

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

CYNTIA BEATRIZ MAGALHÃES FARIAS

**Quantificação do DNA nuclear de seis espécies do gênero
Catasetum Lindley (*Orchidaceae*)**

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
JANEIRO – 2021

CYNTIA BEATRIZ MAGALHÃES FARIAS

**Quantificação do DNA nuclear de seis espécies do gênero
Catasetum Lindley (*Orchidaceae*)**

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

Nome do(a) orientador(a): Prof^a Dr^a Isane Vera Karsburg

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO – BRASIL
JANEIRO - 2021

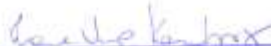
**Quantificação do DNA nuclear de seis espécies do gênero
Catasetum Lindley (Orchidaceae)**

Cyntia Beatriz Magalhães Farias

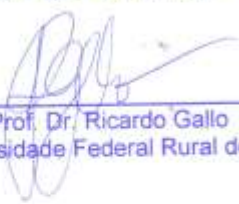
Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Carlos Alberto Reyes Maldonado, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 01 de Fevereiro de 2021

Comissão Examinadora



Profa. Dra. Isane Vera Karsburg
Orientadora – UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos
Alberto Reyes Maldonado



Prof. Dr. Ricardo Gallo
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Dr. Darley Aparecido Tavares Ferreira
UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes
Maldonado

Luiz Kenji Umeno Alencar CRB 1/2037

F224q FARIAS, Cyntia Beatriz Magalhães.
Quantificação do Dna Nuclear de Seis Espécies do Gênero
Catasetum Lindley (Orchidaceae) / Cyntia Beatriz Magalhães
Farias - Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2021.
52 f.; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) - Curso de Pós-graduação Stricto Sensu
(Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas,
Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi,
Universidade do Estado de Mato Grosso, 2021.
Orientador: Isane Vera Karsburg

1. Citometria de Fluxo. 2. Orquidáceas. 3. Melhoramento
Genético. I. Cyntia Beatriz Magalhães Farias. II. Quantificação do
Dna Nuclear de Seis Espécies do Gênero Catasetum Lindley
(Orchidaceae): .

CDU 582.594

Aos meus pais, Ademir Apolinário Farias e Maria Ester de Melo Magalhães.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu a vida, e aos meus pais, que fizeram de todo o possível para o meu desenvolvimento em todos os aspectos da vida e pelo incansável trabalho que tiveram comigo.

À minha irmã Carla Caroline Magalhães Farias por ser sempre meu apoio e uma irmã maravilhosa.

Ao meu filho Nicolas Gabriel Farias Mampumbu, que desde o seu nascimento vem me ensinado e aprendendo comigo as diferentes formas de amar e viver.

A todos os que vieram antes de mim, meus antepassados e aqueles que, de alguma forma, não puderam ficar nessa vida.

Aos meus queridos professores desde à infância até esse precioso momento.

Ao meu esposo Bruno Renan Krause, que foi o meu sustento durante todo esse processo, custeando e dando apoio em cada viagem realizada, me dando força nos momentos de cansaço e por entender a importância deste curso para minha vida. Amo você.

À Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reys Maldonado (UNEMAT) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, bem como todos os que compõem sua coordenação e funcionários.

À Professora Doutora Isane Vera Karsburg, pela orientação, apoio, carinho, paciência e ensinamentos. Sinto a sua força professora.

Ao Doutor Ricardo Gallo da (UFRPE) e Darley Aparecido Tavares Ferreira (UNEMAT), por suas colaborações e ensinamentos na banca.

Ao Professor Doutor Wellington Ronildo Clarindo, pelo auxílio com as análises de citometria de fluxo e atenção na realização deste estudo.

Aos professores do Programa, que muito contribuíram com o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal. Sou grata a todos.

À maravilhosa Professora Doutora Celice Alexandre Silva, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao Doutor Denisval Pereira de Andrade e aos outros psicólogos, psiquiatras, psicoterapeutas, que foram muito importantes para o meu tratamento e melhora nos últimos anos.

À minha querida colega Mestre Lindisai Fernandes, pelo apoio e incentivo neste curso. Sou muito grata.

À minha querida amiga Mestre Leila Pereira Neves Ramos.

Aos Doutorandos Weslaine de Almeida Macedo, Douglas Machado Leite e João Vitor da Silva Alves.

À Erika Loraine, seu esposo Eduardo Castrilon e sua família, Dona Luciene e Rubens Castrilon, pelo apoio e acolhimento em sua casa, me deixando fazer parte das suas vidas, durante todo o período das disciplinas cursadas em Cáceres. Minha eterna gratidão.

À querida Vera Simões André, que me deu apoio, incentivo, colo, carinho e muito mais durante as disciplinas cursadas. Você é uma grande pessoa, com um enorme coração. Não tenho nem palavras para te agradecer. Sinto-me privilegiada pela sua amizade.

A Pedro Sávio que me acolheu em sua casa em Tangará da Serra, juntamente com meu querido amigo João Vitor da Silva Alves.

Aos colegas de curso, Fernanda Porto, Altacis Marques Júnior, Givanildo Rodrigues, Jeferson, Anne Augusto Arrolho, Jessica Tamara Laet Abreu e Lorena.

Aos colegas de laboratório Neisa Pimenta, Zélia Marques Prestes Radons, Enelisia Rodrigues Ramos, Rute Ribeiro Cruz, Maiara Cristina Metsdorf da Silva, Lucimar de Oliveira, Samiele Camargo de Oliveira Domingues, Marceliana Amélio Alves Gouveia, Patrícia dos Santos da Silva de Oliveira, Carine dos Santos Caramelo, Jessica Paz, Josemara Couto de Castro, Flavio Ovani da Silva, Josicleide Lima Matos e Sueli da Silva Fernandes.

Aos funcionários do Laboratório didático da UNEMAT e à Mestre Ligia Eburneo.

A todos os colaboradores e equipe do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais (UNEMAT - AF), que aqui não foram citados porque são muitos, mas que estarão sempre no meu coração. Sou muito grata a todas essas pessoas, amigos e colegas maravilhosos que ali frequentam e desenvolvem ciência.

A todos que participaram e estiveram presentes nessa caminhada, o meu muitíssimo obrigada!

Orquídeas
admiráveis
amadas
independentes
caprichosas
exóticas
selvagens
só florescem quando é seu próprio desejo...
Marijo

BIOGRAFIA

Cyntia Beatriz Magalhães Farias, filha de Ademir Apolinário Farias e Maria Ester de Melo Magalhães nasceu em Alta Floresta – MT, no dia 24 de Julho de 1986. Em 2004 ingressou na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), e em agosto de 2008 graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biologia, no município de Alta Floresta. Em 2019 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de mestrado pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), matriculando-se e iniciando suas aulas em março do mesmo ano nos *campus* de Alta Floresta, Tangará e Cáceres – Mato Grosso. Em dezembro de 2020 submeteu-se à defesa de dissertação no *campus* Universitário de Alta Floresta, sob orientação da Prof^a Dr^a Isane Vera Karsburg.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Ordem Asparagales e seu potencial ornamental.....	3
2.2 Família <i>Orchidaceae</i>	4
2.3 O gênero <i>Catasetum</i>	5
2.4 Aspectos botânicos, vegetativos e reprodutivos.....	6
2.4.1. <i>Catasetum atratum</i> Lindl. (John Lindley, 1838)	10
2.4.2. <i>Catasetum albovirens</i> Barb. Rodr. (Barbosa Rodrigues, 1877).....	12
2.4.3. <i>Catasetum rooseveltianum</i> Hoehne (Frederico Carlos Hoehne, 1916)	12
2.4.4. <i>Catasetum discolor</i> (Lindl.) Lindl. (John Lindley, 1838)	13
2.4.5. <i>Catasetum. Joaquinianum</i> Campacci & G. F. Carr (Marcos Antonio Campacci & George Francis Carr Jr., 2011)	14
2.4.6. <i>Catasetum hopkinsonianum</i> G. F. Carr & V. P. Castro (George Francis Carr Jr. & Vitorino Paiva Castro, 2008)	15
2.5 Importância ecológica e econômica	16
2.6 Ploidia.....	17
2.7 Citometria de fluxo	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material Vegetal	21
3.2 Análise da citometria de fluxo.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

FARIAS, Cyntia Beatriz Magalhães, M. sc.; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; janeiro 2021; Quantificação do DNA nuclear de seis espécies do gênero *Catasetum* Lindley (*Orchidaceae*); Orientadora: Isane Vera Karsburg.

O gênero *Catasetum* pertence à família *Orchidaceae*, o qual possui aproximadamente 300 espécies distribuídas por todo o território brasileiro, que vem sendo gradativamente destruído por ação antrópica do homem. O conhecimento do genoma vegetal desse gênero é imprescindível, pois auxilia no esclarecimento do comportamento genético das espécies pertencentes, que existem em grande variabilidade, decorrente da hibridação natural entre essas espécies. E, sendo parte integrante da citogenética, tem sua contribuição fundamental em estudos evolutivos, taxonômicos, de melhoramento vegetal e no desenvolvimento de estratégias para conservação. Diante do exposto, o presente trabalho visou quantificar o DNA por citometria de fluxo seis espécies pertencentes ao gênero *Catasetum*: *C. atratum*, *C. albovirens*, *C. joaquinianum*, e *C. rooseveltianum*, fornecendo resultados que possam contribuir para caracterizar o gênero. Foram analisadas as quantidades de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo das espécies citadas. Para as análises, foram utilizadas folhas jovens de plantas cultivadas no Orquidário Altaflorestense das seis espécies, tendo como padrão a *Solanum lycopersicum*. Com base nos dados obtidos, podemos inferir que o conteúdo de DNA divergiu para todas as espécies de *Catasetum* estudadas. *Catasetum discolor* foi o que apresentou a maior quantidade de DNA, 9,71pg, e o *Catasetum rooseveltianum* apresentou o menor valor, 6,06pg. *C. discolor* apresentou picos representativos de núcleos com valores de DNA de 2C, 4C, 6C, 8C e 16C, com maior pico em 2C. Ainda são poucos os trabalhos com a quantificação do DNA para *Catasetum*, sendo as avaliações realizadas nesse estudo inéditas e os valores encontrados se aproximam dos de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. As informações obtidas nessa pesquisa são importantes para auxiliar em programas de melhoramento genético com as espécies visando o cruzamento e obtenção de híbridos, já que se verificou a semelhança na quantidade de DNA nuclear, bem como base para outras áreas de pesquisa, como a sistemática e a evolução.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, orquídeas, melhoramento genético.

ABSTRACT

FARIAS, Cyntia Beatriz Magalhães, M. sc.; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; janeiro, 2021; Quantification of nuclear DNA from six species in the genus *Catasetum* Lindley (Orchidaceae); Advisor: Isane Vera Karsburg.

The genus *Catasetum* belongs to the *Orchidaceae* family, which has approximately 300 species distributed throughout Brazilian territory, that has been gradually destroyed by human anthropic action. The knowledge of the plant genome of this genus, is essential because it helps to clarify the genetic behavior of the species belonging, which has great variability due to the natural hybridization between these species. And, being an integral part of cytogenetics, it has its fundamental contribution in evolutionary, taxonomic studies, plant breeding and in the development of a conservation strategy. Thus, the present study aimed to quantify the DNA by flow cytometry of six species belonging to the genus *Catasetum*: *C. atratum*, *C. albovirens*, *C. joaquinianum*, *C. hopkinsonianum*, *C. discolor*, *C. rooseveltianum*, providing results to help characterize the genre. It was analyzed the amount of nuclear DNA through flow cytometry of the species mentioned above. For the analysis, it was used young leaves of the six species from plants cultivated in the Orchidarium Altaflorestense and, as standard, *Solanum lycopersicum* were used. Based on the data obtained, we can infer that the DNA content differed for all the studied *Catasetum* species. *Catasetum discolor* showed the highest amount of DNA, 9.71pg, and *Catasetum rooseveltianum* showed the lowest value, 6.06pg. *C. discolor* presented significant peaks of nuclei with DNA values of 2C, 4C, 6C, 8C and 16C, its highest peak being 2C. There are still few studies on the quantification of DNA for *Catasetum*, therefore, the analyses from this study are original and the evaluations carried out in this study showed similarity to other species belonging to the same genus. The information provided in this study is important to assist in breeding programs with specific categories and the crossing and generation of hybrids, since there was a similarity in the amount of nuclear DNA, as well as a basis for other research areas such as systematics and evolution .

Key words: flow cytometry, orchidaceae, genetic breeding .

1. INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* constitui-se de uma das mais interessantes famílias de plantas floríferas: são cerca de 35.000 espécies no mundo, sendo 2.500 espécies registradas no Brasil, distribuídas nos biomas de mata atlântica, com cerca de 1.400 espécies, e na floresta amazônica e cerrado, com cerca 700 espécies (Barros et al., 2012; 2018; Dressler, 1993, 2005).

Distribuídas entre 700 gêneros (Chase et al., 2015), 236 desses podem ser encontrados no país, na região sudeste, centro-oeste (Barros et al., 2015), norte. (Da Silva et al., 1995; Vieira et al. 2014), nordeste (Pessoa e Alves, 2014) e sul (Budke et al. 2004; Buzatto et al., 2010).

Dentre eles, destaca-se o gênero *Catasetum*, o qual possui aproximadamente 300 espécies distribuídas por todo o território brasileiro (Dressler, 1993, 2005), como no Amazonas (Da Silva et al., 1995; Silva & Oliveira, 1998; Petini-Benelli, 2016), Amapá (de Castro et al., 2018), Rondônia (Silva & Oliveira, 2001; Prestes, 2013; Petini-Benelli, 2014), Maranhão (Silva & Oliveira, 1999; Silva & Figueiredo, 2006), Bahia (Bastos & Van den Berg, 2012), entre outros.

Com o avanço das fronteiras agrícolas e o desmatamento, tem ocorrido, conseqüentemente, a perda da diversidade de algumas espécies de *orquidáceas* (Costa et. al., 2013), principalmente as que apresentam endemismo, como algumas espécies do gênero *Cyrtopodium*, do cerrado brasileiro (Silva et al., 2013), gênero *Phymatidium*, endêmico do Paraná (Royer, 2013), *Catasetum atratum*, endêmica do Mato Grosso e de outros estados brasileiros (Barros et al., 2014).

Por causa da beleza de suas flores, diferenciada morfologia floral, mecanismos de polinização, associação com fungos (micorrizas), entre outras, as orquídeas são amplamente cultivadas, destacando-se como planta ornamental, de interesse econômico, ecológico e botânico (Galdiano-Junior et al., 2012; Linthoingambi et al. 2015), com importância na indústria cosmética, alimentícia e medicinal (Galdiano-Junior et al., 2012), sendo considerada uma família evolutivamente avançada de monocotiledôneas (Linthoingambi et al. 2015).

Partindo do conhecimento sobre genoma vegetal de plantas alógamas, a quantificação do conteúdo de DNA é de grande importância para a caracterização do

germoplasma e imprescindível para os estudos evolutivos, trabalhos de melhoramento genético, planejamentos de atividades de sequenciamento e programas de cruzamentos (Bennett & Leitch 2005). E, tratando-se da família das *Orchidaceae*, ocorre grande variabilidade genética por conta da alta hibridação que ocorre entre as espécies.

Por meio da citometria de fluxo é possível verificar a variabilidade em relação a quantidade de DNA e a ploidia das espécies. E, sendo parte integrante da citogenética, tem sua contribuição fundamental em estudos evolutivos e taxonômicos, por fornecerem importantes dados acerca do processo evolutivo sofrido pelas espécies (Oliveira, 2011).

De acordo com Leitch et al. (2019), apenas 414, entre as mais de 35 mil espécies aceitas para a família *Orchidaceae*, possuem estimativas para o valor C de DNA. Observa-se que estimativas para alguns gêneros são notavelmente ausentes como em *Acacallis*, *Aspasia*, *Batemannia*, *Bifrenaria*, *Brassavola*, *Cycnoches*, *Cyrtopodium*, *Encyclia*, *Galeandra* e muitos outros.

Para *Polystachya*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium* e *Oncidium*, o valor C definido é de 57, 55, 44, 33, respectivamente. Para *Cattleya* e *Laelia*, as estimativas são poucas, 6 e 2, respectivamente, já *Epidendrum*, o gênero mais numeroso da família, possui apenas 2 estimativas para as espécies *Epidendrum rigidum* Jacq. e *Epidendrum steinbachii* Ames.

Para Leitch et al. (1994; 2019), a falta de dados para a família *Orchidaceae*, utilizando a técnica da citometria de fluxo, está relacionada às dificuldades em se obter estimativas precisas para essa família, possivelmente devido à natureza recalcitrante do tecido. Os procedimentos utilizados para as estimativas existentes variam muito, dificultando comparações.

Diante do exposto, o presente trabalho visou quantificar o DNA nuclear por citometria de fluxo das espécies *Catasetum atratum* Lindl., *Catasetum albovirens* Barb.Rodr., *Catasetum joaquinianum* Campacci & G.F.Carr., *Catasetum hopkinsonianum* G.F.Carr & V.P.Castro., *Catasetum discolor* Lindl. e *Catasetum rooseveltianum* Hoehne, objetivando fornecer subsídios para caracterizar o gênero e auxiliar nas pesquisas referentes ao melhoramento genético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ordem *Asparagales* e seu potencial ornamental

Asparagales inclui muitas famílias tradicionalmente relacionadas à *Liliales*, como *Amaryllidaceae* e *Orchidaceae*. Distingue-se das *Liliales* pelas tépalas geralmente não maculadas, nectários septais (nos septos do ovário) e algumas vezes com crescimento secundário anômalo (Dressler, 1993; 2005).

Segundo a classificação do APG IV (Angiosperm Phylogeny Group - Grupo de Filogenia das Angiospermas), que reúne e utiliza-se de dados de biologia molecular, a ordem *Asparagales* reúne 14 famílias e 36.265 espécies, a maioria incluída em *Orchidaceae*, com aproximadamente 35.000 espécies, distribuídas em 6 tribos, 80 subtribos e 800 gêneros. A categoria apresenta grande diversidade, portanto, a maior família é a que melhor se destaca economicamente (Heywood, 1993; Soares et al., 2011).

O sistema de classificação foi desenvolvido por séculos, foi estabelecido principalmente por taxonomistas e inclui um número de divisões e subdivisões que agrupam as plantas com base em suas semelhanças na estrutura e aparência da flor (Dressler, 1993). A classificação mais aceita atualmente, APG IV, leva em conta outras características, como dados citológicos e moleculares.

Dentre as famílias do grupo das *Asparagales*, a família *Orchidaceae* vem apresentando interesse e importância econômica no setor de plantas ornamentais, pela sua grande combinação de cores, tamanhos e fragância, características que contribuem cada vez mais para a sua apreciação (Dressler, 2005; Schoenmaker, 2017). Na floricultura tropical, muitos gêneros são comercializados e a tendência é que deva continuar crescendo (Mattiuz et al., 2006; Mezzalira & Kuhn, 2019).

O aumento na produtividade e comercialização de flores no Brasil apenas foi possível pelas diversas pesquisas realizadas nas áreas de genética, fisiologia, nutrição, entre outros. Esses estudos têm contribuído para o avanço das tecnologias, elevando a produção por área, característica essencial para a viabilidade econômica da produção comercial, além da promoção de plantas mais tolerantes e adaptadas às condições climáticas do Brasil (Cardoso, 2010; Mezzalira & Kuhn, 2019).

2.2 Família *Orchidaceae*

Orchidaceae se divide em cinco subfamílias, sendo elas *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* e *Epidendroideae* (Shiraki & Diaz, 2012), possuindo sete tribos, sendo elas *Arethuseae*, *Cymdidieae*, *Epidendreae*, *Malaxideae*, *Nervillieae*, *Triphoreae* e *Vandae*, com mais de 10 mil de espécies distribuídos em 34 subtribos. A subfamília *Epidendroideae* inclui a maioria das orquídeas do Brasil que apresentam grande valor ornamental (Chase et al., 2015).

A tribo *Cymdidieae* se subdivide em sete novas subtribos: *Catasetinae*, *Cyrtopodiinae*, *Cymbidiinae*, *Eriopsidinae*, *Maxillariinae*, *Oncidiinae* e *Stanhopeinae* (Shiraki & Diaz, 2012).

Catasetine (Pridgeon et al., 2009) é constituída pelos gêneros *Catasetum* Rich. ex Kunth, com mais de 176 espécies, *Clowesia* Lindl, com 7 espécies, *Cyanaeorchis* Barb. Rodr, com 3 espécies, *Cycnoches* Lindl, com 34 espécies, *Dressleria* Dodson, com 11 espécies, *Galeandra* Lindl, com 38 espécies, *Grobya* Lindl, com 5 espécies e *Mormodes* Lindl, com 80 espécies (Chase et al., 2015).

As espécies de orquídeas podem viver de forma terrestre, epifíticas, rupícolas, saprófitas e, raramente, subterrâneas, sendo predominante a forma epifítica (Dressler, 1993; Shiraki & Diaz, 2012).

Elas estão distribuídas em todo o mundo, exceto no hemisfério sul, na região polar austral da Terra. Ocupam os mais variados ambientes, com preferência para regiões tropicais (Dressler, 1993), como podemos observar na figura 1.



Figura 1: Distribuição da família *Orchidaceae* no mundo, apresentada em pontos amarelos no mapa. Adaptado de Trópicos.org. Missouri Botanical Garden.

Conforme Barros et al. (2012; 2015), há aproximadamente 2.443 espécies e 236 gêneros distribuídos por todas as regiões do Brasil, a região sudeste é a mais representativa, com 1566 espécies registradas, e a região centro-oeste com menor número, 533 espécies registradas.

2.3 O gênero *Catasetum*

O nome do gênero *Catasetum* é uma palavra híbrida do grego “kata”, que significa “para baixo”, e do latim “seta” o que significa “seda”, referindo-se aos appendices florais, que são dois prolongamentos da coluna, muito semelhantes às antenas voltadas para baixo, no interior do labelo, nas flores de sexo masculino, para a maioria das espécies do gênero (Singer, 2019).

O gênero *Catasetum* foi proposto por John Lindley em 1836. São reconhecidas 1566 espécies no mundo, dessas, 121 estão distribuídas no Brasil e 93 são endêmicas com mais 72 variedades registradas no Brasil (Petini-Benelli, 2020). O gênero *Catasetum* tem mais de 170 espécies, a maior parte sendo terrestre ou epífitas e seu habitat se estende do México até a Argentina, com o centro de diversidade no Brasil, com maior número na Amazônia, sendo considerado seu centro de radiação, e 21 espécies são especificamente encontradas no estado de Mato Grosso. Incluindo algumas das mais belas e raras espécies, como *Catasetum atratum*, além de híbridos naturais como *Catasetum x santo-antoniense* e *Catasetum x canaense* (Raposo, 1992; Scaglia, 1998; Pridgeon et al., 2009; Benelli, 2012; Govaerts et al., 2019).

As populações naturais do gênero de *Catasetum*, que ocorrem no Mato Grosso, podem estar sob o efeito da fragmentação, pois na década de 1970 o estado deu início à emancipação de suas áreas agrícolas e de pecuária, sendo intensamente ocupadas. Com a retirada da vegetação nativa para a implantação de culturas, a vegetação original foi reduzida a pequenos fragmentos, por isso tem sido considerada área prioritária para investigação científica (Maury, 2004).

Desse modo, alguns pesquisadores da área da botânica vêm realizando trabalhos de identificação, resgate e catalogação de novas espécies como *Catasetum telespirense* (Benelli & Soares-Lopes, 2015), *Catasetum x canaense* (Petini-Benelli,

2016), *Catasetum paranaitense* (Benelli & Soares-Lopes, 2017), *Catasetum x nogueirae* e *Catasetum x santo antoniense* (Ferreira & Filho, 2019).

2.4 Aspectos botânicos, vegetativos e reprodutivos

Um dos gêneros encontrado no Brasil que vem atraindo a atenção de colecionadores e pesquisadores é o *Catasetum* (L. C. Richard ex Kunth), pertencente à subfamília *Epidendroideae*, tribo *Cymbidiae*, subtribo *Catasetinae* (Pridgeon et al., 2009), pela sua incrível adaptação à entomofilia, pelo dimorfismo sexual de suas flores e pelo mecanismo de disparo do polinário (Raposo, 1992; Romero, 1992).

Geralmente as plantas desse gênero apresentam ramos de crescimento simpodial, alongados ou com entrenós formando pseudobulbos e folhas simples, geralmente alternas, frequentemente com bainha (Hoehne, 1942).

Os pseudobulbos são carnudos, oblongos, anelados e cespitosos, com folhas dísticas, decíduas, estreitas, nervuradas e com bainha sobreposta em sua parte inferior, que permanecem recobrendo os pseudobulbos após a senescência da folha nos períodos de seca, conforme a figura 2 (Hoehne, 1942; Machado, 1998; Scaglia, 1998; Singer, 2019).



Figura 2: Estrutura vegetativa de um *Catasetum*. Fonte da imagem: autor.

As plantas apresentam raízes que podem estar associadas a fungos micorrizicos, são geralmente suculentas, com uma camada múltipla, espessa e absorvente de células mortas da epiderme (velame) nas epífitas, que tem espessura variada dependendo do habitat em que a espécie se encontra (Dressler, 1981; Silva et al., 2010; Silva et. al., 2015).

Também apresentam três tipos diferentes de flores: masculinas, femininas e, ocasionalmente, hermafroditas, essa última comum em hastes separadas, raro na mesma inflorescência e inférteis (Figura 3). A inflorescência é produzida a partir das gemas dos nós nas laterais do pseudobulbo, perto da base, sendo racemosa, ereta, curvada ou pendente, geralmente apresenta muitas flores masculinas quando comparadas com as femininas (Hoehne, 1938).



Figura 3: Flores de *Catasetum* (A) femininas, (B) flores masculinas e (C) hermafroditas. Fonte da imagem: Do autor.

O *Catasetum* apresenta flores masculinas (Figura 4) de formatos variáveis, são normalmente de cores vistosas e ocasionalmente verdes, com coluna espessa, semi-rolíça e ereta, com antenas voltadas para baixo, próximas ao estigma, cuja função é expelir o polinário contendo células em tétrades aglutinadas em número de 2 à 8 polínios, (Hoehne, 1933, 1942; Singer, 2019).

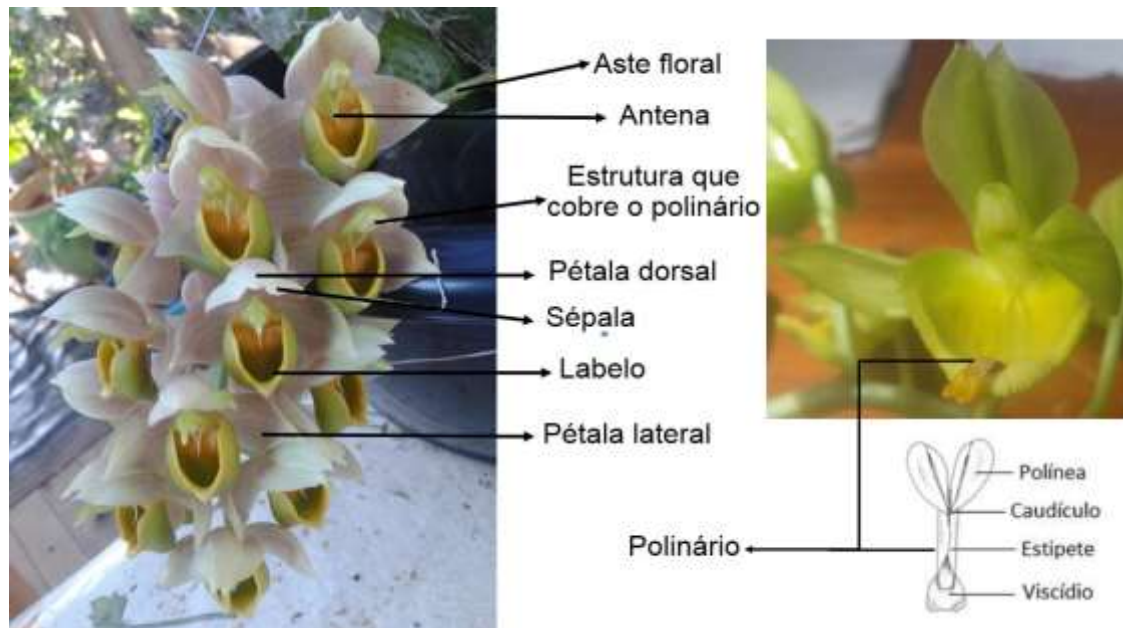


Figura 4: Flor masculina de *Catasetum* e suas estruturas. Fonte da imagem: Do autor.

As pétalas e sépalas são inteiramente livres, normalmente curvadas para trás, acanoadas ou coniventes. O labelo é carnoso, sésil e muito variável em formato nas flores masculinas, mas saquiforme nas femininas (Hoehne, 1933; 1938).

As flores femininas (Figura 5), de quase todas as espécies, são de coloração verde e formato bastante parecido, de modo que dificulta a identificação da espécie somente pelas flores femininas. O que dificulta também a identificação desse tipo de planta são os pseudobulbos, que são muito parecidos (Hoehne, 1942).

O gineceu tricarpelar, unilocular, fundido ao androceu em um ginostêmio, dando origem à coluna; óvulos diminutos numerosos. Os frutos são do tipo cápsulas secas; sementes puerulentas, diminutas, sem endosperma (Hoehne, 1942).

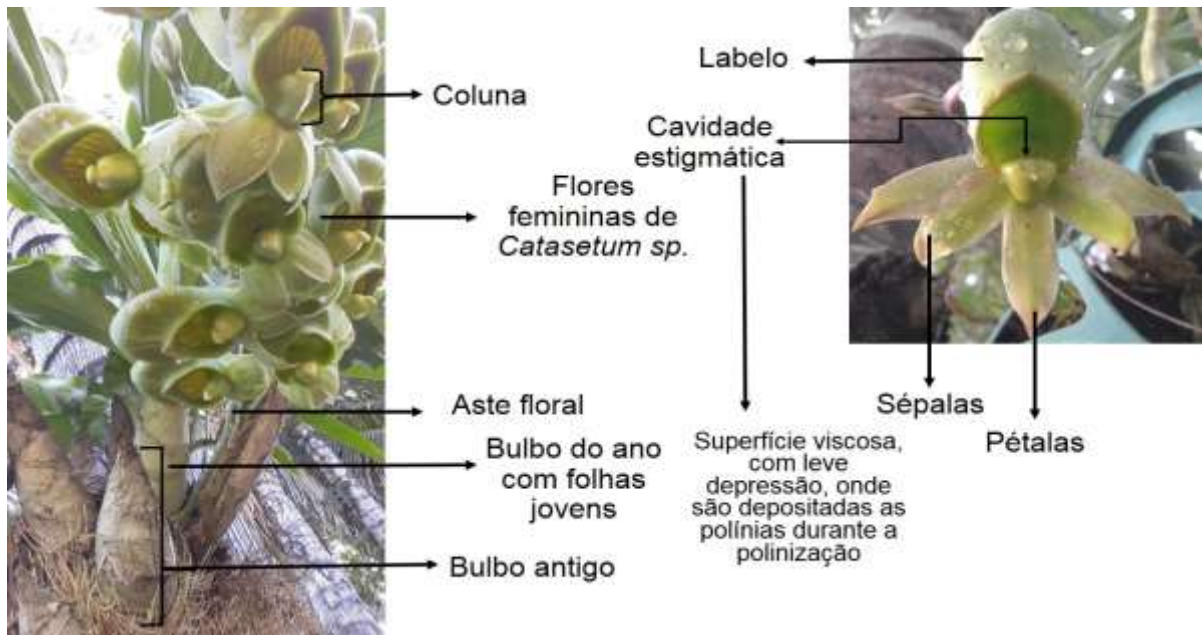


Figura 5: Flor feminina de *Catasetum* sp. e suas partes. Fonte da imagem: Do autor.

Devido ao dimorfismo, a polinização em *Catasetum* é cruzada. Os principais insetos polinizadores das orquídeas são geralmente os indivíduos machos das abelhas (Figura 6) *Euglossini* (Singer, 2019). A abelha *Euglossosa* sp. e a *Eulaema* sp., ao procurar alimento e substâncias aromáticas no labelo da orquídea, acabam por tocar nas antenas da flor, que promove o desprendimento e disparo das políneas, as quais atingem geralmente o dorso do inseto se fixando pelo viscidio (Dodson 1962, Hoehne 1933, 1942; Oliveira et al., 2006).

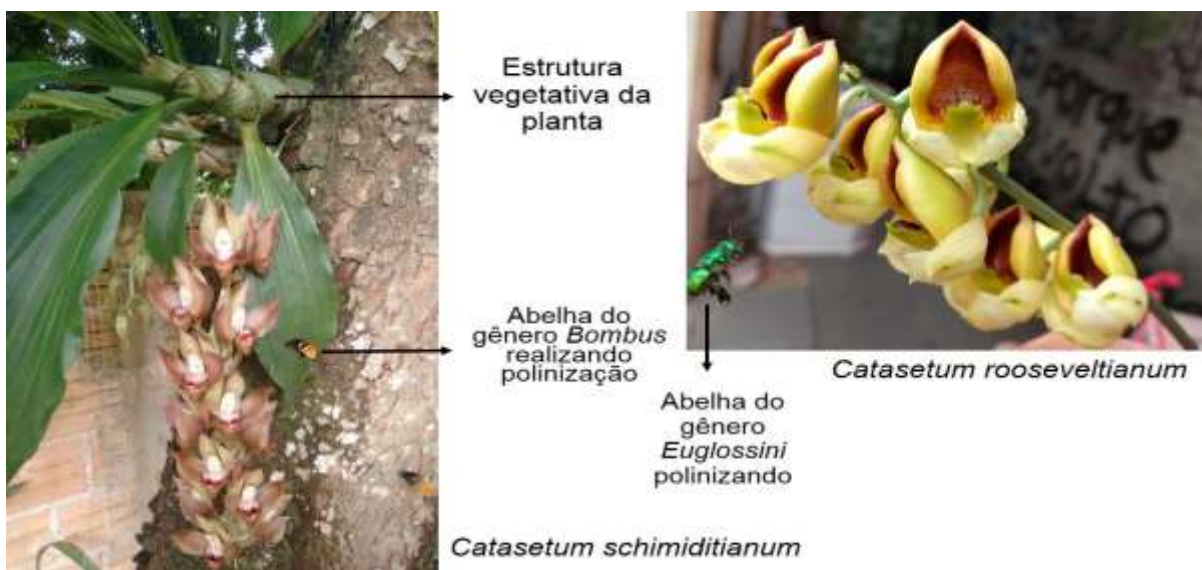


Figura 6: Flores masculinas de *Catasetum* sendo polinizadas. Fonte da imagem: Do autor.

Ao procurar alimento nas flores femininas, o inseto desavisadamente deposita no estigma as políneas, que transporta em seu dorso (Figura 7), realizando a fecundação. Após a flor ser fecundada irá ocorrer a formação de um fruto capsular que abriga milhões de sementes (Hoehne 1933; Grade, 2007).



Figura 7: Estrutura da polínea aderida ao escutelo da abelha operária *M. capixaba* (Moure & Camargo, 1994). Fonte da imagem: Rezende et al., 2008.

2.4.1. *Catasetum atratum* Lindl. (John Lindley, 1838)

Segundo Faria et al. (2016), *C. atratum* é uma planta epífita que apresenta pseudobulbo com altura média de 12,5 cm e diâmetro médio de 6cm, de formato fusiforme e obovalados, eretos, de base atenuada e ápice acuminado. Suas folhas lanceoladas, acuminadas, para a base atenuada em pseudo-pecíolo, com nervuras longitudinais apresentando tamanho médio de 31 cm de comprimento e 4 cm de largura.

Sua inflorescência possui tamanho médio de 40cm de comprimento, com formato curvado na extremidade, exibindo em média 14 flores. Essas possuem brácteas de aproximadamente 1,8 cm de comprimento, lanceolartriangulares. A sépala dorsal e lateral medem cerca de 3,2 cm de comprimento por 1,2 cm de largura. A primeira sendo lanceolada, acuminada e a segunda oblanceoladas, acuminadas e recurvadas, ambas de coloração verde, com caixa de máculas vermelho-escuro. As pétalas são oblongas, acuminadas e recurvadas medindo 2,8 cm de comprimento por

1,2 cm de largura, de cor verde, com grandes máculas mais notáveis vermelho-escuro (Petini-Benelli, 2012; Faria et al., 2016).

O labelo é levemente denticulado nas bordas, carnoso, retangular na base com medidas de 2 cm de comprimento por 1,9 cm de largura, o ápice e o lado interno da cavidade são esbranquiçados. A coluna mede em torno de 1,75 cm de comprimento, obtusa, ereta e espessada na parte superior, o ápice é rostrado com antenas paralelas e eretas, alcançam o fundo do saco do labelo, medindo 2 cm de comprimento, cruzadas. Floresce entre os meses de novembro a maio (Petini-Benelli, 2012; Faria et al., 2016).

C. atratum é endêmica do Brasil ocorrendo preferencialmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e no Mato Grosso (Figura 8). Nesses estados, é uma planta que está entre as espécies ameaçadas pela degradação de seu habitat e coleta indiscriminada pelo seu potencial ornamental (Colombo et al., 2004; Petini-Benelli, 2012; Barros et al., 2014).



Figura 8: Flor do *C. atratum*. Imagem disponível no site do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR).

2.4.2. *Catasetum albovirens* Barb. Rodr. (Barbosa Rodrigues, 1877)

C. albovirens são plantas epífitas com pseudobulbos chegando a 16 cm de comprimento com 3,5 cm de diâmetro, de coloração verde, quando com folhas, e marrom, quando maduro, ou, após a senescência das folhas, as quais são de coloração verde levemente descorada, chegando a medir até 50 cm de comprimento e 5 cm de largura. A inflorescência pode chegar a ter até 34 flores com o maior comprimento de 24 cm. As flores são de coloração marrom-rosadas ou marrom-avermelhadas (Engels, et. al., 2016), conforme a figura 9 (SiBBR, 2020). Encontram-se distribuídas nos estados do Amazonas, Pará, Mato Grosso e Maranhão.

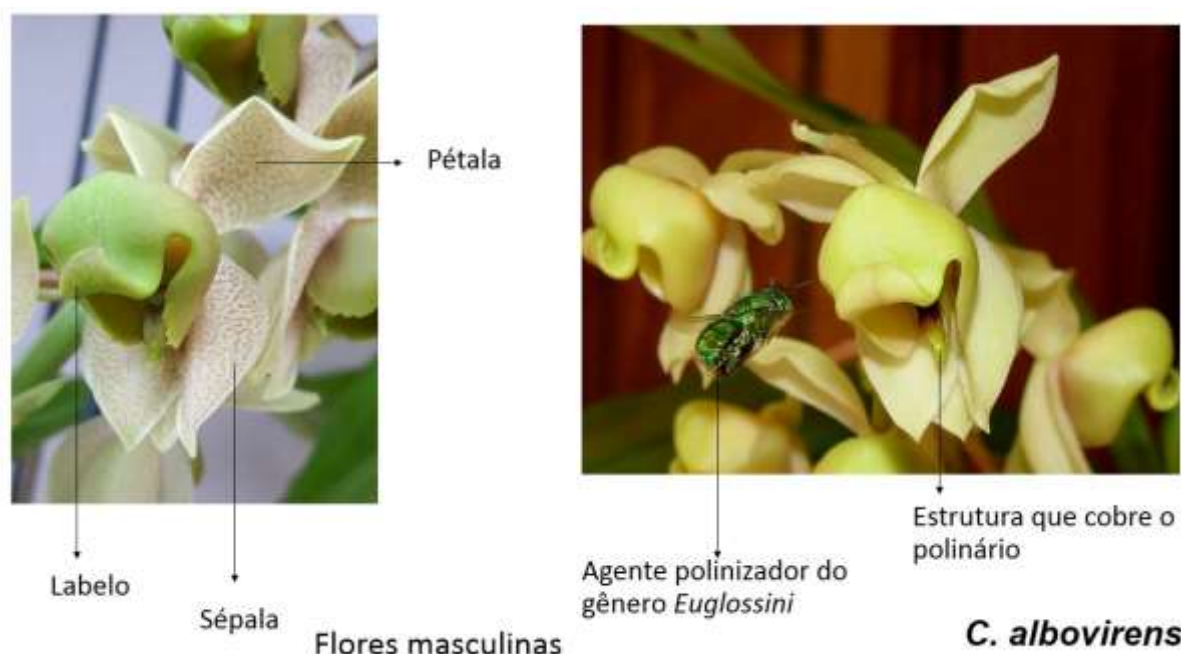


Figura 9: Flor do *C. albovirens*. Imagem disponível no site do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR).

2.4.3. *Catasetum rooseveltianum* Hoehne (Frederico Carlos Hoehne, 1916)

C. rooseveltianum é uma planta epífita com pseudobulbos eretos ou arqueados, delgados, com comprimento médio de 25 cm e 2,5 cm de diâmetro. Suas folhas são estreitas e alongadas, com cerca de 30 cm de comprimento e 5 cm de largura. Os racemos florais podem chegar até 40 cm de comprimento com até 8 flores pequenas de coloração esverdeada e labelo vináceo próximo às margens, as pétalas e sépalas dão a impressão de que ainda estão por abrir (Figura 10). Tem distribuição geográfica

na Bolívia e no Brasil, sendo endêmica do estado de Mato Grosso. Sua floração sob condições de cultivo ocorre entre os meses de março a dezembro (Koch & Silva, 2012; Petini-Benelli, 2012; 2020).

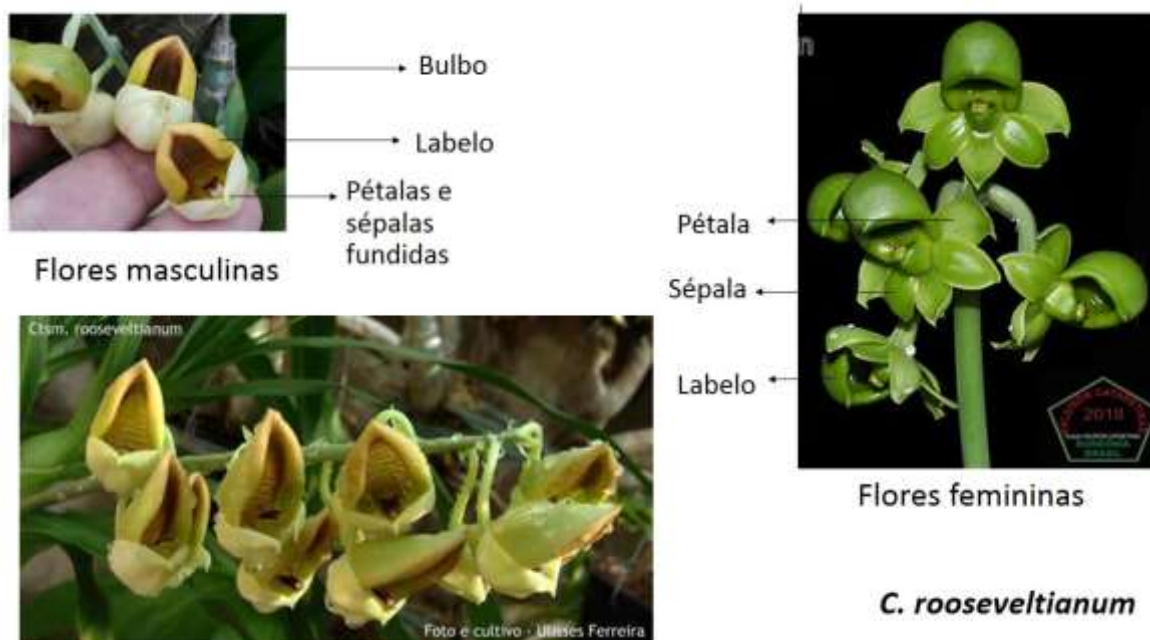


Figura 10: Flor do *C. rooseveltianum*. Imagem disponível no site do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR).

2.4.4. *Catasetum discolor* (Lindl.) Lindl. (John Lindley, 1838)

C. discolor pode apresentar hábito epífita, geralmente em palmeiras de Inajá (*Attalea maripa* (Aubl.) Mart.) e Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), rupícola ou terrestre, suas folhas podem chegar até 50 cm de comprimento, com nervuras salientes e grandes pseudobulbos oblongos. A inflorescência sai da base dos pseudobulbos. Sua floração ocorre entre os meses de junho e novembro, com flores aromáticas que medem aproximadamente 6 cm e duram cerca de sete dias. A coloração é bastante variável, por isso o nome (Figura 11). Está distribuído geograficamente nos estados do Amazonas, Pará, Roraima (Luz, 2001), Maranhão, Ceará, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro (SiBBR, 2020).

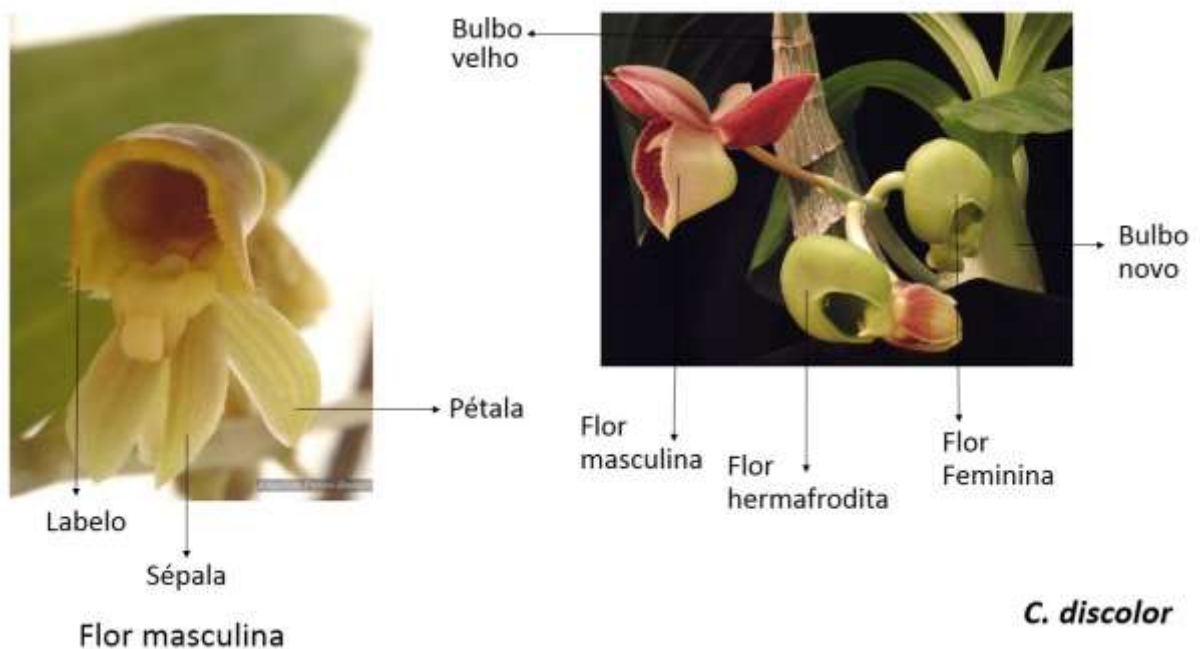


Figura 11: Flor do *C. discolor*. Imagem disponível no site do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR).

2.4.5. *Catasetum. Joaquinianum* Campacci & G. F. Carr (Marcos Antonio Campacci & George Francis Carr Jr., 2011)

C. joaquinianum é uma planta epífita encontrada no estado de Minas Gerais, na região de Mata Atlântica, em altitudes em torno de 900 metros. A planta é de pequeno porte, apresenta pseudobulbo oblongo-fusiforme, com cerca de 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. As folhas são oblongo-lanceolados, margens onduladas, com aproximadamente 25 cm de comprimento e 5 cm de largura. Sua inflorescência racemosa, arqueada, sai da base do pseudobulbo, com cerca de 30 cm de comprimento com até 12 flores (Figura 12), semelhante ao *C. fimbriatum*, mas se difere sempre por ser verde e nunca ter manchas, enquanto o *C. fimbriatum* é mais comumente amarelo com pétalas e sépalas manchadas de roxo ou marrom (Petini-Benelli, 2020).



Figura 12: Flor do *C. joaquinianum*. Imagem disponível no site do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR).

2.4.6. *Catasetum hopkinsonianum* G. F. Carr & V. P. Castro (George Francis Carr Jr. & Vitorino Paiva Castro, 2008)

C. hopkinsonianum ocorre nos estados de Rondônia e Mato Grosso. Têm hábito epífita em floresta ciliar ou de galeria, pseudobulbos de aproximadamente 7 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro. Folhas com até 30 cm de comprimento e 6 cm de largura. A inflorescência é do tipo racemo, basal, arqueada com flores nos dois terços superiores, com, no máximo, 40 cm de comprimento (Figura 13) (Petini-Benelli, 2020).



Figura 13: Flor do *C. hopkinsonianum*. Imagem disponível no site do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr).

2.5 Importância ecológica e econômica

As plantas do gênero *Catasetum* desempenham significativo papel na ecologia das regiões tropicais, são consideradas bioindicadores da conservação dos ecossistemas florestais (Menine Neto et al., 2009).

Apesar de muitas espécies serem cultivadas, um grave problema para a família é a ação antrópica, 1/3 das espécies estão ameaçadas de extinção devido ao desmatamento desordenado, fragmentação das áreas nativas, mineração, pecuária, poluição, retirada ilegal e tráfico de espécies vegetais para fins comerciais (Forn-Martinez et al., 2011; CNC Flora, 2019).

As orquídeas apresentam estruturas florais e vegetativas bastante atraentes comercialmente, sendo consideradas com grande potencial de comercialização (Roberts & Dixon, 2008).

Elas têm exercido grande destaque no comércio mundial, no ano de 2009 chegavam a apresentar cerca de 8 % das plantas comercializadas no mercado internacional. Essa atividade encontra-se em expansão e vem ganhando espaço no mercado interno também (Lorenzi & Souza, 2001; Chung et al., 2009).

A floricultura brasileira, desde 2011, é uma atividade econômica importante no agronegócio do país. O potencial da atividade, voltada tanto para o mercado interno como externo, é considerável e oferece oportunidades promissoras em várias regiões do país (Reis, 2019). As orquídeas são plantas ornamentais muito apreciadas e de alto valor comercial (Unemoto et al., 2007).

Orquídeas do gênero *Catasetum* são consideradas plantas ornamentais de grande destaque na orquideocultura, especialmente por suas flores apresentarem formato e cores bastante exóticas, sendo cultivadas em vasos e caxepôs. As espécies cultivadas e comercializadas podem apresentar valores médios de R\$ 30,00 por planta e até R\$ 250,00 por seus híbridos, como, por exemplo, *Catasetum* “João Stivalle var. albo” (Pedroso-de-Moraes et al. 2007). O *C. discolor* e o *C. barbatum* são vendidos com valor médio de R\$35,00 (De Castro Cantuária et al., 2018).

2.6 Ploidia

A ploidia é um importante e natural processo pelo qual cerca de 60% das plantas silvestres e cultivadas na agricultura já passaram (Schifino-Wittmann, 2004). O maior número de cromossomos geralmente favorece uma maior quantidade e tamanho de raízes, folhas, flores e frutos, além da intensificação do colorido, durabilidade e resistência a doenças (Linden, 2008).

De todas as espécies vegetais descritas pela citogenética clássica, cerca de 75% delas já passaram, ao menos uma vez na sua história evolutiva, por um processo de duplicação dos cromossomos, não podendo ser diferente para as orquídeas, no qual são consideradas que cerca de 90% das espécies apresentam poliploidização (Mondin & Docha Neto, 2006).

Esse evento genético, que provoca falhas na segregação dos cromossomos alterando o seu número (Mondin & Docha Neto, 2006), são importantes em estudos de melhoramento genético de plantas (Pagliarini & Pozzobon, 2005; Mondin & Docha Neto, 2006).

Com isso, a cada geração ocorre uma maior variabilidade genética (Pagliarini e Pozzobon, 2005), sendo a poliploidização um dos acontecimentos mais importantes para a evolução e especiação dos vegetais (Félix & Guerra, 2000; Pagliarini e Pozzobon, 2005; Mondin & Docha Neto, 2006).

A poliploidização demonstra um papel significativo na evolução do gênero *Catasetum*, podendo ser a principal causa da alta variação cromossômica (De Oliveira et al., 2014).

Pelo processo de poliploidização pode ocorrer a autopoliploidia e a alopoliploidia. A autopoliploidia é a duplicação dos cromossomos pela espécie, de modo que essa tenha duas cópias do mesmo cromossomo, um vindo do pai e outro da mãe, passando a ter 4, 5, 6, 7 ou mais cópias do mesmo cromossomo. Dessa forma, os autopoliploides são chamados de triploides (3x), tetraploides (4x), pentaploides (5x) e assim consecutivamente, o que significa que eles têm mais do que duas cópias de cada cromossomo (Mondin & Neto, 2006). Em relação aos alopoliploides, ocorre hibridização entre duas espécies diferentes logo após a duplicação cromossômica, dessa maneira, o pareamento ocorre somente entre os cromossomos do mesmo genoma (Sybenga, 1992).

Em espécies vegetais, a poliploidia normalmente promove o gigantismo, alterando uma série de características anatômicas como comprimento e espessura das folhas, acentuação das cores, tamanho dos estômatos, textura e tamanho das flores, bem como o seu período de floração (Mondin & Docha Neto, 2006; Xu et al. 2010), sendo essas características normalmente desejadas em programas de melhoramento genético de plantas e desenvolvimento de novas cultivares de orquídeas (Tang & Chen, 2007) e outras ornamentais (Pompelli et al., 2007).

Pois, organismos poliploides são fontes de muitos genes que podem proporcionar, por exemplo, resistência a doenças e pragas, tolerância ao estresse e variabilidade genética, visto que a poliploidia possibilita uma maior adaptação a novos nichos (Chen, 2007).

2.7 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, uma técnica capaz de medir caracteres de partículas em suspensão, tem sido muito utilizada para estudos diversos em plantas. É capaz de analisar o conteúdo de DNA nuclear de núcleos isolados (Fritsche, 2012), inferir sobre a ploidia relativa das células, o conteúdo de DNA nuclear e o ciclo celular, identificar haploides e duplo haploides, híbridos e polissomatia, detectar aneuploides, estudar a apomixia, acompanhar o desenvolvimento da semente, entre outros, com a vantagem

de estudar um grande número de células em um curto espaço de tempo (Doležel, 1997).

Galbraith et al. (1983) desenvolveu uma técnica onde foi possível realizar a extração de núcleos intactos de células vegetais para análise em citometria de fluxo e promover vários avanços científicos nessa área. O uso dessa ferramenta da citogenética permite o estudo aplicado do genoma nuclear baseado na fluorescência relativa de núcleos corados com fluorocromos específicos, o mais frequentemente usado.

Uma grande vantagem é que a técnica não exige células em fases específicas do ciclo celular, sendo que os resultados permitem a observação de características de todas as células do tecido analisado (Fritsche, 2012).

Essa técnica pode ser caracterizada como uma microfotometria fluorescente dinâmica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, protoplastos, núcleos e cromossomos), impulsionadas pela vazão de um fluido no qual estão em suspensão. As partículas passam através do sítio de medição da fluorescência emitida permitindo análises de alta velocidade, tendo suas propriedades medidas de forma aleatória (Doležel, 1997; Greilhuber, 2007; Moraes, 2007; Clarindo et al., 2008).

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

O conteúdo nuclear de DNA (valor C) é geralmente expresso em picogramas (pg). Para estimar esses conteúdos de DNA de uma determinada espécie deve-se proceder a análise dessa juntamente com uma planta de valor C conhecido (padrão de referência). O DNA nuclear é calculado em função da relação da fluorescência entre as duas espécies (Doležel et al., 1998; Doležel & Bartoš, 2005).

Por meio desse estudo é possível estudar uma grande quantidade de células em um curto espaço de tempo, além de permitir o estudo das células em todos os

estágios de seu desenvolvimento, sendo que os resultados permitem a observação de características de todas as células do tecido analisado (Fritsche, 2012).

Atualmente, já se conhece o conteúdo de DNA nuclear de muitas espécies vegetais e os resultados sugerem que a família *Orchidaceae* é, entre as angiospermas, a que possui maior variabilidade nos conteúdos de DNA nuclear. Para o gênero em estudo, as espécies que têm o tamanho do genoma conhecido estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Genoma conhecido para as espécies do gênero *Catasetum* por análise de citometria de fluxo e citogenética

Espécie	Quantidade de DNA nuclear	Número cromossômico	Autor
<i>Catasetum x altaflorestense</i> Benelli & Grade	6,04 pg	2n=4x=80	Vieira (2013)
<i>Catasetum boyi</i> Mansf.	6,03 pg	2n=3x=54	Vieira (2013)
<i>Catasetum blackii</i> Pabst	6,06 pg	2n=3x=66	Vieira (2013)
<i>Catasetum juruenense</i> Hoehne.	6,06 pg	2n=3x=66	Vieira (2013)
<i>Catasetum schimidtianum</i> Miranda & Lacerda	6,05 pg	2n=3x=54	Vieira (2013)
<i>Catasetum fimbriatum</i> Lindl.	11,34 pg	2n=6x=108	Vieira (2013)

No entanto, acredita-se que a falta de dados para a família *Orchidaceae*, utilizando a técnica da citometria de fluxo, esteja relacionada às dificuldades em se obter estimativas precisas para essa família, possivelmente devido à natureza recalcitrante do tecido (Leitch & Bennett, 2007).

Portanto, um citômetro de fluxo é um equipamento que faz a análise de partículas em suspensão e em movimento, esses fragmentos são excitados com a emissão de luz ultravioleta ou laser e emitem fluorescência em determinados comprimentos de onda. Essa fluorescência é filtrada por uma série de espelhos dicróicos e captada por sensores, os sinais são enviados para um software específico que analisa e converte os sinais em gráficos passíveis de interpretação.

Esses histogramas são construídos em função da intensidade da fluorescência emitida (eixo x) em contraste com o número de células ou partículas que emitiram tal comprimento de onda (eixo y), podendo também outras variáveis serem analisadas, gerando gráficos com mais de dois parâmetros (Ochatt, 2006; Macey, 2007; Fritsche, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Material Vegetal*

As plantas foram adquiridas de orquidários comerciais do Estado de Mato Grosso e cultivadas no Orquidário Alta Florestense – UNEMAT, sob as coordenadas geográficas 9°8608740” S e 56°0682100” W.

3.2 *Análise da citometria de fluxo*

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

Como amostras foram utilizadas folhas jovens de plantas de *C. joaquinianum*, *C. discolor*, *C. hooppkinsonianum*, *C. rooseveltianum*, *C. atratum* e *C. albovirens*.

Como padrão de referência foi utilizado folhas de *Solanum lycopersicum*, que possui como padrão interno: 2C= 1,95 pg de DNA, (Praça-Fontes et al., 2011), cedidas pelo laboratório da UFV.

A extração de núcleos foi feita em conformidade com o protocolo adaptado de Otto (1990), assim, folhas jovens, de cada espécie do gênero *Catsetum*, foram postas em água destilada à temperatura de 4° C, logo em seguida, as folhas foram secadas com papel toalha e cortadas em fragmentos de 2 cm² processadas juntas ao padrão. Os núcleos foram extraídos por retalhamentos (chopping), feitos com lâminas de aço inoxidável em placa de Petri (Galbraith et al., 1983).

O material vegetal foi extraído em placa de Petri contendo 0,5 ml de OTTO-I tampão de lise (Otto, 1990), fazendo o retalhamento das folhas, a suspensão foi mantida por 3 minutos no gelo, para diminuir a ação de compostos fenólicos. A suspensão foi filtrada em filtro verde, em malha de nylon com 30 µm de diâmetro de poro, transferida para microtubo de 2 mL (Partec GmbH, Munster, Alemanha), subsequentemente, 0,5 mL do mesmo tampão foi adicionado com a finalidade de lavar o material vegetal, posteriormente, centrifugada por 5 minutos a 1100 rpm com temperatura média de 5 °C.

O sobrenadante foi removido, deixando cerca de 100µl do tampão sobre o pellet, seguido pela ressuspensão com agitação leve após adição de mais 100µl de tampão OTTO-I. Após 10 minutos de incubação, foi corado com 1,5 ml de solução de OTTO-II (Otto, 1990), suplementado com 75 µM de iodeto de propídio (IP Sigma®) e 50 µg ml⁻¹ de RNase (Sigma®) pH= 7,8.

A suspensão foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos no escuro reagindo com o corante, sendo posteriormente filtrada em filtro laranja com 20 µm de diâmetro de poro.

A suspensão foi analisada com um citômetro de fluxo Partec PAS (Partec GmbH, Munster e Alemanha), equipado com uma fonte de luz a laser (488 nm). A fluorescência IP emitida foi detectada por filtro de passagem da banda RG 610 nanômetros (nm).

Os histogramas de intensidade de fluorescência relativa foram avaliados no software FLOWMAX (Partec®). A razão entre as médias dos picos G0/G1 das amostras e do padrão de referência foi calculada e convertida em picogramas (pg) de DNA. Cada amostra foi analisada 3 vezes, com mais de 5000 núcleos analisados.

O tamanho do genoma nuclear foi calculado a partir das leituras dos núcleos em G0/G1, de acordo com a fórmula:

$$V = \left(\frac{L_1}{L_2} \right) \cdot pg$$

Onde:

V: valor do conteúdo de DNA nuclear 2C (pg) de *Catasetum*

L1: leitura média do pico G0/G1 de *Catasetum*

L2: leitura média do pico G0/G1 do padrão

pg: valor do conteúdo de DNA do padrão em picogramas

Para a conversão em pares de bases (bp) considerou-se que 1 pg de DNA corresponde a 0,978 X 10⁹ pb (Dolezel et al., 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos por citometria de fluxo do conteúdo de DNA dos núcleos corados com iodeto de propídio na fase G0/G1, esses apresentaram valores até quatro vezes maior que o padrão *Solanum lycopersicum* (2C = 1,95 pg), sendo que a espécie *Catsetum discolor* apresentou o maior genoma, com 2C = 9,711 pg; e o menor foi obtido por *Catsetum rooseveltianum*, com 2C = 6,063 pg. As espécies *C. hooppkinsonianum*, *C. rooseveltianum*, *C. atratum* e *C. albovirens* apresentaram valores de genoma próximos uns dos outros, os quais podem ser observados abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Quantificação do conteúdo de DNA nuclear, em picogramas (Pg), das espécies analisadas com uso de iodeto de propídeo como fluorocromo e *Solanum lycopersicum* (2C=1,95 pg) como padrão interno

Espécie	DNA (Pg)	Valor de DNA
<i>C. discolor</i>	9,71	2c
<i>C. joaquinianum</i>	8,74	2c
<i>C. hooppkinsonianum</i>	6,18	4c
<i>C. rooseveltianum</i>	6,06	2c
<i>C. atratum</i>	6,15	4c
<i>C. albovirens</i>	6,14	2c

Os resultados obtidos por meio da citometria de fluxo geraram histogramas informativos de boa qualidade. Com base nas análises de citometria, podemos observar que todas as espécies demonstraram picos de valores que são múltiplos entre si, como podemos ver na espécie *C. discolor*, que apresentou picos representativos de núcleos com valores de DNA de 2C, 4C, 6C, 8C e 16C, com maior pico em 2C. Esse resultado indica a existência de células com diferentes níveis de ploidia dentro do mesmo órgão (mixoploidia) nesse caso específico, as folhas de planta adulta (Figura 14) e pentaplóide ($2n = 5x = 90$), como identificado por Silva et al. (2014).

As espécies *C. joaquinianum* (Figura 15), *C. rooseveltianum* (Figura 16), *C. albovirens* (Figura 17) apresentaram picos representativos de núcleos com valores

DNA de 2C e 4C, com maior pico em 2C. O contrário foi observado para *C. hoopkinsonianum* (Figura 18) e *C. atratum* (Figura 19).

Os dados obtidos por meio da análise citométrica para a espécie *C. atratum* demonstra a existência de folhas mixoploides, com pelo menos 2 níveis de ploidia, sendo que a quantidade de células 4C é considerada maior em relação a 2C, como podemos ver no histograma representado na figura 19.

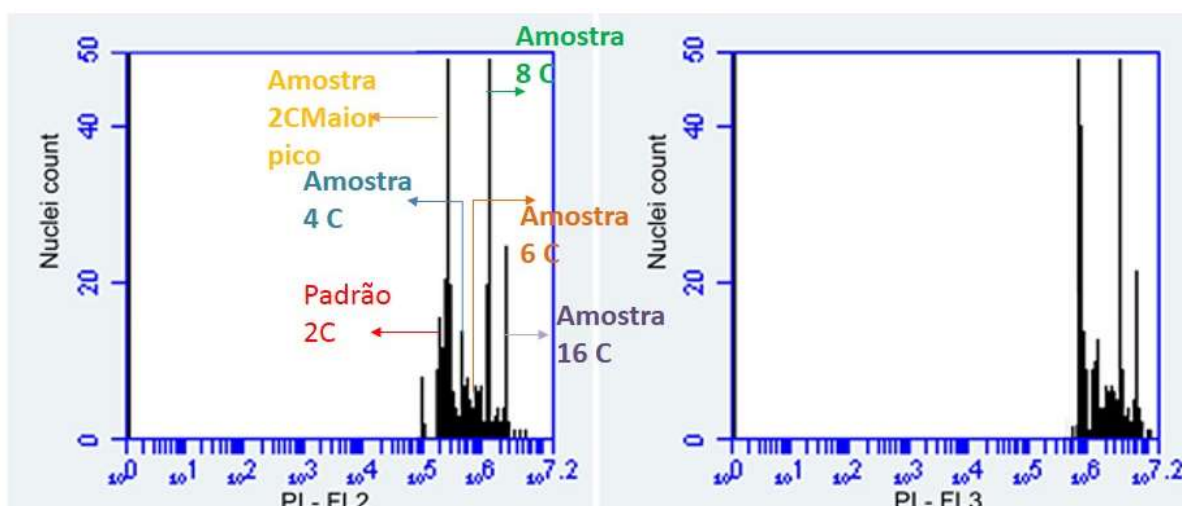


Figura 14: Histograma de intensidade de fluorescência de *C. discolor* – O primeiro pico nos dois histogramas é referente ao padrão interno *Solanum lycopersicum*, o segundo pico maior é da amostra *C. discolor*. PI (Percentual de Interfase). FL2 e FL3 (Filtro 2 e 3). Nuclei cont (número de células contadas).

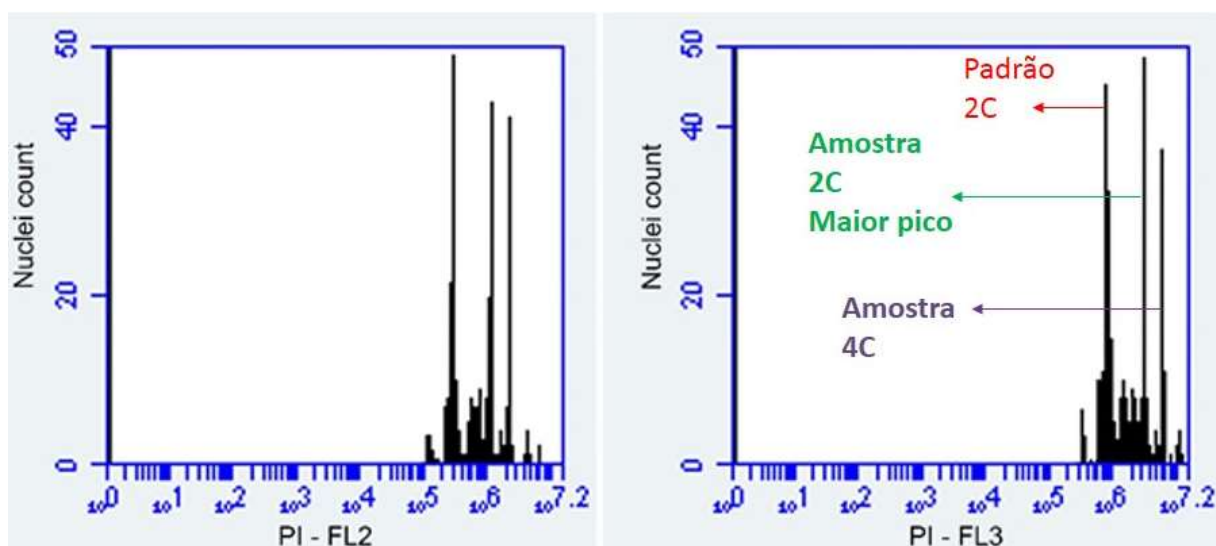


Figura 15: Histograma de intensidade de fluorescência de *C. joaquinianum* – O primeiro pico nos dois histogramas é referente ao padrão interno *Solanum lycopersicum*, o segundo pico maior é da amostra *C. joaquinianum*. PI (Percentual de Interfase). FL2 e FL3 (Filtro 2 e 3). Nuclei cont (número de células contadas).

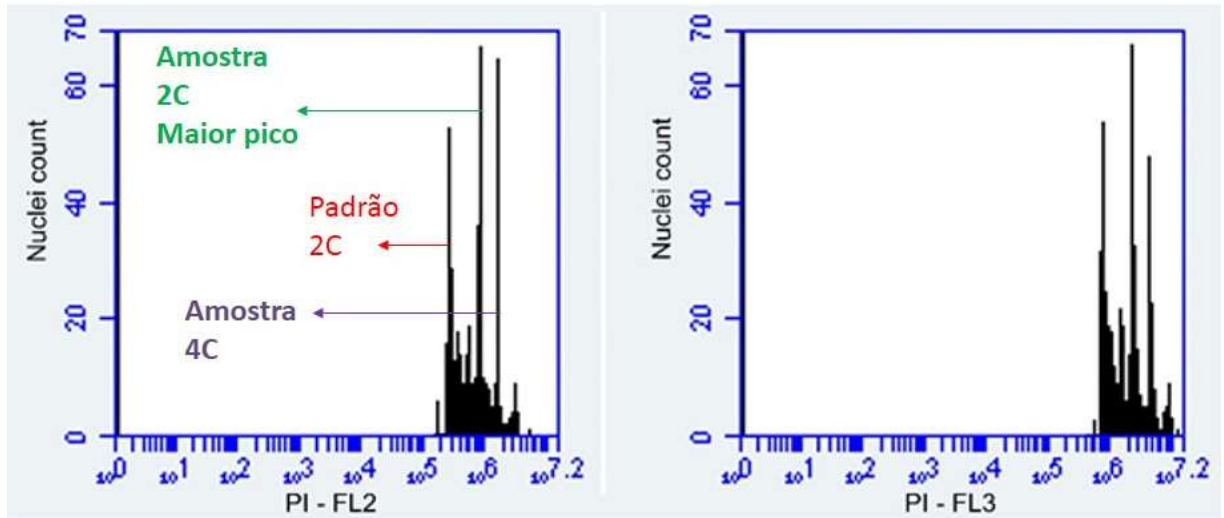


Figura 16: Histograma de intensidade de fluorescência de *C. rooseveltinianum* - O primeiro pico nos dois histogramas é referente ao padrão interno *Solanum lycopersicum*, o segundo pico maior é da amostra *C. rooseveltinianum*. PI (Percentual de Interfase). FL2 e FL3 (Filtro 2 e 3). Nuclei cont (número de células contadas).

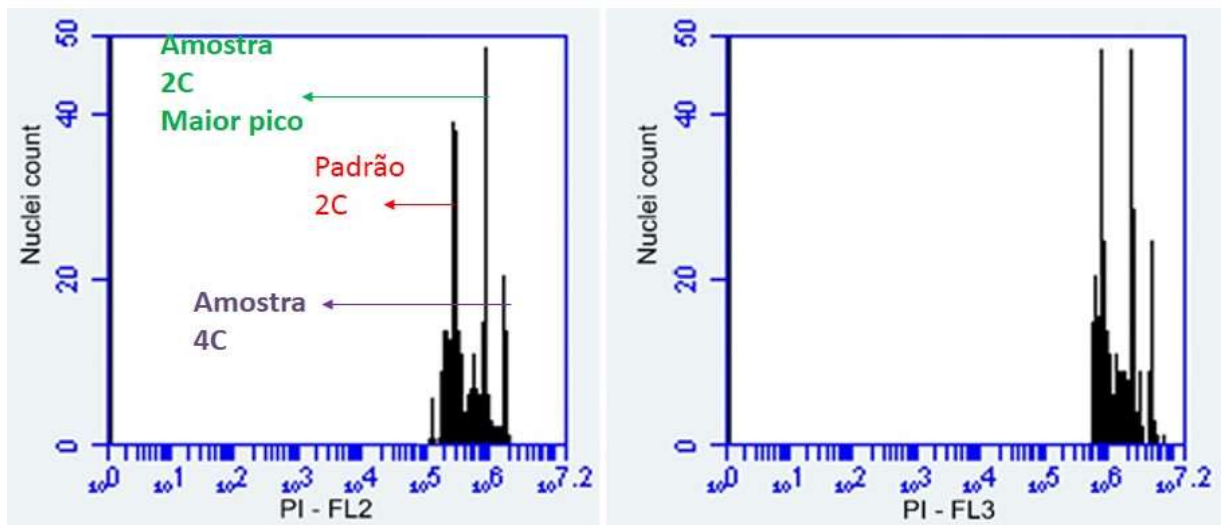


Figura 17: Histograma de intensidade de fluorescência de *C. albovirens*. – O primeiro pico nos dois histogramas é referente ao padrão interno *Solanum lycopersicum*, o segundo pico maior é da amostra *C. albovirens*. PI (Percentual de Interfase). FL2 e FL3 (Filtro 2 e 3). Nuclei cont (número de células contadas).

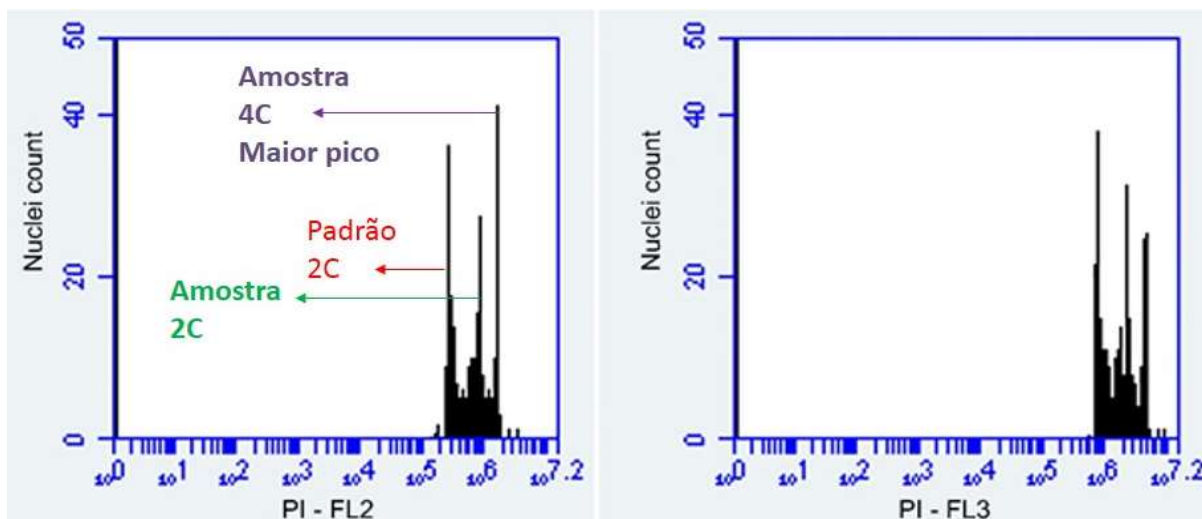


Figura 18: Histograma de intensidade de fluorescência de *C. hooppkinsonianum* - primeiro pico nos dois histogramas é referente ao padrão interno *Solanum lycopersicum*, o segundo pico maior é da amostra *C. hooppkinsonianum*. PI (Percentual de Interfase). FL2 e FL3 (Filtro 2 e 3). Nuclei cont (número de células contadas).

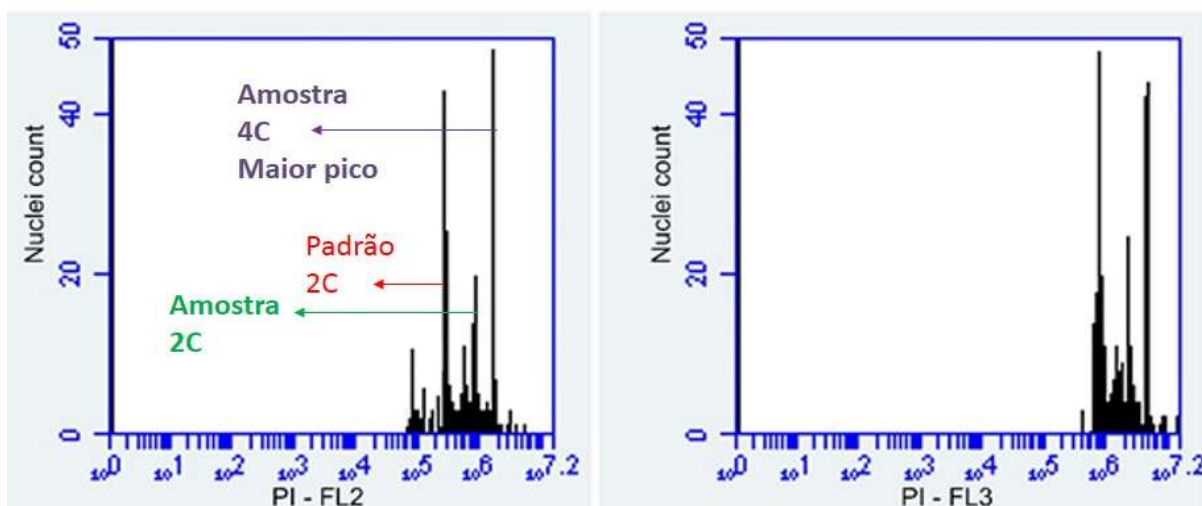


Figura 19: Histograma de intensidade de fluorescência de *C. atratum* – O primeiro pico nos dois histogramas é referente ao padrão interno *Solanum lycopersicum*, o segundo pico menor é da amostra *C. atratum*, o pico maior na sequência é referente às células 4C. PI (Percentual de Interfase). FL2 e FL3 (Filtro 2 e 3). Nuclei cont (número de células contadas).

Ainda são poucos os trabalhos com a quantificação do DNA para *Catasetum*, sendo as avaliações realizadas nesse estudo inéditas, e os valores encontrados se aproximam de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero, como podemos observar em Vieira (2013), que obteve valores aproximados para as espécies *Catasetum x altaflorestense* Benelli & Grade (6,04 pg); *Catasetum boyi* Mansf. (6,03 pg); *Catasetum blackii* Pabst (6,06 pg); *Catasetum juruenense* Hoehne. (6.06 pg) e *Catasetum schimidtianum* Miranda & Lacerda (6,05 pg). Ainda nesse trabalho, a

espécie *Catasetum fimbriatum* Lindl. (11,34 pg) foi a que apresentou maior valor. Tirando por base os resultados encontrados por Vieira (2013), podemos dizer que os valores aqui abordados estão dentro dos vistos para o gênero.

Na família das orquídeas, cerca de 414 espécies têm estimativas do valor C de DNA. Os dados mostram que *Orchidaceae* é a família que apresenta maior variação nos conteúdos de DNA nuclear, com valores entre 0.38 e 55.4 pg (Leitch et al., 2019; Leitch et al. 2009).

Félix & Guerra (2000), ao trabalharem com 44 espécies do clado Cymbidioid, verificaram que o número base $x = 7$, para a subtribo *Catasetinae* Schltr., o número básico $n = 28$, corroborando com os resultados encontrados por De Oliveira et al. (2014), com possível disploidia $n = 27$, assim como para Jones & Daker (1968), o número básico do gênero *Catasetum* é $x = 27$. O número básico $n = 7$ já não é apresentado em muitas espécies de *Orchidaceae*, entretanto vem ser um complemento de haplóides ancestrais. Confirmando, assim, essa disploidia ascendente originária a partir de ancestrais (Félix & Guerra, 2000).

A orquidáceas manifestam uma ampla variação em números cromossômicos, com episódios envolvendo poliploidia e disploidia no qual consiste em alterações do número de cromossomos que não vem acompanhada de mudanças na quantidade de DNA (Félix & Guerra, 2000). As consecutivas variações e aumentos do número cromossômico básico podem estar intimamente relacionados com a ocorrência de aneuploidias, paleopoliploidias e neopoliploidias (Guerra, 2008).

Younis et al. (2013), estudando o gênero *Cymbidium*, observou valores de 12,55 pg (*Cymbidium toyo* Olof Swartz) até 17,75 pg (*Cymbidium toyo tetra* Olof Swartz), para esse gênero a variação foi devido à ploidia, pois esse autor descreve a presença de genótipos diploides ($2n = 2x = 40$), triploides $2n = 3x = 60$) e tetraploides ($2n = 4x = 80$). Jones et al. (1998) verificou a existência de espécies de orquídeas com conteúdo de DNA nuclear de 1,53 pg (*Dendrobium cruentum* Olof Swartz) até 15,19 pg *Vanilla phaeantha* Rchb.f. com 32 cromossomos. Desse modo, podemos afirmar que os valores encontrados nesse estudo estão dentro dos valores estimados por Jones et al. (1998), demonstrando o amplo espectro de genomas existente dentro dessa família.

Essas diferentes variações encontradas para o C-DNA dos *Catasetun* em estudo devem estar relacionadas a algum evento genético como mudanças na

posição do centrômero, tamanho dos cromossomos, translocações robertsonianas ou inversões.

Vieira (2013) afirma que os valores encontrados de quantidade de DNA para as espécies *C. altaflorestense*, *C. boyi*, *C. blackii*, *C. juruenense*, *C. schimidtianum* e *C. fimbriatum* demonstram que as espécies apresentam diferentes níveis de ploidia podendo ser triploides, tetraploides e hexaploides.

Jones et al. (1998), em seu trabalho com a família *Orchidaceae*, verificaram que pode haver uma variação no valor em picogramas de DNA entre espécies do mesmo gênero, tal qual foi verificado entre as espécies avaliadas do gênero *Catasetum*.

Já que diferentes níveis de ploidia sugerem que esse mecanismo evolutivo está ligado às condições do ambiente, que propicia a diversificação ecológica e a ocupação de habitats particulares (Félix & Guerra, 2000; 2005), poliploidia é o tipo dominante de variação cromossômica visto na evolução das plantas, uma vez que, aparentemente, aumenta a variabilidade genética dos indivíduos e favorece uma rápida especiação (Soltis et. al, 2007; Colley & Fischer, 2013).

De acordo com Jones & Daker (1968), poliploidia tem desempenhado um papel importante na evolução da espécie *Catasetum* e pode ser uma das principais causas das suas variações intraespecíficas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fritsche (2012), que verificou 3 picos de fluorescência relativa, nas espécies *Cattleya intermedia* Graham ex Hooke, *Cattleya forbesii* Lindl. ($2n = 54-60$) representando núcleos com quantidades 2C, 4C e 8C de DNA.

Já para a espécie *Epidendrum fulgens* L., Fritsche (2012) observou 4 picos de fluorescência relativa, representando células com conteúdo 2C, 4C, 8C e 16C de DNA, o que corrobora com os resultados encontrados para *C. discolor*, demonstrando, assim, que está ocorrendo endoreduplicação, o que leva a inferir que as ploidias sejam 2C no primeiro pico, 4C no segundo, 8C no terceiro e 16C no quarto.

O processo de endoreduplicação acontece durante a diferenciação de células, tornando-as especializadas na sua morfologia, sendo um processo evolutivo que trouxe benefícios para a planta e desenvolvimento de alguns órgão, como é o caso das folhas suculentas em *Cattleya* e bulbos de *Catasetums*, que armazenam grande quantidade de água internamente (Chevalier et al., 2011).

Com os resultados obtidos nesse estudo, podemos inferir que as espécies *C. joaquinianum* e *C. rooseveltianum* apresentam folhas mixoploides com pelo menos dois níveis de ploidia, apesar de precisarem de confirmação por análises citogenéticas.

A mixoploidia pode ser definida como a presença, em uma mesma planta, de células poliploidizadas juntamente com células diploides, podendo ocorrer de forma natural em diferentes famílias de plantas, como acontece com algumas espécies do gênero *Zephyranthes* (Felix, 2009) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., que contém células na epiderme foliar com núcleos com a quantidade de DNA variando de 2C a 16C e em outras plantas de forma induzida em células cultivadas in vitro (Sedov et al., 2014)

O autor Jones et al. (1998) estimaram o valor C de DNA de *C. forbesii* em 1,65 pg, valor esse muito próximo do encontrado por Fritsche (2012), 1,76 pg. Conforme Leitch et al. (2019), no Plant DNA C-value Database não estão disponíveis estimativas do valor C de DNA para a maioria das orquídeas brasileiras, indicando a insuficiência de pesquisas nesse sentido.

Portanto, a utilização da citometria de fluxo para determinação da quantidade de DNA é um avanço e uma contribuição importantíssima tanto para estudos mais acadêmicos como também para o melhoramento genético especialmente no manejo de grandes coleções de germoplasma e no controle dos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos (Schifino-Wittmann, 2001).

5. CONCLUSÕES

A citometria de fluxo mostrou-se um bom método para determinação do conteúdo de DNA nuclear das espécies de *Catasetum* por sua rapidez, eficiência e acurácia.

As informações obtidas nesse estudo são importantes para auxiliar programas de melhoramento genético com as espécies visando o cruzamento e obtenção de híbridos, já que se verificou a semelhança na quantidade de DNA nuclear, bem como base para outras áreas de pesquisa como a sistemática e a evolução.

Recomenda-se o estudo complementar citológico, molecular e filogenético das espécies do gênero *Catasetum* avaliadas nesse trabalho.

6. REFERÊNCIAS

BARBOSA RODRIGUES, J. **Genera et species orchidearum novarum**. IC & H. Fleiuss. Rio de Janeiro. 1877.

BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB31958>>. Acesso em: 18 Dez. 2015.

BARROS, F.; HALL, C. F.; NETO, V. B. de P.; BATISTA, J. A. N. Checklist of the Orchidaceae from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Iheringia - Serie Botanica**. v. 73: p. 287–296, 2018.

BARROS, F.; VINHOS, F., RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, BASTOS, C. A. & VAN DEN BERG, C. Flora of Bahia: *Catasetum* (Orchidaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**. v. 12, n. 1: p. 83-89, 2012.

BENELLI, A. P. & SOARES-LOPES, C. R. A. A new species of *Catasetum* (Cymbidieae, Epidendroideae, Orchidaceae) from the Southern region of the Brazilian Amazon. **Phytotaxa**. v. 204, n. 1: p. 75-79, 2015.

BENELLI, P. A., **Orquídeas de Mato Grosso: Genus *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth**. Rio de Janeiro: CTRL. p.129. 2012.

BENNETT M. D & LEITCH, I. J. Plant genome size research: A field in focus. **Ann. Bot.** 95: 1-6, 2005.

BUDKE, J. C.; GIEHL, E. L. H.; ATHAYDE, E. A.; ZÁCHIA, R. A. Distribuição espacial de *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (Orchidaceae) em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 18, n. 1: p. 31-35, 2004.

BUZATTO, C. R.; SINGER, R. B.; VAN DEN BERG, C.. O gênero *Capanemia* Barb. Rodr.(Oncidiinae: Orchidaceae) na Região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, n. 4: 2010.

CARDOSO J. C. *Laeliocattleya* 'Brazilian Girl Rosa': cultivar de orquídea para cultivo em vaso. **Horticultura Brasileira**. v. 28: 378-381. 2010.

Catasetum albovirens in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/catasetum_albovirens>. Acesso em 13-02-2020

Catasetum atratum in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/catasetum_atratum>. Acesso em 13-02-2020

Catasetum discolor in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/catasetum_discolor>. Acesso em 13-02-2020

Catasetum joaquinianum in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/catasetum_joaquinianum>. Acesso em 13-02-2020

Catasetum rooseveltianum in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/catasetum_rooseveltianum>. Acesso em 13-02-2020

CHASE, M. W., CAMERON, K. M., FREUDENSTEIN, J. V., PRIDGEON, A. M., SALAZAR, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society**. 177(2): 151-174. 2015.

CHEN, Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. **Annual Review of Plant Biology**. v.58: p.377-406, 2007.

CHUNG, L. & MOORE, S. D. Neuropeptides modulate compound postsynaptic potentials in basolateral amygdala. **Neuroscience**. v. 164, n. 4: p. 1389-1397, 2009.

CNC FLORA. **Centro Nacional de conservação da flora**. Disponível em:<<http://cncflora.jbrj.gov.br/>>. Acessado em: 16 de Agosto de 2019.

COLLEY, E.; FISCHER, M. L. Especiação e seus mecanismos: histórico conceitual e avanços recentes. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**. v. 20, n. 4: p. 1671-1694, 2013.

COLOMBO, O L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no

enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**. Maringá. v. 6. n. 2: p. 253-258. 2004.

COSTA, M. A. P. C.; et. al. Micropropagação de Orquídeas. In: JUNGHANS, T. G.; ALBERTO, A.; OLIVEIRA, R. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2ª ed. revista e ampliada – Brasília, DF: Embrapa, 2013.

DA SILVA, M. F., DA SILVA, J. B., ROCHA, A. E., OLIVEIRA, F. P., GONÇALVES, L. S., SILVA, M. F. D., & DE QUEIROZ, O. H. Inventário da família Orchidaceae na Amazônia brasileira: parte I. **Acta Botanica Brasilica**. v. 9, n. 1: p. 163-175, 1995.

DE CASTRO CANTUÁRIA, P.; MEDEIROS, T. D. S.; LIMA, R. B., CANTUÁRIA, M. F.; DE ALMEIDA, B. R. D. F.; NETO, B. D.; DE ALMEIDA, R. DE F.; DE CASTRO CANTUÁRIA, P.; SOARES, N. R. M. DA SILVA, J. B. F. O Potencial Econômico das orquídeas do Amapá. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**. v. 1, n. 1: p. 43-54, 2018.

DE CASTRO CANTUÁRIA, P.; P., MEDEIROS, T. D. S.; LIMA, R. B.; CANTUÁRIA, M. F.; DE ALMEIDA, B. R. D. F.; NETO, B. D.; DA SILVA, J. B. F. O Potencial Econômico das orquídeas do Amapá. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**. v. 1, n. 1: p. 43-54, 2018.

DE OLIVEIRA, V.M.; BARROS, F.; FORNI-MARTINS, E.R. Chromosome Numbers and Karyotypes of *Catasetum* species (Orchidaceae). **Plant Biosystems-Na Internacional Journal Dealing with all Aspectd of Plant Biology**, v. 148, n. 3, p. 499-507, 2014.

DODSON, C. H. Pollination and variation in the subtribe Catasetinae (Orchidaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v.49. p.35-56. 1962.

DOLEZEL J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Applied Genet** v.38. p.285-302. 1997.

DOLEZEL J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: Lelley T (ed) **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Universitats verlag, Vienna. p.80-90. 1998.

DOLEZEL, J. & BARTOS, J.. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110. 2005.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 51, n. 2, p. 127-8. 2003.

DRESSLER, R. L. How many orchid species?. **Selbyana**. v.26. p.155-158. 2005.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Theodore R. Dudley (ed.). Oregon: Discords Press Portland. p.327. 1993.

DRESSLER, Robert L. et al. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981.

ENGELS, M. E., ROCHA, L. C. F. & PETINI-BENELLI A. A new species of *Catasetum* (Orchidaceae, Epidendroideae, Cymbidieae) from the southern Brazilian Amazon. **Ankesteriana** v.16, n.3, p.329-333, 2016. doi: Disponível em <<http://dx.doi.org/10.15517/lank.v16i3.26976>>.

FARIA, R. T., COLOMBO R. C., OLIVEIRA L.V. R., CAMOLESI M. R. **Orquídeas do Gênero Catasetum no Brasil**. Londrina: Mecenasa. 160p. 2016.

FELIX, L. P. & GUERRA, M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, v. 254, n. 3-4, p. 131-148, 2005.

FELIX, L. P. & GUERRA, M. S. O cariótipo de *Nhotoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e nos sítios de rDNA. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. v. 35, p-283-289, 2000.

FELIX, W. J. P. **Caracterização citogenética em espécies do gênero Zephyranthes Herb.(Amaryllidaceae)**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. Tese de Doutorado.

FERREIRA, U. L. C. & FILHO, R. M. DE C. Two new natural hybrids in *Catasetum* (Orchidaceae) from Brazil. **Richardiana**, v. 3, p.39-49, 2019

FRITSCHKE, Y. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2012. 138p. Dissertação (Mestrado)

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

GALDIANO-JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. GOVAERTS, R., BERNET, P., KRATOCHVIL, K., GERLACH, G., CARR, G., ALRICH, P., PRIDGEON, A.M., PFAHL, J., CAMPACCI, M.A., BAPTISTA, D. H., TIGGES, H., SHAW, J., CRIBB, P., GEORGE, A., KREUZ, K., WOOD, J. **World Checklist of**

Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the internet. Disponível em <<http://apps.kew.org/wcsp/>> acesso em 18 de agosto de 2019.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIRO, J. Nuclear DNA Content Measurement. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. 1st ed., p.67-99. WILEY, 2007.

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

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. London: B T Batsford. 1993.

HOEHNE, F.C. Contribuição para o conhecimento do gênero *Catasetum* Rich. e especialmente o hermafroditismo e trimorfismo das suas flores. **Boletim de Agricultura**. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do estado de São Paulo, p. 3-66. 1933.

HOEHNE, F.C. Orchidaceas. In: F.C. Hoehne (ed.). **Flora Brasílica**. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. v. 12. p.1-218. 1942.

JONES, K. & DAKER, M. G., The chromosome of orchids: III *Catasetinae* Schltr. **Kew Bulletin**. v. 22, p.421-427. 1968.

JONES, W. E.; KUEHNLE, A. R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA Content of 26 Orchid (Orchidaceae) Genera with Emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, v. 82, n. 2: p. 189-194, 1998.

KOCH, A. K. & SILVA, C. A. **Orquídeas nativas de Mato Grosso**. Cuiabá: Carlini & Caniato Editorial. 2012.

LEITCH I. J.; JOHNSTON, E.; PELLICER, J.; HIDALGO, O.; BENNETT, M. D. **Angiosperm DNA C-values database** (release 9.0, Apr 2019) <https://cvalues.science.kew.org/> acesso 15 de fevereiro de 2020.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. L. **In situ hybridization: a practical guide**. Bios Scientific Publishers Ltd, 1994.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome Size and its Uses: the Impact of Flow Cytometry. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. 1st ed., p.153-174. WILEY, 2007.

LEITCH, I.J.; KAHANDAWALA, I.; SUDA, J.; HANSON, L.; INGROUILLE, M.J.; CHASE, M.W.; FAY, M.F. Genome size and Diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany* v.10: p.469-481. 2009.

LINDEN, R., **Algoritmos genéticos**. 2nd ed. Brasport, 2008.

LINTHOINGAMBI, L.; DAS, A.K.; GHOSH, S.K.; SINGH, P.K. **Orchidaceae family in Imphal East, Manipur**. *International Journal for Innovative Research in Science and Technology* v.1: p.183-185, 2015.

LORENZI, H. & SOUZA, H. M de. Plantas ornamentais do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 2001.

LUZ, F. J. de F. **Orquídeas na Amazônia**. Boa Vista, Roraima. Editora On line. ed.1. p.1-65. 2001.

MACHADO, E. F. *Catasetum* – uma orquídea diferente. **Mundo das Orquídeas**, nº 4: p.5-6. 1998.

MARTINEZ, D.M. **Estudios de germinación *in vitro* e *in situ* de *Epidendrum parkinsonianum* Hook. y *Acineta barkeri* (Bateman) Lindl. (Orchidaceae)**. Universidad Veracruzana. 2011. 125p. Tesis (Maestro En Ecología Tropical)

MATTIUZ, C. F. M.; RODRIGUES, T. J. D; MATTIUZ, B. Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.12: p.21-30. 2006.

MAURY, C.M. (Org.) **Biodiversidade Brasileira: Avaliação, identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, DF: Ministerio do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Probio, p. 404. 2004.

MENINI NETO, L.; FORZZA, R. C.; ZAPPI, D. Angiosperm epiphytes as conservation indicators in forest fragments: A case study from southeastern Minas Gerais, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 14: p. 3785, 2009.

MEZZALIRA, F. K. & KUHN, B. C. O Prestígio da Família Orchidaceae para o Mundo: Artigo de Revisão. **Revista Pleiade**, v. 13, n. 29: p. 58-68, 2019

MONDIN, M. & DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família orchidaceae. **Orchidstudium**, v.4: p.24-54, 2006.

MORAES, I.C.R. **Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae)**. 64f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, L. C. **Palinologia, citogenética e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe***. Lavras: Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2011. 92p. Dissertação (Mestrado) –

OLIVEIRA, L. C. **Palinologia, citogenética e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe***.Lavras: - Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2011. 92p. Dissertação (Mestrado)

OLIVEIRA, R.; MEDEIROS, P.; LOCATELLI, E.; LOPES, A.; SCHLINDWEIN, C. Abelhas *Euglossini* (Hymenoptera – Apidae) no Centro de Endemismo Pernambuco. In **Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco**. Kátia Pôrto; Jarcilene Almeida-Cortez, Marcelo Tabarelli (org.). Brasília: Ministério do Meio Ambiente. Ed 1, Vol. 1: 239-256. 2006.

OTTO, F. J. DAPI Staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: DARZYNKIEWIEZ, Z.; CRISSMAN, H. A.; ROBINSON, J. P. **Methods in Cell Biology**. San Diego: San Diego Academic Press, 1990. Cap. 10, p. 101-104.

PAGLIARINI, M. S. & POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: PEÑALOZA, A.P.S. **Curso de Citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2005, v 89p.

PEDROSO-DE-MORAES, C., MOURA, E. R. R., SILVA, M. C. & ABDALLA, M. A. As orquídeas e o mercado. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquídeas do Brasil (CAOB)**, v.66: p.36-42. 2007.

PESSOA, E. & ALVES, M. Orchidaceae em afloramentos rochosos do estado de Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3: p. 717-734, 2014.

PETINI-BENELLI, A. & SOARES-LOPES, C. R. A. New taxa of *Catasetum* (Orchidaceae, Catasetinae) from Mato Grosso, Brazil. **Richardiana**, v. 1: p. 33-41, 2017.

PETINI-BENELLI, A. 2020. *Catasetum* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11312>>. Acesso em: 24 fev. 2021

PETINI-BENEILLI, A. *Catasetum apolloi* Benelli & Grade (Orchidaceae): correction taxinomique. **Richardiana**. v.12, n.4: p.153-157. 2012.

PETINI-BENEILLI, A. Novelties in *Catasetum* (Orchidaceae) in the state of Rondônia, Brazil. **Feddes Repertorium**, v. 125, n. 1-2: p. 14-24, 2014.

PETINI-BENEILLI, A. **Un nouvel hybride naturel de *Catasetum*** (Cymbidieae, Epidendroideae, Orchidaceae) du Mato Grosso (Brésil). 2016.

PETINI-BENEILLI, A.. Nova espécie de *Catasetum* para o estado do Amazonas, Brasil. **Orquidário**, v. 30, n. 1-2: p. 26-36, 2016

POMPELLI, M. F.; BRITO, G. G. DE; OTONI, W. C.; GUERRA, M. P. Biotechnologies for ornamental plants: some insights to the Brazilian productive chain. **Journal Of Horticultural Science**, v. 13, n. 1: p. 51- 59, 2007.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; CRUZ, C.D. Revisiting the DNA C-values of the genome size standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7: p. 1183-1191, 2011.

PRESTES, A. L. da C. Levantamento da família Orchidaceae na localidade do Lago Maravilha, município de Porto Velho, Rondônia, Brasil. 2013.

PRIDGEON, A.M., CRIBB, P.J., CHASE, M.W. & RASMUSSEN, F.N. **Genera orchidacearum v. 5. Epidendroideae (Part II)**. Oxford University Press Inc., Oxford. 2009.

RAPOSO, J. G. **A Etimologia a Serviço dos Orquidófilos**. Editora Ave-Maria. São Paulo. v.1. 1992.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? **IX ENCONTRO NACIONAL DA ECOECO**. Outubro de 2011. Brasília - DF – Brasil. Disponível em:< http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4349/1/2011_eve_jnpreis.pdf> acessado em: 16 de Agosto de 2019.

RESENDE, H. C.; CAMPOS, L. A.; FERNANDES-SALOMAO, T. M. Visitation of orchid by *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), bee threatened with extinction. **Neotropical entomology**, v. 37: n. 5, p. 609-611, 2008.

ROBERTS, D. L. & DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, n. 8: p. 325-329, 2008.

ROMERO, G. A. Non-functional flowers in *Catasetum* orchids (Catasetinae, Orchidaceae). **Botanical Journal of Linnean Society**. v.109: p.305-313, 1992.

ROYER, C. A. **Filogenia, riqueza, diversidade e endemismo de *Phymatidium* Lindley (Orchidaceae) e monografia do gênero para o estado do Paraná**. Curitiba Universidade Federal do Paraná. 2013. Dissertação (Mestre em Botânica)

SCAGLIA, J.A.P. Como Classificar Corretamente um *Catasetum*. **O Mundo das Orquídeas**. Ano 2, nº 4, nov/98. São Paulo: Ed. On Line. 1998.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência rural**, v. 31, n. 5: p. 897-902, 2001.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 10, n. 2: 2004.

SCHOENMAKER, K. **Boletim Informativo Ibraflor**. v. 81, 2017.

SEDOV, K. A.; FOMENKOV, A. A.; SOLOV'YOVA, A. I.; NOSOV, A. V.; DOLGIKH, Y. I. The level of genetic variability of cells in prolonged suspension culture of *Arabidopsis thaliana*. **Biology Bulletin**, v. 41, n. 6: p. 493-499, 2014.

SHIRAKI, J. N. & DIAZ, E. M. **Orquídeas**. São Paulo: Prefeitura de São Paulo, Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem. 2012.

SILVA, A. G.; BOLDRINI, R. F.; KUSTER, R. M. Os sumaréis cicatrizantes da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). **Natureza on line**, v. 11: p. 152-154, 2013.

SILVA, A.B.; KARSBURG, I.V.; DAHMER, N. Número Cromossômico de *Catasetum ciliatum* Barb. Rodr. **Estudos**, Goiânia, v. 41, especial: p. 7-12, 2014.

SILVA, G. S. da; & FIGUEIREDO, M. B. *Catasetum maranhense*, um novo hospedeiro de *Sphenospora kevorkianii* (Uredinales). **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2: p. 197-197, 2006.

SILVA, I. V. da, OLIVEIRA, R. M. de, ROSSI, A. A. B., SILVA, A. B. da, OLIVEIRA, D. M. de. Use of anatomical root markers for species identification in *Catasetum* (Orchidaceae) at the Portal da Amazônia region, MT, Brazil. **Acta Amazonica** v.45(1) p.21-28. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201401832>

SILVA, I. V.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A. Anatomia de raízes de espécies de Orchidaceae do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais. **HONFI a**, v.37: p.147-161. 2010.

SILVA, M. F. F. da & OLIVEIRA, A. T. de. **Catasetum cucullatum**, uma nova espécie de Orchidaceae para o estado do Amazonas. Brasil. 1998.

SILVA, M. F. F. da & OLIVEIRA, A. T. de. **Catasetum seccoii**, **Catasetum carrenhianum** e **Catasetum albuquerquei**: novas espécies de Orchidaceae para o Estado do Maranhão. Brasil. 1999.

SILVA, M. F. F. da & OLIVEIRA, A. T. de. SILVA, **Catasetum caxarariense**, **Catasetum osakadianum** e **Catasetum alatum**: novas espécies de orchidaceae Juss. para o Estado de Rondônia, Brasil. 2001.

SINGER, R. B. **Orquídeas brasileiras e abelhas**. Disponível em: <www.webbee.org.br> acessado em: 19 de agosto de 2019.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; ARAUJO, A. G. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum, Agronomy**. v. 33, n. 3: p. 503-507, 2011.

SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., SCHEMSKE, D. W., HANCOCK, J., THOMPSON, J., Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species?. **Taxon**. 56: 13–30. 2007.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer. p 469, 1992.

TANG, C. Y. & CHEN, W.-H. Breeding and Development of New Varieties in Phalaenopsis. In: W.-H. Chen; H.-H. Chen (Eds.); **Orchid Biotechnology**. 1st ed., p.1-22. Toh Tuck Link: World Scientific Publishing, 2007.

UNEMOTO, L. K.; DE FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação in vitro de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 13, n. 2: p. 267-269, 2007.

VIEIRA, A. **Citogenética e Quantificação de DNA de cinco espécies e um híbrido natural do gênero Catasetum**. Universidade Estadual do Estado de Mato Grosso, 2013, 68p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

VIEIRA, T. L.; BARROS, F. de; ROQUE, N. Orchidaceae no município de Jacobina, estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**. v. 41, n. 3: p. 469-482, 2014.

XU, L.; NAJEEB, U.; NAEEM, M. S.; DAUD, M. K.; CAO, J. S.; GONGH, J.; SHEN, W. Q.; ZHOU, W. J.; Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. **Biologia Plantarum**. v.54: p.659-663, 2010.

YOUNIS, A. RYU, K. B., HWANG, Y. J., JEE, S. O., KIM, M. S., KIM, C. K., LIM, K. B. Analysis of chromosomes and nuclear DNA content in nine genotypes of *Cymbidium*. **화훼연구**. v. 21, n. 4: p. 158-161, 2013.