DNAr. Setas indicam bandas positivas. Barra = 10 μm.

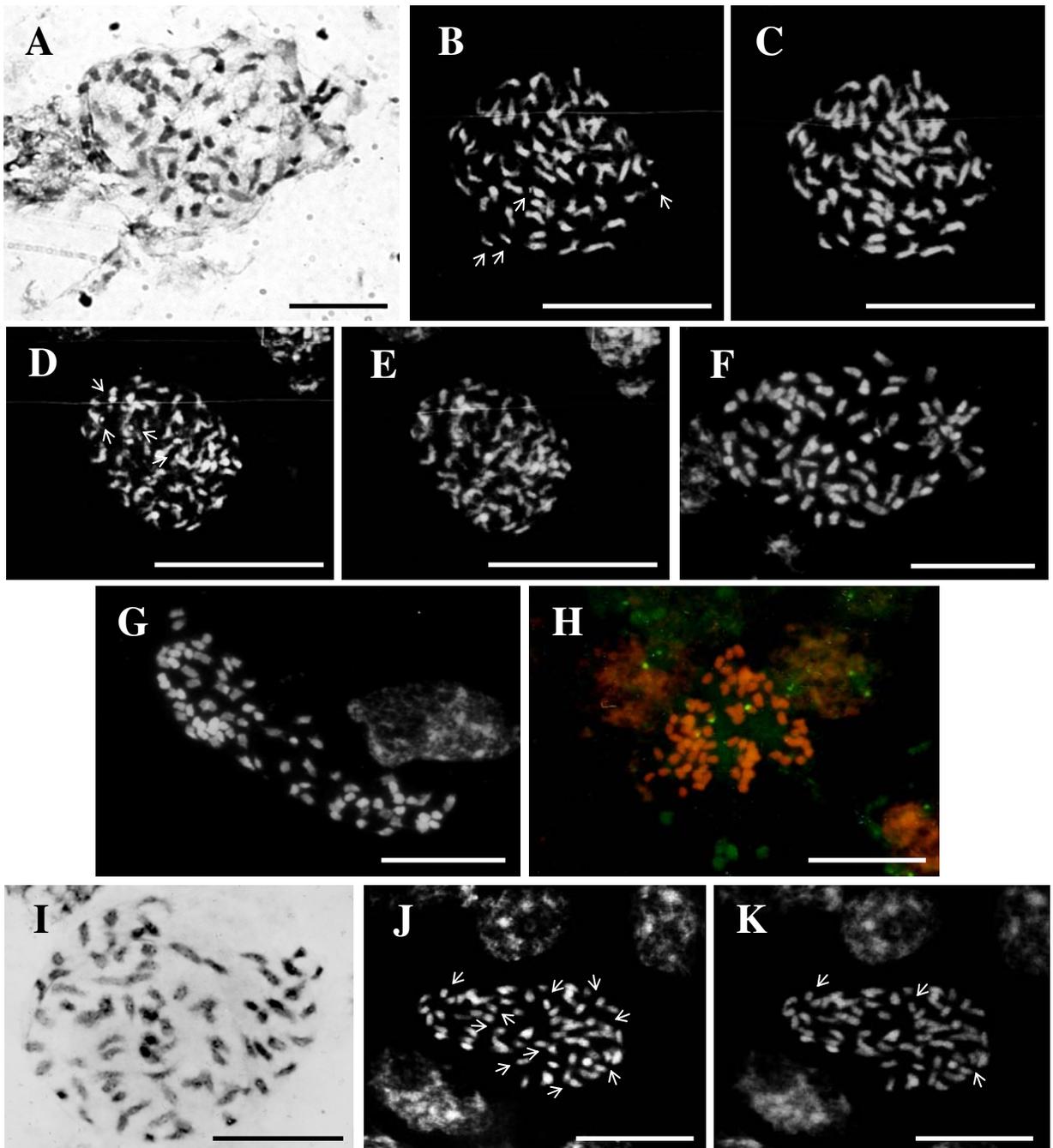


Figura 3: *Hoffmannseggella briegeri* CL9 (A-H) e CL10 (I-K). (A e I) bandamento C, (B, D e J) bandamento CMA/DA/DAPI, (C, E e K) bandamento DA/DAPI, (F e G) bandamento DA/DAPI/AMD, (H) FISH 45S DNAr. (B, D e J) Setas indicam bandas positivas, (K) setas indicam bandas DA/DAPI. Barra = 10 μ m.

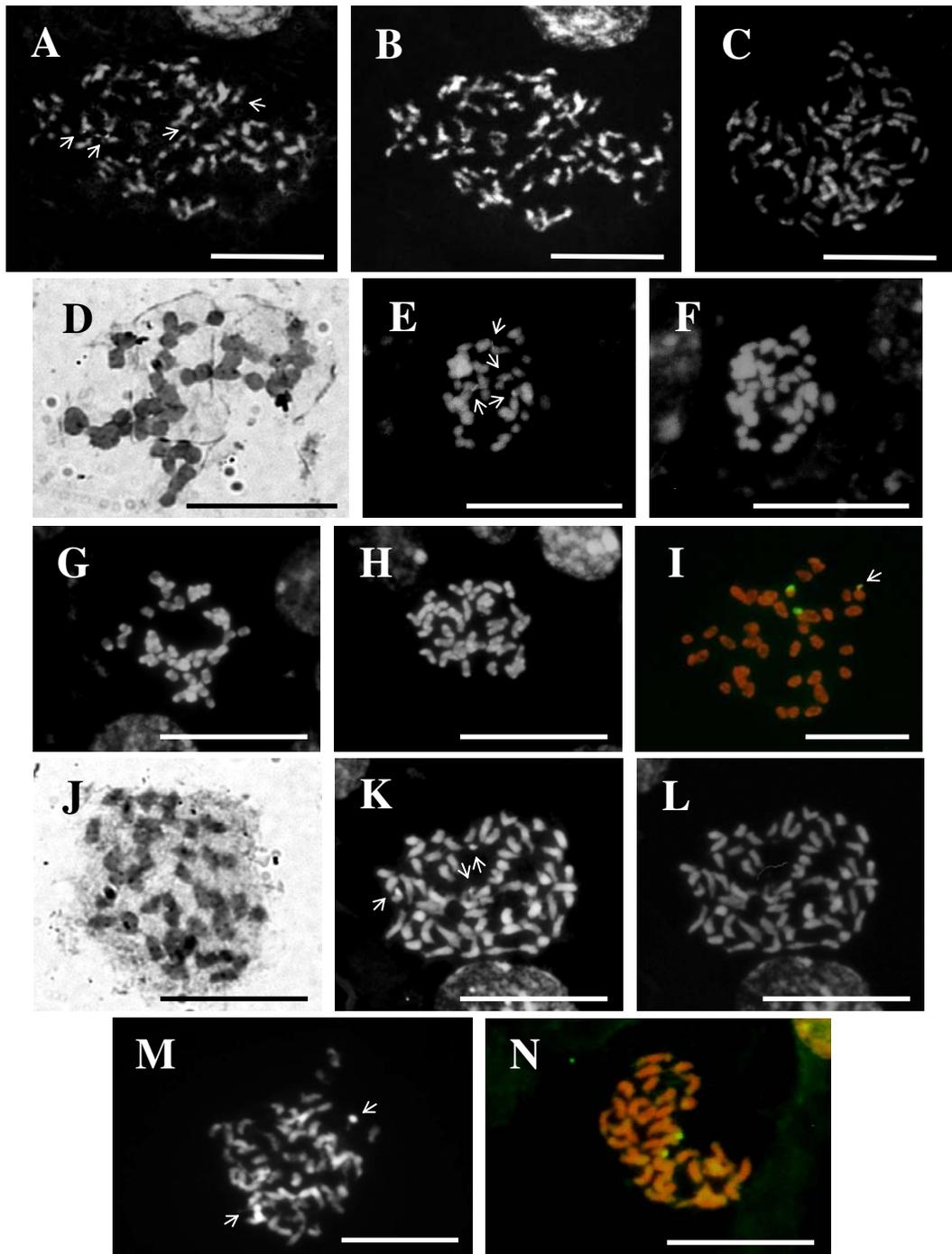


Figura 4: *Hoffmannseggella caulescens* (A-C), *H. fournieri* (D-I) e *H. liliputana*. (J-N). (D e J) bandamento C, (A, E e K) bandamento CMA/DA/DAPI, (B, F e L) bandamento DA/DAPI, (C, G, H e M) bandamento DAPI/AMD. Setas indicam bandas positivas, em (M) seta aponta cromossomos inteiramente bandados. (I e N) FISH 45S DNAr, seta indica sinal inespecífico. Barra = 10 μ m.

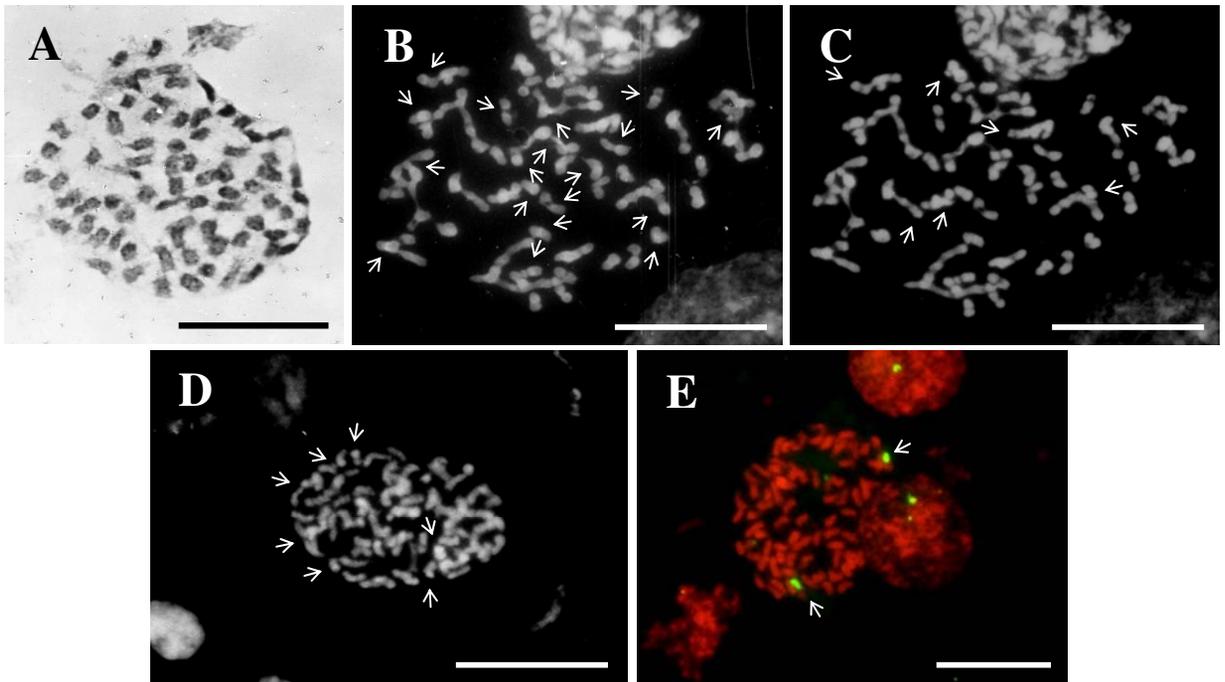


Figura 5: *Hoffmannseggella rupestris*. (A) bandamento C, (B) bandamento CMA/DA/DAPI, (C) bandamento DA/DAPI, (D) bandamento DAPI/AMD, (E) FISH 45S DNAr (setas indicam sítios amplificados). Setas indicam bandas positivas. Barra = 10 μ m.

7. CONCLUSÃO GERAL

Com o presente trabalho e estudos anteriores no gênero, totalizam-se 16 espécies de *Hoffmannseggella* estudadas quanto ao número cromossômico. O presente trabalho apresentou números cromossômicos inéditos para cinco espécies (*H. angereri*, *H. bradei*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. viridiflora*), cariótipos também inéditos para *H. bradei* e *H. viridiflora* e os primeiros estudos realizados no gênero com caracterização cromossômica por bandamentos e hibridação *in situ*. Foram confirmados o número básico de $x=20$ para o gênero e os números cromossômicos das espécies *H. briegei* ($2n=80$), *H. cinnabarina* ($2n=40$), *H. crispata* ($2n=40$) e *H. rupestris* ($2n=80$). Este estudo apresentou a primeira documentação de derivação aneuplóide de número cromossômico dentro do gênero, com a espécie *H. viridiflora*, que apresentou $2n=44$ cromossomos. Além destes dados gerais obtidos, existem alguns tópicos importantes a serem discutidos.

Anormalidades meióticas

De cinco espécies analisadas neste trabalho, quatro (*H. angereri*, *H. bradei*, *H. fournieri* e *H. rupestris*) apresentaram algum tipo de anormalidade meiótica, com variação no número de bivalentes, presença de monovalentes e/ou polivalentes em metáfase I. Além destas, BLUMENSCHNEIN (1957) observou anormalidades similares em mais três diferentes espécies (*H. cinnabarina*, *H. crispata* e *H. mixta*), além de ter observado em *H. rupestris* uma variação no número de cromossomos nos núcleos das tétrades. Em todas estas espécies, foram observadas também pontes durante a anáfase e tétrades com até dois micrócitos. Entretanto, estas espécies curiosamente apresentaram alta normalidade de tétrades, com a porcentagem mais baixa apresentada por um clone de *H. bradei*, que teve 75,3% de tétrades normais. Porém, outros clones da mesma espécie apresentaram até 100% de normalidade. O restante das espécies apresentou de 86,4 a 99,3% de tétrades normais. Vale a pena ressaltar que o tipo de coloração utilizada (carmim-acético 1,2%), não é específico para viabilidade de tétrades. Entretanto, como as espécies do grupo não apresentam

grãos de pólen, a única maneira de verificar a viabilidade de tétrades seria através da germinação das mesmas.

Anormalidades mitóticas

Neste trabalho, foi observada, pela primeira vez, aneussomatia no tecido radicular de duas espécies de *Hoffmannseggella*: *H. briegeri* e *H. rupestris*. Ambas apresentaram variação intra-individual de números cromossômicos, sendo observados no tecido radicular variações entre 64-84 cromossomos em *H. briegeri* e entre 54-76 cromossomos em *H. rupestris*. O estudo de tecido de ovário em ambas as espécies comprovou a origem poliplóide, sendo observados $2n=80$ cromossomos, sem variação nesses tecidos. Dentre os modos de origem de células aneuplóides, um dos mais prováveis é a não disjunção de centrômeros das cromátides irmãs durante a divisão mitótica (APPELS *et al.* 1998). A não disjunção de centrômeros ocasionaria a migração das cromátides para o mesmo pólo da célula, e, desta forma, uma célula filha teria, por exemplo, um complemento $2n+1$ enquanto a outra teria $2n-1$.

Outros modos de origem, assim como condições que causam a aneuploidia, estão diretamente relacionados às células reprodutivas. Como não foram observadas células aneuplóides nos tecidos de ovário, é mais provável que tanto o modo de origem como causas da aneuploidia estejam relacionadas às células somáticas do tecido radicular, não sendo transmitidas aos tecidos reprodutivos. Apesar de terem sido observados tetravelentes e monovalentes durante a metáfase I em *H. rupestris*, não há evidências de que núcleos possivelmente aneuplóides sejam viáveis e de que a aneuploidia esteja sendo transmitida para descendentes.

Dentre os fatores que poderiam favorecer a origem de células aneuplóides, poderíamos citar o envelhecimento de células e organismos, condições ambientais, infecções virais e estresse fisiológico (APPELS *et al.* 1998). Apesar de ser um fenômeno mais amplamente estudado em células reprodutivas animais, falhas no processo de divisão celular gerados por envelhecimento do tecido poderiam estar relacionadas à presença de aneussomatia nas espécies estudadas. Alguns fatores

ambientais com potencial para induzir aneuploidia já foram amplamente estudados, como radiações e substâncias químicas. Experimentos em *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que raios X e ultravioleta, quando aplicados à células que posteriormente sofrem mitose, aumentam a frequência de aneuplóides em comparação às células não tratadas. O vírus do mosaico induz aneuplóides em cevada e em trigo, causando a persistência do nucléolo durante a mitose, o que dificulta a separação das cromátides irmãs. Dentre as condições de estresse, uma das situações mais conhecidas é a cultura de células *in vitro*, que afeta tanto cromossomos como genes, resultando em variações que incluem monossômicos e trissômicos originados de erros mitóticos (APPELS *et al.* 1998).

Padrões de bandamento e hibridação in situ

As espécies de *Hoffmannseggella* apresentaram ampla variação nos padrões de bandas, mas não nos sítios 45S de DNAr. Foram observados sempre dois sítios de hibridação nas espécies que apresentaram $2n=40$ cromossomos (*H. angereri*, *H. bradei*, *H. fournieri* e *H. liliputana*), enquanto as espécies de origem poliplóide, com $2n=80$ cromossomos (*H. briegei* e *H. rupestris*), apresentaram sempre 4 sítios.

O estudo cromossômico através dos procedimentos de bandamentos C, CMA/DA/DAPI e DAPI/AMD demonstrou que este conjunto de características é geralmente espécie-específico e bastante diferente entre as espécies. Foram observadas, através do bandamento C, desde espécies com apenas duas bandas até espécies com 118 bandas heterocromáticas. As espécies de origem poliplóide apresentaram aproximadamente um número dobrado de regiões heterocromáticas quando comparadas às espécies diplóides. Entretanto, este padrão não se repetiu quando observadas as regiões repetitivas em A-T ou C-G, identificadas pelos fluorocromos DAPI e CMA respectivamente.

Utilizando como base a árvore filogenética obtida para as espécies de *Hoffmannseggella* (antigo gênero *Laelia*, seção *Parviflorae*) por VAN DEN BERG *et al.* (2000), poder-se-ia especular que houve uma tendência das espécies em direção ao aumento do número de regiões heterocromáticas e repetitivas em A-T ou C-G, já que nesta árvore filogenética uma das espécies

mais próximas do grupo epifítico de *Laelia sensu lato* foi a espécie *H. bradei*, que no presente trabalho apresentou o menor número de bandas C, CMA/DA e DAPI/AMD. Entretanto, nesta árvore apresentada por VAN DEN BERG *et al.* (2000), observa-se também, próxima às espécies epífitas, a espécie *H. briegei*, que não só apresenta origem poliplóide ($2n=80$) como também grande número de bandas, principalmente heterocromáticas. Além disso, a maior parte dos pontos de bifurcação obtidos por VAN DEN BERG *et al.* (2000) para espécies de *Hoffmannseggella* colapsam na árvore de consenso estrito, sendo então questionável a efetiva proximidade destas espécies com relação ao provável grupo ancestral constituído pelas espécies epífitas brasileiras.

Variações intra-específicas

Além da variação anteriormente citada por BLUMENSCHNEIN (1960b) para *Hoffmannseggella longipes*, com citótipos apresentando $2n=40$, 60 e 80 cromossomos, foram observados citótipos poliplóides também em outras duas espécies. As populações de Diamantina apresentaram $2n=80$ cromossomos, mas duas outras populações, distribuídas mais ao Norte da Cadeia do Espinhaço (provenientes de Botumirim/MG e Grão Mogol/MG) apresentaram $2n=40$ cromossomos no tecido radicular. As variações aneussomáticas foram observadas apenas nas populações de origem poliplóide ($2n=80$). Neste caso, foram estabelecidos dois citótipos diferentes para a espécie. Entretanto, para *H. liliputana*, foram obtidos dois números cromossômicos distintos, $2n=40$ e $2n=60$ cromossomos, em tecidos de ovário de diferentes indivíduos da mesma população. Além dessas diferenças numéricas, foram observadas diferenças intra-específicas com relação ao padrão de bandas CMA/DA⁺ entre diferentes populações de *H. briegei*. Indivíduos da população de Datas/MG apresentaram quatro bandas CMA/DA⁺, enquanto indivíduos da população de Serro/MG apresentaram 10 bandas CMA/DA⁺. Ambas as populações são da região de Diamantina/MG.

Evolução cariotípica

O conjunto de dados obtidos no presente trabalho, juntamente com aqueles obtidos através da literatura, parecem confirmar as hipóteses de que o gênero *Hoffmannseggella* teria se originado

através de uma explosão evolutiva e que eventos de hibridização e poliploidia teriam um papel importante para a evolução do grupo. A origem híbrida de uma série de espécies (ou até de populações) pode ser suposta principalmente pela observação de várias anormalidades meióticas, em muitos casos com ausência de pareamento de cromossomos ou formação de polivalentes em espécies poliplóides. Os dados obtidos em meiose, aliados a características como a presença de heteromorfismos de bandas C, CMA/DA⁺ e DAPI/AMD⁺ parecem reforçar a hipótese de origem híbrida para o grupo. Além disso, várias espécies foram observadas ocorrendo em sincronopatria, o que poderia facilitar eventos de hibridização entre as mesmas. Conforme sugerido por VAN DEN BERG *et al.* (2000), a origem por eventos de hibridização também poderia explicar os conflitos obtidos pelos autores na tentativa de reconstrução da filogenia deste grupo. Conforme discutido em COSTA (Cap. 1), a grande proporção de espécies ou citótipos poliplóides observados no gênero, em relação a outros gêneros da subtribo Laeliinae, demonstra também a importância deste mecanismo na evolução das espécies, entretanto é possível que a poliploidia seja apenas um reflexo dos eventos de hibridização, na tentativa de normalização do processo de divisão meiótica das espécies de origem híbrida.

Além da confirmação destas hipóteses anteriores, pode-se afirmar também que as espécies ainda estão em processo evolutivo, principalmente pela observação de variações cromossômicas intra-específicas (inter ou intra-populacionais), reforçando a hipótese de GIULIETTI & PIRANI (1988) de que os campos rupestres propiciam uma especiação intensa pela formação de barreiras geográficas entre populações, tornando-as disjuntas e interrompendo o fluxo gênico entre elas. Foi sugerido ainda, que as alterações cromossômicas têm papel crucial na diferenciação das espécies de *Hoffmannseggella*, já que, ao contrário da pequena variação genética observada por VAN DEN BERG *et al.* (2000) para seqüências *ITS* de DNA nuclear ribossômico e no presente trabalho para regiões 45S de DNAr, pode-se observar ampla variação cromossômica entre as diferentes espécies, principalmente em características como regiões heterocromáticas e ricas em A-T e C-G.

O presente trabalho também documentou o primeiro caso de origem aneuplóide para uma espécie, *Hoffmannseggella viridiflora*, que apresentou $2n=44$ cromossomos. Conforme discutido por COSTA (Cap. 2), é provável que esta espécie tenha se originado a partir da união de gametas desbalanceados de *H. bradei*, já que foram observadas anormalidades meióticas nesta espécie, alta similaridade morfológica e sincronopatria entre as duas espécies.

Por todos os dados encontrados no presente trabalho, em conjunto com os dados já apresentados em literatura, o gênero *Hoffmannseggella* parece representar um grande desafio taxonômico, com espécies apresentando inúmeras características morfológicas convergentes (VAN DEN BERG *et al.* 2000, BLUMENNSCHEIN 1957) adaptadas ao hábito rupícola, origem híbrida, poliploidia, variações cromossômicas intra-específicas e até intra-populacionais, sincronopatria, além de anormalidades na formação de gametas. Todas estas características associadas à grande capacidade de propagação vegetativa das espécies, sugerem que o gênero deve ser tratado com cautela no que se refere à definição das espécies e descrição de novas espécies, sendo talvez mais apropriado que as espécies fossem agrupadas em alianças e que estas fossem estabelecidas por um conjunto amplo de caracteres que envolvessem principalmente caracteres fitogeográficos e reprodutivos, e não apenas morfológicos ou genéticos, reforçando a hipótese de VAN DEN BERG *et al.* (2000) de que a hibridização não deve ser excluída como modo de especiação e causa de conflito nas tentativas de reconstrução filogenéticas.

8. BIBLIOGRAFIA GERAL

ANDERSON E. **1948**. Hybridization of the habitat. *Evolution* **2**: 1-9.

APPELS R, MORRIS R., GILL B.S., MAY C.E. **1998**. *Chromosome Biology*. Kluwer Academic Press, Canberra.

BARROS F. DE. **1990**. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta Botanica Brasilica* **4** (1): 177-187.

BERG C., GREILHUBER J. **1992**. Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome* **35**: 921-930.

_____, GREILHUBER J. **1993**. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum*, e *C. elegans*. *Plant Systematics and Evolution* **185**: 133-151.

BLUMENSCHNEIN A. **1957**. Estudos citológicos na família Orchidaceae. *Tese de Doutorado*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____. **1960a**. Estudo sobre a evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae). *Tese de Livre Docência*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____. **1960b**. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética/ESALQ/USP* **1**: 45-50.

BRIEGER F.G. **1960**. Contribuições para a taxonomia das orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética/ESALQ/USP* **1**: 1-31.

_____. **1961**. A evolução filogenética nos trópicos. *In*: Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (F. G. BRIEGER *et al.* (coords.)). *Atas do Primeiro Simpósio Sul Americano de Genética* 154-161.

_____. **1966**. Evolução filogenética, com referência especial às plantas superiores. *In*: *Elementos de Genética* (C. PAVAN & A. B. DA CUNHA (coords.)). Companhia Editora Nacional & Universidade de São Paulo. Pp. 464-515.

- CAMACHO J.P.M., SHARBEL T.F., BEUKEBOOM L.W. **2000**. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **355**: 163-178.
- CHIRON G.R. & CASTRO NETO V.P. **2002**. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindl. *Richardiana* **11** (1): 4-28.
- COUDERC H., GORENFLOT R., MORET J., SIAMI A. **1985**. Caractéristiques et conséquences de la variation chromosomique chez l'*Ornithogalum divergens* Boreau. *Bulletin de la Société Botanique de France* **132** (2): 63-71.
- DAVIES B.J., O'BRIEN I.E.W., MURRAY B.G. **1997**. Karyotypes, chromosome bands and genome size variation in New Zealand endemic gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution* **208**: 169-185.
- D'EMERICO S., BIANCO P. AND PIGNONE D. **1996a**. Cytomorphological characterization of diploid and triploid individuals of *Orchis X gennarii* Reichenb. fil. (Orchidaceae). *Caryologia* **49** (2): 153-161.
- _____, PIGNONE D., BIANCO P. **1996b**. Karyomorphological analysis and heterochromatin characteristics disclose phyletic relationships among $2n=32$ and $2n=36$ species of *Orchis* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **200** (1-2): 111-124.
- _____, GRÜNANGER P., SCRUGLI A., PIGNONE D. **1999**. Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe *Limodorinae* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **217**: 147-161.
- _____, COZZOLINO S., PELLEGRINO G., PIGNONE D., SCRUGLI A. **2002**. Karyotype structure, supernumerary chromosomes and heterochromatin distribution suggest a pathway of karyotype evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **138**: 85-91.
- DRESSLER R.L. **1981**. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.

- FÉLIX L.P., GUERRA M. **1999**. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressler: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. *Caryologia* **52**: 165-168.
- FORNI-MARTINS ER. & GUERRA M. **1999**. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species. *Caryologia* **52** (1-2): 97-103.
- FORNI-MARTINS E.R., PINTO-MAGLIO C.A.F., CRUZ N.D.DA. **1992**. Biologia da reprodução em plantas de cerrado: microsporogênese. *Anais do 8º Congresso da SBSP*: 77-82.
- GALL J.C., PARDUE M.L. **1970**. Nucleic acid hybridisation in cytological preparations. In: *Methods in Enzymology* (L. Grossman and K. Moldave eds.). Academic Press, New York.
- GIULIETTI A.M. & PIRANI J.R. **1988**. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brasil. In: *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (W.R. Heyer and P.E. Vanzolini eds.). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- GUERRA M. **1983**. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura*, **35**: 190-193.
- GUERRA M. **1986**. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev. Brasil. Genet.* **9** (4): 741-743.
- GUERRA M. **2000**. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* **23** (4): 1029-1041.
- HENSOLD N.C. **1986**. *The systematics of Paepalanthus subg. Xeractis (Eriocaulaceae)*. Ph.D. Thesis, Univ. Michigan, Michigan.
- HESLOP-HARRISON J.S., BRANDES A., SCHWARZACHER T. **2003**. Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of *Arabidopsis* species. *Chromosome Research* **11**: 241-253.
- HOSHINO T. **1988**. Chromosomal observations on *Fuchsia* species and artificial híbrids. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1153-1154.

- HUZIWARA Y. **1962**. Karyotype analysis in some genera of compositeae – VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* **49**:116-119.
- JIANG J., BIRCHLER J.A., PARROTT W.A., DAWE R.K. **2003**. A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science* **8**: 570-575.
- JOLY A.B. **1970**. *Conheça a vegetação brasileira*. EDUSP e Polígono, São Paulo.
- JONES H.G. **1968**. Studies in neotropical orchidology. *Acta Botanica Academiae Hungaricae* **14** (1-2): 63-70.
- LEITCH A.R., SCHWARZACHER T., JACKSON D., LEITCH I.J. **1994**. *In situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- LI R., TAYLOR S., JENKINS G. **2001**. Unravelling the phylogeny of tetraploid *Vicia amoena* (Fabaceae) and its diploid relatives using chromosomal landmarks. *Hereditas* **134**: 219-224.
- LIM W.L. & LOH C.S. **2003**. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist* **159** (1): 279-287.
- MOSCONE E.A., LAMBROU M., HUNZIKER A.T., EHRENDORFER F. **1993**. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **186**: 213-229.
- _____, LAMBROU M., EHRENDORFER F. **1996**. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **202**: 37-63.
- MURRAY B., GATT M., DING H., HAMMETT K. **1998**. Polyploidy and evolution in wild and cultivated *Dahlia* species. *Annals of Botany* **81**: 647-656.
- MURRAY B., GATT M., HAMMETT K. **1999**. Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany* **84**: 39-48.
- _____, RAN Y.D., HAMMETT K.R.W. **2001**. Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany* **87** (4): 457-462.

- NAGAKI K., TALBERT P.B., ZHONG C.X., DAWE R.K., HENIKOFF S., JIANG J. **2003**. Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. *Genetics* **163**:1221-1225.
- NEVES N., DELGADO M., SILVA M., CAPERTA A., MORAIS-CECÍLIO L., VIEGAS W. **2005**. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 104-111.
- OKADA H. **1991**. Correspondence of Giemsa C-band with DAPI/CMA fluorochrome staining pattern in *Aconitum sanyoense* (Ranunculaceae). *Cytologia* **56**: 135-141.
- OSUJI J.O., CROUCH J., HARRISON G., HESLOP-HARRISON J.S. **1998**. Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5,8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. *Annals of Botany* **82**: 243-248.
- PABST G.F.J & DUNGS F. **1975**. Orchidaceae Brasilienses – Band I. *Brücke-Verlag Kurt Schmiersow*, Hildesheim.
- PIJL L.VAN DER & DODSON C.H. **1966**. *Orchid flower: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables.
- RAMSEY J. & SCHEMSKE D.W. **1998**. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467-501.
- RAN Y., MURRAY B.G., HAMMETT K.R.W. **1999**. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica* **106**: 139-147.
- SCHLECHTER R. **1917**. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11 (5)**: 87-96.
- SCHWARZACHER T., AMBROS P., SCHWEIZER D. **1980**. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* **134**: 293-297.
- _____, SCHWEIZER D. **1982**. Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **141**: 91-113.

- SCHWEIZER D. **1976**. Reverse fluorescent banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.
- _____. **1980**. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**: 190-193.
- _____. **1981**. Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genetics* **57**:1-14.
- _____, AMBROS P.F. **1994**. Chromosome banding. Stain combinations for specific regions. *In*: Gosden J.R. (Ed.). *Chromosome analysis protocols*. Methods in Molecular Biology **29**: 97-112. Humana Press, Totowa.
- SHARMA S., RAINA S.N. **2005**. Organization and Evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 15-26.
- STACE C.A. **2000**. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* **49**: 451-477.
- STEBBINS G.L. **1971**. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- STORT M.N.S. **1984**. Sterility barriers of some artificial F₁ orchid hybrids: male sterility. I. Microsporogenesis and pollen germination. *American Journal of Botany* **71** (3): 309-318.
- SUMMER A.T. **1972**. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
- SYKOROVA E., CARTAGENA J., HORAKOVA M., FUKUI K., FAJKUS J. **2003**. Characterization of telomere-subtelomere junctions in *Silene latifolia*. *Molecular Genetic and Genomics* **269**: 13-20.

- TAGASHIRA N. & KONDO K. **2001**. Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Systematics and Evolution* **227**: 145-155.
- VAN DEN BERG C. & CHASE M.W. **2000**. Nomenclatural notes on Laeliinae-I. *Lindleyana* **15 (2)**: 115-119.
- _____, HIGGINS W.E., DRESSLER R.L., WHITTEN W.M., ARENAS M.A.S., CULHAM A. & CHASE M.W. **2000**. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15 (2)**: 96-114.
- VANZELA A.LL & GUERRA M. **2000**. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology* **23(2)**: 453-456.
- VEROLA C.F. & SEMIR J. A new specie of *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Laeliinae) from Brazilian "Campos Rupestres" vegetation. *Novon* (Submetido).