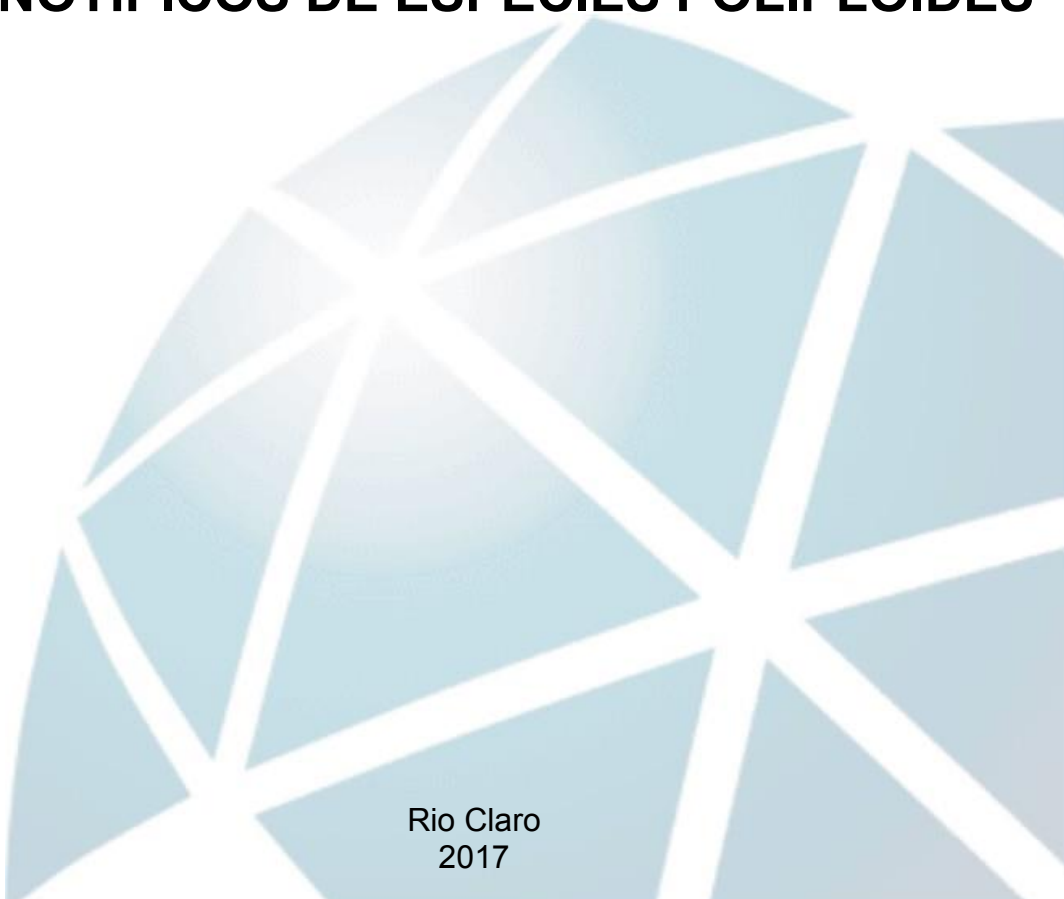

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

YURI FECHIO APOLINÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO ESTOMÁTICA DE
EPIDENDRUM LINDL. (ORCHIDACEAE,
SPARAGALES) PARA SUBSIDIAR ESTUDOS
FENOTÍPICOS DE ESPÉCIES POLIPLÓIDES**



Rio Claro
2017

YURI FECHIO APOLINÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO ESTOMÁTICA DE *EPIDENDRUM* LINDL.
(ORCHIDACEAE, ASPARAGALES) PARA SUBSIDIAR ESTUDOS
FENOTÍPICOS DE ESPÉCIES POLIPLÓIDES**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alessandra Ike Coan

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2017

581.4 Apolinário, Yuri Fecho
A643c Caracterização estomática de Epidendrum Lindl.
(Orchidaceae, Asparagales) para subsidiar estudos fenotípicos
de espécies poliploides / Yuri Fecho Apolinário. - Rio Claro,
2017
36 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Alessandra Ike Coan

1. Anatomia vegetal. 2. Caracterização estomática. 3.
Estudos fenotípicos. I. Título.

SUMÁRIO

RESUMO	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVO	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
4 RESULTADOS	13
5 DISCUSSÃO	15
6 CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS	19
APÊNDICE A – TABELA 1	23
APÊNDICE B – TABELA 2	24
APÊNDICE C – TABELA 3	25
APÊNDICE D – FIGURAS	26

RESUMO

Epidendrum é um gênero de Orchidaceae com uma grande variação morfológica e cromossômica, que o torna interessante para estudos fenotípicos. Segundo alguns autores, essa ampla variação pode estar relacionada com o tamanho genômico das espécies do gênero. O tamanho genômico é a quantidade de DNA presente no núcleo celular, medido em picogramas. Estudos recentes relacionam o tamanho genômico com características fenotípicas, como o comprimento das células-guarda e a densidade estomática. O objetivo do presente estudo foi levantar dados estomáticos (densidade de estômatos e comprimento das células-guarda) e compará-los ao tamanho genômico de maneira inter- e intraespecífica em *Epidendrum*. A obtenção dos dados foi realizada a partir de impressões epidérmicas da superfície abaxial da região mediana das folhas de todos os espécimes amostrados (nove espécies de *Epidendrum* e dez populações distintas de *E. secundum*). A densidade estomática e o comprimento das células-guarda foram mensurados através do software Anati Quanti 2.0 e os dados obtidos foram testados estatisticamente. Nossos resultados para as nove espécies estudadas de *Epidendrum* não corroboram a literatura, mostrando uma correlação negativa entre o comprimento das células-guarda com o tamanho genômico e uma correlação positiva entre a densidade estomática e o tamanho genômico. No entanto, quando analisadas intraespecificamente, no caso das populações de *E. secundum*, essas correlações são inversas, corroborando a literatura. Isso nos mostra que são necessários estudos mais abrangentes com relação ao gênero e que dados de tamanho genômico devem ser utilizados com parcimônia, sem generalizações para caracteres fenotípicos.

Palavras-chave: células-guarda, densidade estomática, folha, genoma.

1 INTRODUÇÃO

Espécies poliploides são aquelas que sofrem mudanças quantitativas no número de cromossomos e na quantidade de DNA nuclear no decorrer da sua evolução (LEWIS, 1980). A poliploidia pode ocorrer devido a uma série de fatores, como a hibridação entre espécies que compartilham o mesmo hábitat, ou por algum erro na divisão meiótica que faz com que o número cromossômico seja multiplicado (GOLDBLATT, 1980; LEWIS, 1980; STEBBINS, 1980). Esses eventos são parte da evolução dessas espécies, aumentando sua diversidade genética e permitindo que as mesmas ocupem novos ambientes e sejam então selecionadas (STEBBINS, 1980; PINHEIRO et al., 2009).

Mesmo em espécies próximas filogeneticamente, que possuem diferenças quanto à ploidia, eventualmente pode haver formação de híbridos, possibilitando o fluxo gênico, como já relatado para espécies de diferentes táxons de angiospermas, como *Helianthus* e *Senecio* (Asteraceae) (WHITNEY; RANDELL; RIESEBERG, 2006; CHAPMAN; ABBOT, 2010), *Iris* (Iridaceae) (MARTIN et al., 2006), e muitos gêneros de Orchidaceae, como *Orchis* (SCACCHI; DE ANGELIS; LANZARA, 1990; COZZOLINO et al., 2006), *Dactylorhiza* (HEDRÉN, 1994), *Liparis* (CHUNG; NASON; CHUNG, 2005) e *Epidendrum* (PINHEIRO et al., 2010).

Estudos fenotípicos acerca do fluxo gênico entre as espécies são necessários, pois permitirem analisar os efeitos estruturais e morfológicos do fluxo gênico entre populações tanto de espécies puras, quanto nos híbridos formados (PINHEIRO et al., 2010). Mas como relacionar aspectos fenotípicos com a ploidia das plantas?

1.1 Tamanho genômico

Como a ploidia é algo muito variável, foi necessário o estabelecimento de uma ferramenta de medida mais confiável para esse tipo de estudo. As alterações no número cromossômico não necessariamente refletem mudanças no tamanho do genoma, pois a poliploidia também pode ocorrer pelo desprendimento de parte de um cromossomo. O tamanho genômico é a quantidade de DNA encontrada no núcleo celular, medida em picogramas. Essa medida é confiável e revela resultados mais robustos, pois, ao contrário da ploidia que evidencia somente o número de cromossomos e não o tamanho desses

cromossomos, o tamanho genômico vai lidar com a quantidade de DNA presente no genoma (COX et al., 1998). Esses dados são coletados através da técnica de citometria de fluxo.

Esta técnica tem sido atualmente muito utilizada em taxonomia para examinar os níveis de ploidia e tamanho genômico (DOLEZEL, 1997; BAINARD; FAZEKAS; NEWMASER, 2010; MALKASSIAN et al., 2011; PRAÇA-FONTES et al., 2011). Apesar de produzir resultados robustos e confiáveis, seu uso ainda é restrito porque este tipo de análise utiliza amostras de tecido fresco, dificultando a investigação de espécies que ocorrem em regiões geográficas remotas ou oriundas de localidades distantes dos laboratórios onde as análises são realizadas.

Alguns estudos têm investigado possíveis correlações entre o tamanho do genoma de uma espécie, suas adaptações ecológicas e seus caracteres fenotípicos (KNIGHT; MOLINARI; PETROV, 2005; KNIGHT; BEAULIEU, 2008). Dentre esses caracteres, vale destacar o tamanho celular e sua relação com o tamanho do genoma (MIRSKY; RIS, 1951; BENNETT, 1972; PRICE; SPARROW; NAUMAN, 1973). Nos diferentes grupos vegetais já estudados, observa-se, particularmente, a existência de uma correlação positiva entre o tamanho das células-guarda dos complexos estomáticos e o tamanho do genoma (MASTERSON, 1994; KNIGHT; BEAULIEU, 2008; HODGSON et al., 2010; XING et al., 2011).

Se essa correlação existe, a inferência da quantidade de DNA dos núcleos através da medição das células-guarda pode facilitar de maneira significativa a análise da delimitação de táxons, de ploidia de indivíduos de populações naturais, entre outros aspectos. Especialmente ao se considerar a técnica usual de estimativa de conteúdo de DNA, a citometria de fluxo.

Muitas variações ecológicas parecem estar altamente correlacionadas com o tamanho do genoma, por darem origem, mais diretamente, às alterações de controle de quantidade de DNA nuclear no volume celular (CAVALIER-SMITH, 2005). A abertura estomática permite o contato direto entre a planta e o meio, e seu tamanho máximo é determinado primariamente pelo comprimento das células-guarda, sendo que este comprimento, por sua vez, é determinado pelo tamanho do genoma (HODGSON et al., 2010). Desse modo, as variações ecológicas correspondentes ao ambiente que as plantas

ocupam podem estar interligadas ao tamanho das células-guarda e corresponder, positivamente, a um aumento no tamanho do genoma dessa espécie.

Franks et al. (2012) correlacionaram o tamanho genômico encontrado em briófitas e pteridófitas fósseis com a concentração de dióxido de carbono presente na atmosfera de eras geológicas passadas. Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), o comprimento das células-guarda é diretamente proporcional ao tamanho genômico – essa evidência foi observada em experimentos nos quais na medida em que se aumentava o tamanho genômico, conseqüentemente o comprimento das células-guarda também aumentava proporcionalmente (LOMAX et al., 2008). Este foi o mesmo tipo de relação encontrada por Jordan et al. (2014) quando compararam o tamanho genômico com o comprimento das células-guarda de 67 espécies de Proteaceae.

Poucos trabalhos de investigação da correlação entre os tamanhos do genoma e das células-guarda foram realizados para Orchidaceae, embora tais estudos tenham sido realizados em níveis intraespecíficos para *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (BORY et al., 2008) e em níveis genéricos em *Polystachya* (RUPP et al., 2010). Além do tamanho das células-guarda, a densidade de estômatos na superfície foliar de representantes de Orchidaceae também já foi investigada e correlacionada ao tamanho do genoma (p.e., BEAULIEU et al., 2008; RUPP et al., 2010; XING et al., 2011).

1.2 Orchidaceae

Pertencente à ordem Asparagales, Orchidaceae é considerada a segunda maior família vegetal com cerca de 27.500 espécies distribuídas em 736 gêneros, atrás em riqueza apenas de Asteraceae (THE PLANT LIST, 2013; CHASE et al., 2015). Orchidaceae é uma família altamente especializada devido a sua grande diversidade morfológica, principalmente com relação aos seus órgãos reprodutivos. Os polinizadores são os grandes responsáveis por essa intensa diversidade da morfologia floral, evidenciando estreitas relações coevolutivas (DRESSLER, 1981).

A distribuição da família se estende por todo o globo, porém as maiores riquezas e diversidades de espécies se encontram nas regiões tropicais (DRESSLER, 1993, 2005; CHASE et al., 2005). No Brasil são registradas 2.500 espécies que se concentram principalmente na região sudeste, sendo 64% dessas endêmicas. A grande maioria das

espécies da família é epífita, contudo há alguns exemplares que são terrestres ou rupícolas (BARROS et al., 2015).

Orchidaceae é atualmente subdividida em quatro subfamílias, sendo elas, Epidendroidae, Apostasioidae, Vanilloidae e Orchidoidae (CHASE et al., 2015). Epidendroidae é caracterizada por possuir antera incumbente ou inflexível na maturidade (DRESSLER, 1981) e é considerada a maior dentre as subfamílias de Orchidaceae. É subdividida em 7 tribos, Tiphoreae, Nervilieae, Arethuseae, Malaxideae, Cymbidieae, Vandae e Epidendreae. Todas as tribos são subdivididas em subtribos, porém vale destacar a subtribo de Epidendreae, Laeliinae, que contém o gênero *Epidendrum*. Esta classificação é baseada, principalmente, em dados moleculares (CHASE et al., 2015).

1.3 *Epidendrum*

Dentre as orquídeas tropicais, *Epidendrum* L. é um dos maiores gêneros nos neotrópicos, com aproximadamente 1.400 espécies, que ocorrem desde o Sul da Flórida até o Norte da Argentina (HÁGSATER; SOTO-ARENAS, 2005; CHASE et al., 2015). No Brasil foram registradas cerca de 140 espécies distribuídas em todas as regiões do país (BARROS et al., 2015). A sistemática do gênero é ainda controversa, principalmente devido à grande variação fenotípica encontrada no grupo (PINHEIRO; COZZOLINO, 2013).

As espécies de *Epidendrum* apresentam grande variação morfológica e cromossômica, possuindo, ainda, fracas barreiras reprodutivas, o que permite a ocorrência de hibridações e poliploidias, extensamente documentadas na literatura (p.e., DUNSTERVILLE, 1979; HÁGSATER; SOTO-ARENAS, 2005; PANSARIN; AMARAL, 2008).

Pinheiro et al. (2010) estudaram o nível de interação entre duas espécies de *Epidendrum* (Orchidaceae), *E. fulgens* Brongn. (diploide) e *E. puniceoluteum* F.Pinheiro & F.Barros (tetraploide), e constataram que apesar de serem duas espécies diferentes, ainda acontecia o fluxo gênico entre elas devido à compatibilidade cromossômica e o fato dessas espécies coexistirem no mesmo ambiente.

Epidendrum secundum Jacq. é uma das espécies com maior variação morfológica e cromossômica no gênero, com o valor de n variando de 14 a 40 (ASSIS et al., 2013).

Essa espécie ocorre em diversos ambientes por toda a América do Sul, com populações nos Andes, nos Tepuis da Venezuela, no litoral atlântico, no Cerrado e também na Caatinga (PINHEIRO; BARROS, 2007). Essa ampla distribuição geográfica possibilita que essa espécie sofra irradiação adaptativa, por habitar vários tipos de ambientes diferentes e sofrer diferentes pressões evolutivas. Isso pode explicar a sua grande variação morfológica e cromossômica.

A riqueza de variação morfológica, a diversidade cromossômica, o grande número de interações ecológicas e de eventos de hibridização encontrados em *Epidendrum* fazem do gênero um modelo potencial para estudos interdisciplinares como o presente, de modo a investigar a existência de uma possível correlação entre os tamanhos de genoma e células-guarda e/ou densidade estomática, para propor uma metodologia que possa ser utilizada de modo confiável para distinção de espécies dentro do gênero e mesmo de populações dentro de uma mesma espécie.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivos investigar a existência de correlação entre o tamanho das células-guarda nos estômatos e a densidade destes com o tamanho do genoma intra e interespecificamente em *Epidendrum*. Espera-se observar uma correlação positiva entre o dado estomático e o tamanho genômico, tal qual observado na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo anatômico foi realizado a partir de material botânico coletado previamente pelo pesquisador colaborador Dr. Fábio Pinheiro, cujos vouchers encontram-se depositados no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (SP), com exemplares em cultivo no Jardim Botânico da mesma Instituição (Tabela 1).

Amostras de cinco folhas (entre os quinto e sexto nós) de cada espécie/espécime foram fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em etanol 70% com algumas gotas de glicerina. Para obtenção dos dados de densidade estomática e comprimento das células-guarda dos estômatos foram realizadas impressões epidérmicas da face abaxial de cinco folhas de cada espécie/espécime. Essas impressões foram feitas utilizando-se adesivo instantâneo universal (éster de cianoacrilato) sobre uma lâmina de vidro. As regiões apical, mediana e basal de cada folha foram pressionadas sobre uma lâmina, por aproximadamente dez segundos, de modo que o adesivo se espalhasse e secasse o suficiente, permitindo a separação do limbo foliar da lâmina e a manutenção da impressão da epiderme (SEGATTO et al., 2004).

Foi realizada a seleção das melhores impressões para a descrição e interpretação dos resultados e posterior fotodocumentação, realizada em fotomicroscópio com projeção da escala micrométrica. As medições foram obtidas a partir de imagens capturadas na lente objetiva de 10x (campo de 0,25 mm²), para se obter a densidade estomática, e na de 40x (campo de 0,1 mm²), para o comprimento das células-guarda. Foram utilizados três campos de amostragem, um em cada região foliar (apical, mediana e basal). A contagem e a medição dos estômatos foram analisadas por meio do software ANATI QUANTI 2.0. Foram medidos cinco estômatos de cada região de cada amostra e esses dados tabelados e tratados estatisticamente, sendo posteriormente comparados aos dados prévios de tamanho de genoma (F. PINHEIRO, dados não publicados) para os mesmos indivíduos analisados neste projeto. Os dados de tamanho genômico considerados no presente estudo foram correspondentes a espécies diploides, pois em algumas espécies ocorre poliploidia, o que poderia gerar erros nas comparações.

Sobre as médias dos valores encontrados para densidade e comprimento das células-guarda, para cada espécie e espécime, foi aplicado o teste estatístico de Shapiro & Wilk (1965) de modo a verificar a normalidade da distribuição dos valores encontrados.

A partir das médias encontradas para os valores de densidade estomática e de comprimento das células-guarda, realizaram-se testes de regressão linear para verificar se a relação da densidade estomática e do comprimento das células-guarda com o tamanho genômico é positiva ou negativa.

4 RESULTADOS

Os estômatos de todas as espécies e espécimes aqui estudados de *Epidendrum* foram documentados de forma padronizada a partir da região mediana do limbo foliar, além de detalhe do campo para medição das células-guarda (Figs 1-36). Na Tabela 2 são apresentados os intervalos e médias das medições a partir dessas imagens, compreendendo a densidade estomática e o comprimento das células-guarda, juntamente com os dados de tamanho genômico.

Os testes de normalidade apontaram que tanto a distribuição dos estômatos quanto o comprimento das células-guarda não possuem uma distribuição normal dos resultados. A partir das médias encontradas para os valores de densidade estomática e de comprimento das células-guarda, realizaram-se testes de regressão linear para verificar a relação da densidade estomática e do comprimento das células-guarda com o tamanho genômico.

Os testes de regressão linear apontaram uma espécie, *Epidendrum cinnabarinum*, com dados muito discrepantes com relação às demais. Essa espécie foi caracterizada como *outlier*, distorcendo os resultados, sendo, então, retirada das próximas análises.

Os gráficos de regressão foram, então, refeitos utilizando-se as oito espécies restantes em um primeiro momento (Fig. 37a, b) e depois se utilizando os diferentes espécimes de *E. secundum* (Fig. 38a, b).

A análise dos dados obtidos para as espécies distintas de *Epidendrum* mostra que a relação entre o comprimento das células-guarda e o tamanho genômico é negativa, ou seja, quanto maior o valor do genoma, menor é o comprimento do complexo estomático (Fig. 37a). O contrário acontece na relação entre a densidade estomática, na qual quanto maior o tamanho genômico, maior a densidade dos estômatos (Fig. 37b).

No entanto, a análise dos espécimes de *E. secundum* mostra que a relação do comprimento do complexo estomático com tamanho genômico é positiva, ou seja, quanto maior o valor do genoma, maior o comprimento do complexo estomático (Fig. 38a). Já a relação entre o tamanho do genoma com a densidade estomática é negativa, ou seja, quanto maior o tamanho genômico, menor é a densidade estomática (Fig. 38b).

5 DISCUSSÃO

Epidendroidae é a subfamília de Orchidaceae que apresenta representantes com maior variação no tamanho genômico, com valores de n que variam de 0,3 a 19,8 picogramas, sendo que a maior parte das espécies dessa subfamília possui valores medianos nesse intervalo (LEITCH et al., 2009).

Epidendrum cinnabarinum é a espécie da família com o maior número cromossômico, com o valor de n igual a 120 (ASSIS et al., 2013). Por apresentar um grande número cromossômico e um tamanho genômico discrepante com relação às outras espécies estudadas no presente trabalho, essa espécie mostrou-se como um *outlier*, interferindo nos resultados e fazendo com que os dados apresentados pelas outras espécies ficassem distorcidos. Por esse motivo, essa espécie foi retirada da amostragem das análises de regressão.

Nossos resultados para as oito espécies estudadas de *Epidendrum* mostram que a relação entre as características estomáticas com o genoma é inversa se comparada à literatura. A relação entre o tamanho genômico e a densidade estomática nas espécies aqui estudadas se mostrou positiva, diferentemente da relação encontrada por Beaulieu et al. (2008), que foi negativa. O mesmo aconteceu na relação entre o tamanho genômico com o comprimento das células-guarda que no presente estudo se mostrou negativa e na literatura é positiva (BEAULIEU et al., 2008).

Do contrário, os resultados obtidos comparando-se apenas os espécimes de *E. secundum* corroboram aqueles encontrados na literatura (BEAULIEU et al., 2008; KNIGHT; BEAULIEU, 2008; RUPP et al., 2010), ou seja, as relações encontradas foram similares às relações encontradas nos grupos estudados por esses autores.

Os nossos resultados não permitem distinguir as espécies estudadas, uma vez que os espécimes de populações distintas de *Epidendrum secundum* possuem diferenças no tamanho genômico devido ao isolamento reprodutivo das populações. Portanto, diferenças no tamanho genômico não indicam que as espécies comparadas sejam diferentes.

As espécies estudadas não representam nem 1% das 1.500 espécies do gênero. Contudo, mesmo com uma amostragem pequena, foi possível a obtenção de resultados satisfatórios em relação aos resultados encontrados em Beaulieu et al. (2008), Bory et al.

(2008), Knight e Beaulieu (2008) e Rupp et al. (2010). Necessita-se de um estudo mais abrangente com uma maior amostragem de espécies de modo a afirmar o relacionamento entre o tamanho genômico e as características estomáticas para todo o gênero e não somente para poucas espécies. Além disso, há uma grande dificuldade em estabelecer uma relação clara e confiante entre esses parâmetros, uma vez que existe uma enorme variação no tamanho genômico em níveis genéricos e específicos (BORY et al., 2008; RUPP et al., 2010).

Na Tabela 3 são apresentados os dados disponíveis na literatura, para diferentes táxons, acerca dos parâmetros tamanho genômico, comprimento das células-guarda e densidade estomática.

O Royal Botanic Gardens de Kew (Inglaterra) possui uma plataforma digital com os valores de tamanho genômico (C-Value) de diversas espécies de plantas, de modo a facilitar o estudo das relações do tamanho genômico com esses e diversos outros parâmetros. Entretanto como vimos no presente estudo, há diferenças quanto a esses valores de acordo com o local de coleta das espécies e provavelmente entre espécimes coletados em um mesmo local.

Os valores considerados no presente estudo são para o tamanho genômico de indivíduos diploides, uma vez que existem espécies poliploides no gênero. Em Beaulieu et al. (2008) e Rupp et al. (2010), constatou-se que a poliploidia não é significativa em relação ao comprimento das células-guarda e a densidade estomática, uma vez que não há muita diferença nas médias quando se compara espécies diploides e poliploides.

A densidade dos estômatos não depende somente do tamanho genômico. Pode haver uma grande influência da luminosidade e também da quantidade de CO₂ disponível no ambiente (CASSON; HETHERINGTON, 2010). Portanto, pode-se afirmar que uma espécie que possui uma ampla distribuição no território brasileiro está sujeita a diversas variações na quantidade de luz disponível e CO₂ no ambiente. Por exemplo, *Epidendrum secundum* aqui estudada ocorre em regiões de Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e na Amazônia (BARROS et al., 2015). Provavelmente, existe uma variação na densidade estomática dependendo do local de coleta, uma vez que a luminosidade e a disponibilidade de CO₂ em cada bioma é diferente.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram a existência de correlação entre o tamanho das células-guarda nos estômatos e a densidade destes com o tamanho do genoma nas espécies selecionadas de *Epidendrum*, porém essa correlação varia se comparadas espécies ou espécimes de uma mesma população. Deste modo, deve-se utilizar com parcimônia dados fenotípicos para a extrapolação genômica em espécies poliplóides.

7 REFERÊNCIAS

- ASSIS, F.N.M., SOUZA, B.C.Q., MEDEIROS-NETO, E., PINHEIRO F., SILVA, A.E.B., FELIX, L.P. 2013. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 329–344. 2013.
- BAINARD, J.D., FAZEKAS, A.J., NEWMASER, S.G. Methodology significantly affects genome size estimates: quantitative evidence using bryophytes. *Cytometry Part A* 77: 725–732. 2010.
- 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. 2015. *Orchidaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11573>>. Acesso em: 24 Set. 2017.
- BEAULIEU, J.M., LEITCH, I.J., PATEL, S., PENDHARKAR, A., KNIGHT, C.A. 2008. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist* 179: 975–986. 2008.
- BENNETT, M.D. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 181: 109–135. 1972.
- BORY, S., CATRICE, O., BROWN, S., LEITCH, I.J., GIGANT, R., CHIROLEU, F., GRISONI, M., DUVAL, M.F., BESSE, P. Natural polyploidy in *Vanilla planiflora* (Orchidaceae). *Genome* 51: 816–826. 2008.
- CASSON, S.A., HETHERINGTON, A.M. Environmental regulation of stomatal development. *Plant Biology* 13: 90–95. 2010.

- CAVALIER-SMITH, T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturisation and expansion. *Annals of Botany* 95: 147–175. 2005.
- CHAPMAN, M. A., ABBOTT, R. J. Introgression of fitness genes across a ploidy barrier. *New Phytologist*, 186, 63–71. 2010.
- CHASE, M. W., HANSON, L., ALBERT, V. A., WHITTEN, W. M., WILLIAMS, N. H. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 191–199. 2005.
- CHASE, M. W., CAMERON, K. M., FREUDENSTEIN, J. V., PRIDGEN, A. M., GERARDO SALAZAR, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015, 177, 151–174. 2015.
- CHUNG, M. Y., NASON, J. D., CHUNG, M. G. Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric populations. *Molecular Ecology*, 14: 4389–4402. 2005.
- COX, A. V., ABDELNOUR, G. J., BENNETT, M. D., LEITCH, I. J. Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae). *American Journal Of Botany* 85(5): 681–687. 1998.
- COZZOLINO, S. NARDELLA, A. M. IMPAGLIAZZO, S. WIDMER, A. LEXER, C. Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation* 129: 14-23. 2006
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38: 285–302. 1997.

- DRESSLER, R. The orchids: natural history and classification. Cambridge. *Harvard University Press*, 332pp. 1981.
- DRESSLER, R. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland. *Dioscorides Press*, 316pp. 1993.
- DRESSLER, R. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155–158. 2005.
- DUNSTERVILLE, G.C.K. Orchids of Venezuela – *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin* 48: 447–454. 1979.
- FRANKS, P.J., FRECKLETON, R.P., BEAULIEU, J.M., LEITCH, I.J., BEERLING, D.J. Megacycles of atmospheric carbon dioxide concentration correlate with fossil plant genome size. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 556–564. 2012.
- GOLDBLATT, P. Polyploidy in Angiosperms: Monocotyledons. *Plenum Press*. New York. 1980.
- HÁGSATER, E., SOTO-ARENAS, M.A. 2005. *Epidendrum* L in: PRIDGEON, A.M., CRIBB, P.J., CHASE, M.W., RASMUSSEN, F.N. (eds.), *Genera Orchidacearum*, vol. 4. Oxford: *Oxford University Press*. Pp. 236-251. 2005.
- HEDRÉN, M. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): Evidence from allozyme markers. *Plant Systematic Evolution*. 201:31-55. 1996.
- HODGSON, J.G., SHARAFI, M., JALILI, A., DÍAZ, S., MONTSERRAT-MARTÍ, G., PALMER, C., CERABOLINI, B., PIERCE, S., HAMZEHEE, B., ASRI, Y., JAMZAD, Z., WILSON, P., RAVEN, J.A., BAND, S. R., BASCONCELO, S., BOGARD, A., CARTER, G., CHARLES, M., CASTRO-DÍEZ, P., CORNELISSEN, J.H.C., FUNES, G., JONES, G., KHOSHNEVIS, M., PÉREZ-HARGUINDEGUY,

- N., PÉREZ-RONTOMÉ, M.C., SHIRVANY, F.A., VENDRAMINI, F., YAZDANI, S., ABBAS-AZIMI, R., BOUSTANI, S., DEHGHAN, M., GUERRERO-CAMPO, J., HYND, A., KOWSARY, E., KAZEMI-SAEED, F., SIAVASH, B., VILLAR-SALVADOR, P., CRAIGIE, R., NAQINEZHAD, A., ROMO-DÍEZ, A., DE TORRES ESPUNY, L., SIMMONS, E. Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog? *Annals of Botany* 105: 573–584. 2010.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company, 523pp. 1940.
- JORDAN, G.J., CARPENTER, R.J., KOUTOULIS, A., BRODRIBB, T.J. Environmental adaptation in stomatal size independent of the effects of genome size. *New Phytologist* 205: 608–617. 2014.
- KNIGHT, C.A., BEAULIEU, J.M. Genome size scaling through phenotype space. *Annals of Botany* 101: 769–766. 2008.
- KNIGHT, C.A., MOLINARI, N.A., PETROV, D.A. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology, and phenotype. *Annals of Botany* 95: 177–190. 2005.
- LEITCH, I.J., KAHANDAWALA, I., SUDA, J., HANSON, L., INGROUILLE, M.J., CHASE, M.W., FAY, M.F. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany* 104: 469–481. 2009.
- LEWIS, W. H. Polyploidy in species populations. *Plenum Press*, New York. 1980.
- LOMAX, B.H., WOODWARD, F.I., LEITCH, I.J., KNIGHT, C.A., LAKE, J.A. Genome size as a predictor of guard cell length in *Arabidopsis thaliana* is independent of environmental conditions. *New Phytologist* 181: 311–314. 2008.
- MALKASSIAN, A., NERINI, D., VAN DIJK, M.A., THYSSEN, M., MANTE, C., GREGORI, G. Functional analysis and classification of phytoplankton based on data

- from an automated flow cytometer. *Cytometry Part A* 79: 263–275. 2011.
- MARTIN, N. H., BOUCK, A. C., ARNOLD, M. L. Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genics* 172: 2481–2489. 2006.
- MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–24. 1994.
- MIRSKY, A.E., RIS, H. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *Journal of General Physiology* 34: 451–462. 1951.
- PANSARIN, E.R., AMARAL, M.C.E. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) floral variation: A consequence of natural hybridization? *Plant Biology* 10: 211–219. 2008.
- PINHEIRO, F., BARROS F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany* 25: 129–136. 2007.
- PINHEIRO, F., KOEHLER, S., CORRÊA, A. M., SALATINO, M. L. F., SALATINO, A., BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematic Evolution* 283:165–177. 2009.
- PINHEIRO, F., BARROS, F., PALMA-SILVA, C., MEYER, D., FAY, M. F., SUZUKI, R.M., LEXER, C., COZZOLINO, S. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*. 19, 3981–3994. 2010.
- PINHEIRO, F., COZZOLINO, S. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon* 62: 77–88. 2013.

- 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* 30: 1183–1191. 2011.
- PRICE, H.J., SPARROW, A.H., NAUMAN, A.F. Correlations between nuclear volume, cell volume and DNA content in meristematic cells of herbaceous angiosperms. *Experientia* 29: 1028–1029. 1973.
- RUPP, B., SAMUEL, R., RUSSELL, A., TEMSCH, E.M., CHASE, M.W., LEITCH, I.J. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. *Botanical Journal of the Linnean Society* 163: 223–233. 2010.
- SCACCHI, R., DE ANGELIS, G., LANZARA, P. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridizing aptitude. *Genetica* 81: 143-150, 1990.
- SEGATTO, F.B., BISOGNIN, D.A., BENEDETTI, M., COSTA, L.C., RAMPELOTTO, M.V., NICOLOSO, F.T. Técnica para estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Ciência Rural* 34: 1597-1601. 2004.
- SHAPIRO, S.S., WILK, M.B. An analysis of variance test of normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591. 1965.
- STEBBINS, G. L. Polyploidy in plants: Unsolved problems and prospects. *Plenum Press*. New York. 1980.
- THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 25/09/2017

WHITNEY, K. D., RANDELL, R. A., RIESEBERG, L. H. Adaptive introgression of herbivore resistance traits in the weedy sunflower *Helianthus annuus*. *The American Naturalist*, 167-6. 2006.

XING, S.H., GUO, X.B., WANG, Q., PAN, Q.F., TIAN, Y.S., LIU, P., ZHAO, J.Y., WANG, G.F., SUN, X.F., TANG, K.X. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2. 2011.

APÊNDICE A – TABELA 1

Tabela 1. Dados das espécies e espécimes estudados de *Epidendrum*.

Espécies/Espécimes	Dados de coleta e/ou coleção	Locais de coleta
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm. ex Lindl.	F. Pinheiro 131	Japaratuba, SE
<i>E. denticulatum</i> Barb.Rodr.	JBSP 17914	Bertioga, SP
<i>E. fulgens</i> Brongn.	F. Pinheiro 115	Paraty, RJ
<i>E. orchidiflorum</i> Salzm. ex Lindl.	JBSP 17698	Mangaratiba, RJ
<i>E. purpureum</i> Barb.Rodr.	JBSP 17891	Araruama, RJ
<i>E. puniceoluteum</i> F.Pinheiro & F.Barros	JBSP 17957	Paranaguá, PR
<i>E. radicans</i> Pav. ex Lindl.	JBSP 17894	Oaxaca, México
<i>E. secundum</i> Jacq.	F. Pinheiro 146 F. Pinheiro 157 F. Pinheiro 158 F. Pinheiro 248 F. Pinheiro 313 F. Pinheiro 329 F. Pinheiro 338 JBSP 17672 JBSP 17924 JBSP 18041	Camocim de São Félix, PE Brejo da Madre de Deus, PE Brejo da Madre de Deus, PE Santa Teresa, ES Formosa, GO Areia Branca, SE Brumadinho, MG Santo Antônio do Itambé, MG Serra do Rio do Rastro, SC
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	F. Pinheiro 16	Aratitiope, Venezuela Nova Friburgo, RJ

OBS.: JBSP= Jardim Botânico de São Paulo (São Paulo, SP).

APÊNDICE B – TABELA 2

Tabela 2. Dados do tamanho genômico e intervalo de valores e médias para a densidade estomática e comprimento das células-guarda das espécies e espécimes estudados de *Epidendrum*.

Espécie/Espécime	Dados de coleta	Tamanho Genômico (picogramas)	Intervalo de Densidade (est/mm ²)	Média de Densidade (est/mm ²)	Intervalo de Comprimento (µm)	Média do Comprimento (µm)
<i>E. cinnabarinum</i>	F. Pinheiro 131	19,15	20,51 – 50,72	29,75	35,99 – 52,24	47,85
<i>E. denticulatum</i>	JBSP 17914	4,89	36,47 – 54,71	46,42	28,29 – 33,15	30,3
<i>E. fulgens</i>	F. Pinheiro 115	2,88	30,20 – 54,72	39,74	30,80 – 38,11	34,13
<i>E. orchidiflorum</i>	JBSP 17698	8,12	33,05 – 64,97	51,63	28,49 – 34,67	32,25
<i>E. puniceoluteum</i>	JBSP 17891	4,73	36,47 – 71,24	48,31	30,93 – 38,10	34,04
<i>E. purpureum</i>	JBSP 17957	6,29	27,35 – 43,31	34,87	30,55 – 33,60	32,03
<i>E. radicans</i>	JBSP 17894	3,19	30,20 – 50,15	41,14	30,37 – 38,06	32,5
<i>E. secundum</i>	F. Pinheiro 146	4,4	29,64 – 43,32	35,34	26,72 – 33,95	31,12
	F. Pinheiro 157	3,54	28,5 – 51,3	40,58	23,11 – 28,59	26,48
	F. Pinheiro 158	3,45	47,88 – 62,7	54,03	27,57 – 30,72	30,46
	F. Pinheiro 248	3,9	26,79 – 48,45	42,12	19,79 – 25,82	24,08
	F. Pinheiro 313	3,75	35,91 – 49,02	43,09	23,47 – 30,70	28,47
	F. Pinheiro 329	3,89	35,04 – 62,13	44,91	26,00 – 32,92	26,66
	F. Pinheiro 338	3,67	27,23 – 35,36	31,69	22,81 – 27,39	24,38
	JBSB 17672	2,79	40,47 – 74,67	58,36	18,42 – 25,46	23,05
	JBSB 17924	3,59	33,06 – 49,02	38,41	25,22 – 30,40	27,87
	JBSB 18041	5,46	27,36 – 38,76	33,40	24,92 – 32,56	27,75
<i>E. xanthinum</i>	F. Pinheiro 160	4,05	24,50 – 118, 55	49,01	22,20 – 37,41	30,92

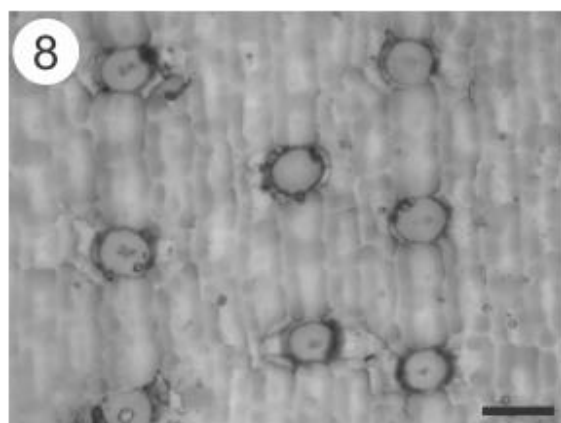
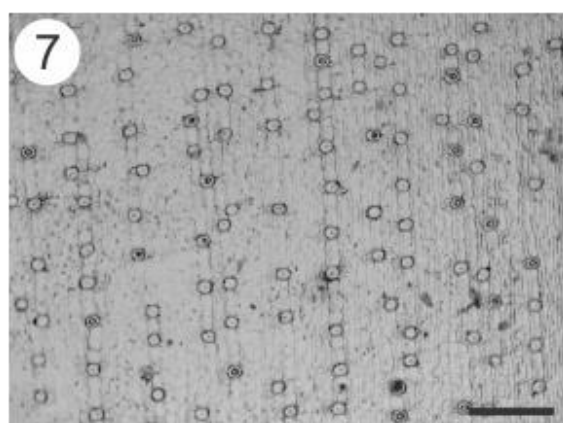
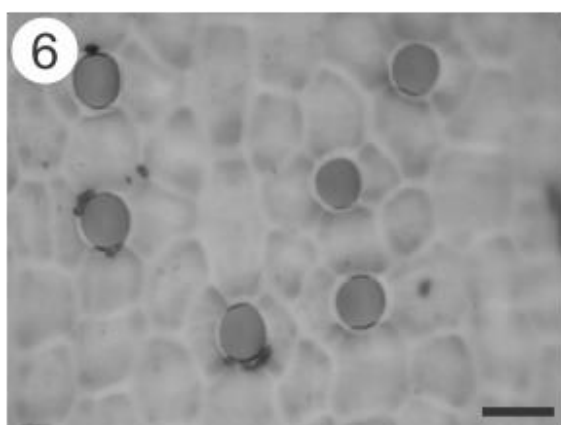
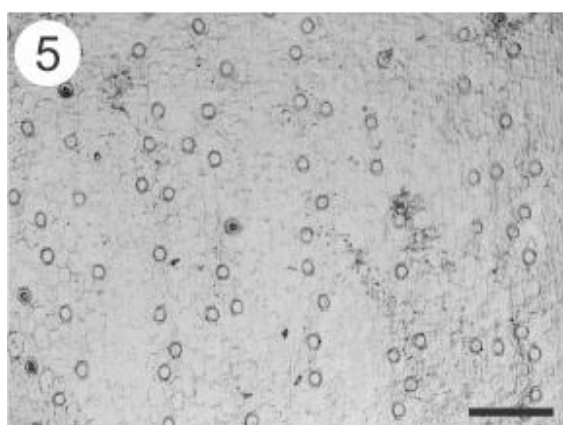
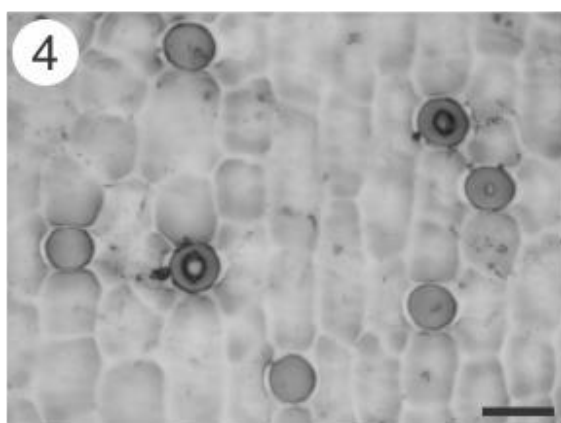
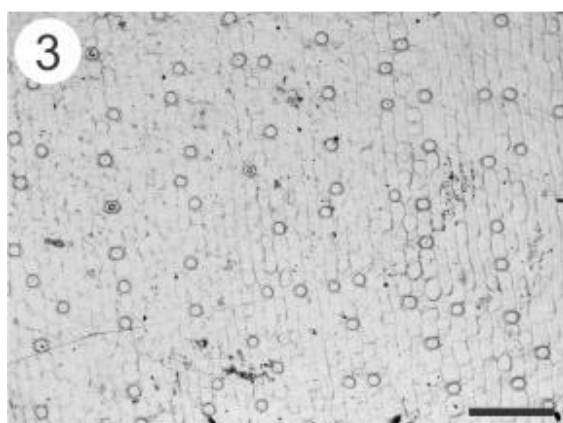
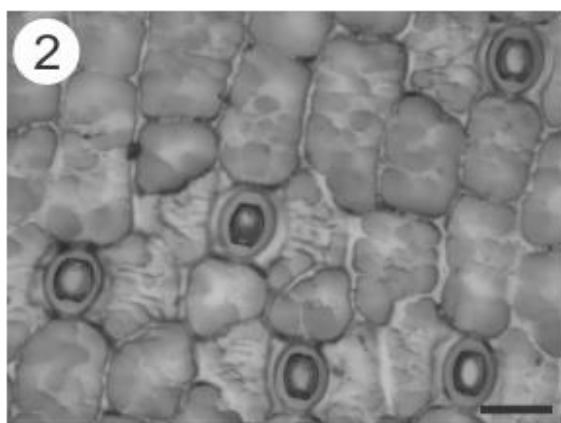
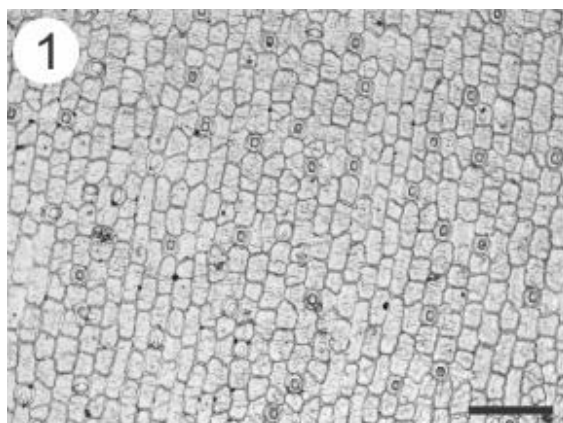
APÊNDICE C – TABELA 3

Tabela 3. Dados disponíveis na literatura acerca das correlações entre tamanho genômico (TG) x densidade estomática (DE) e tamanho genômico (TG) x comprimento do complexo estomático (CCE) em diferentes táxons.

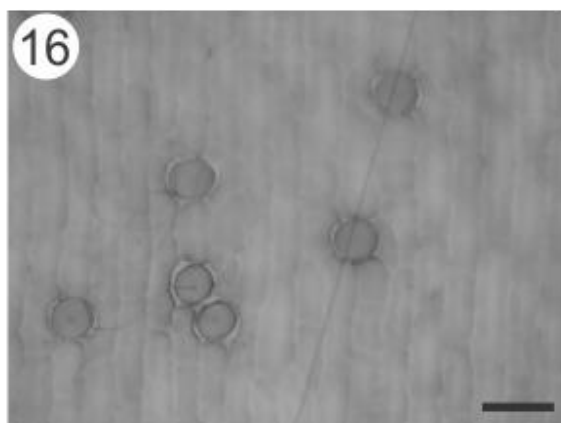
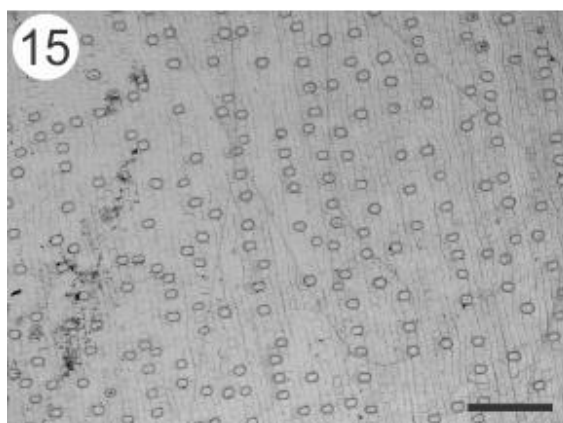
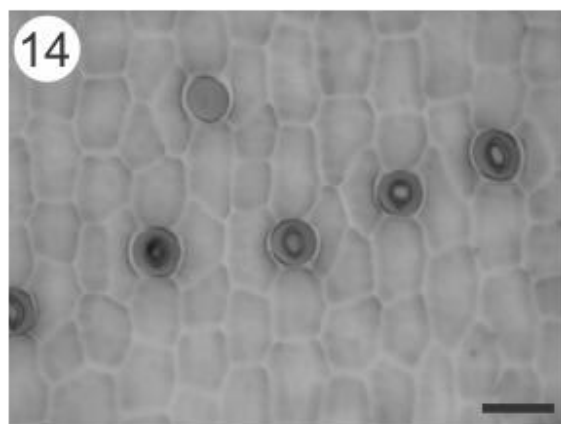
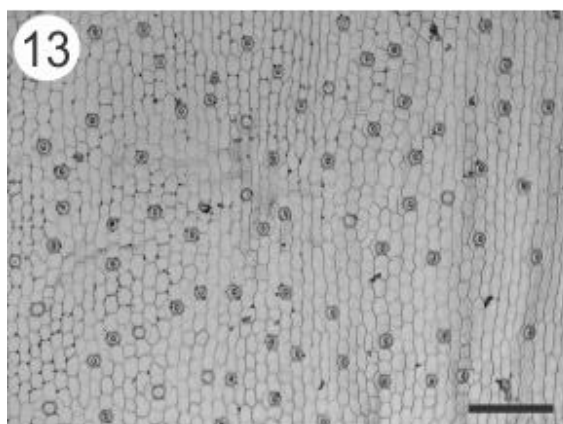
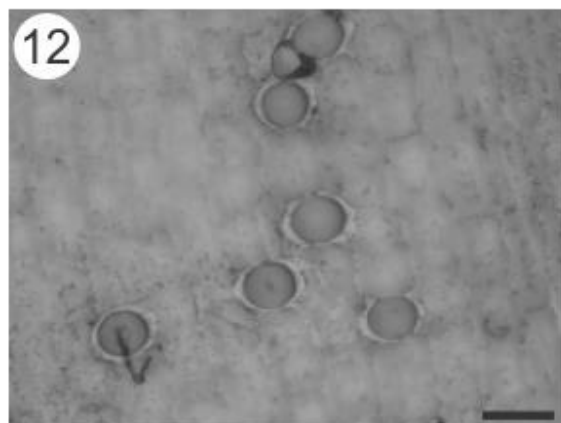
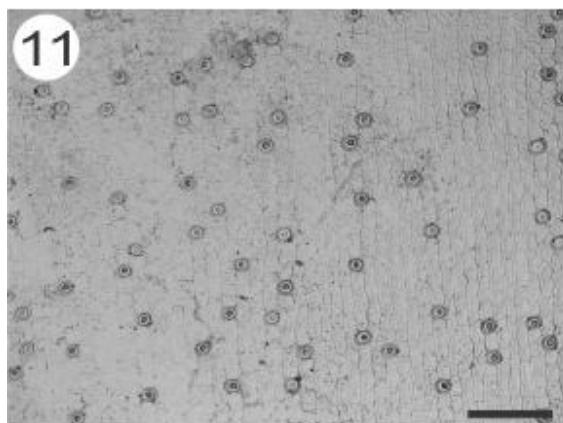
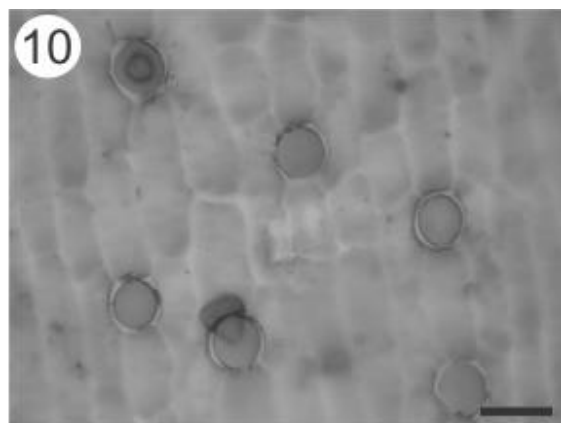
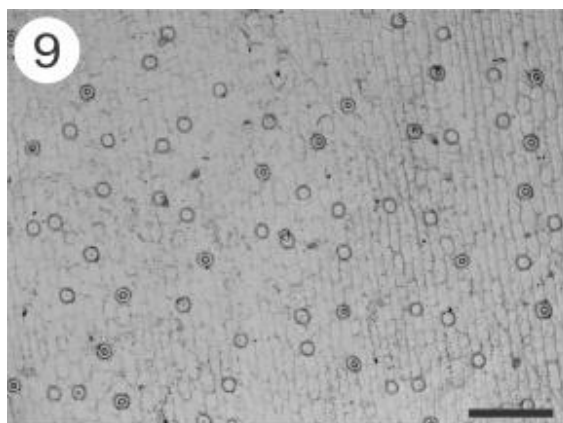
GRUPO	TAXON	TG X DE	TG X CCE	AUTOR
Briófita	<i>Selaginella</i>	-	Positiva	Franks et al., 2012
	<i>Asplenium</i>	-	Positiva	Franks et al., 2012
Pteridófita	<i>Osmunda</i>	-	Positiva	Franks et al., 2012
	<i>Pteridium</i>	-	Positiva	Franks et al., 2012
Gimnospermas	Gimnospermas de um modo geral	-	Negativa	Knight & Beaulieu, 2008
	<i>Cycas</i>	-	Positiva	Franks et al., 2012
Angiospermas	<i>Polystachya</i>	-	Positiva	Rupp et al., 2010
	<i>Vanilla planifolia</i>	-	Positiva	Bory et al., 2008
	Monocotiledôneas	Negativa	Positiva	Beaulieu et al., 2008; Hogdson, 2010
	Eudicotiledôneas	Negativa	Positiva	Beaulieu et al., 2008; Hogdson, 2010
	Árvores	Negativa	Positiva	Beaulieu et al., 2008
	Arbustos	Negativa	Positiva	Beaulieu et al., 2008
	<i>Herbáceas</i>	Negativa	Positiva	Beaulieu et al., 2008
	<i>Miscanthus</i> sp.	-	Positiva	Rayburn et al., 2008
	Poaceae	Negativa	Positiva	Hogdson, 2010
	Dicotiledôneas basais	Negativa	Positiva	Hogdson, 2010
	Rununculaceae	Negativa	Positiva	Hogdson, 2010
	<i>Fabaceae</i>	Negativa	Positiva	Hogdson, 2010
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	Positiva	Lomax et al., 2008
	Proteaceae	-	Positiva	Jordan et al., 2014
	Magnoliaceae fósseis	-	Positiva	Masterson, 1994
	Angiospermas de um modo geral	-	Positiva	Knight & Beaulieu, 2008

APÊNDICE D - FIGURAS

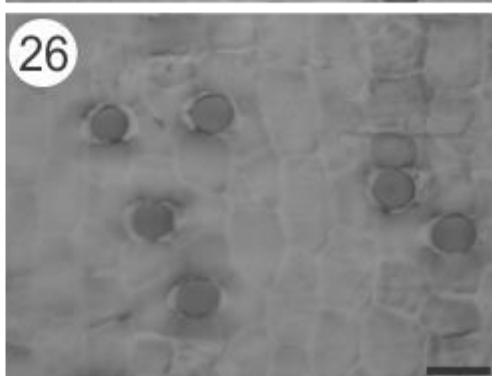
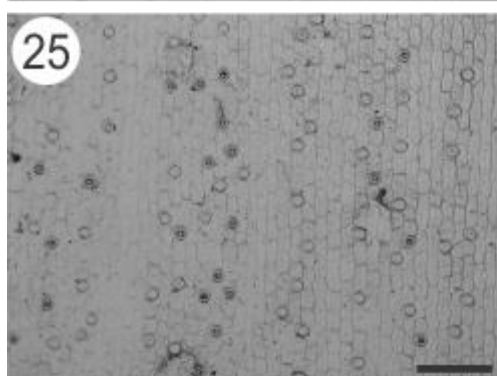
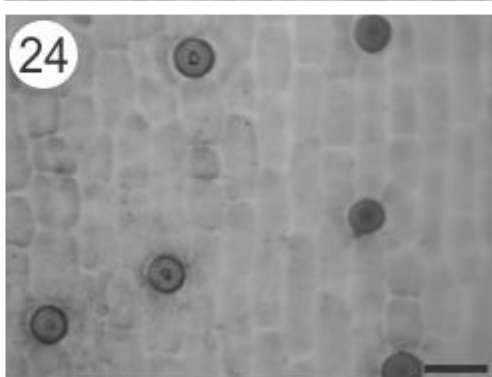
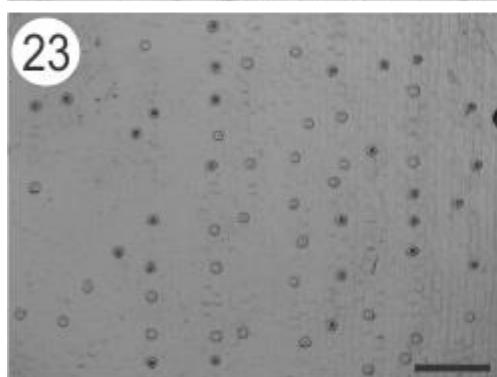
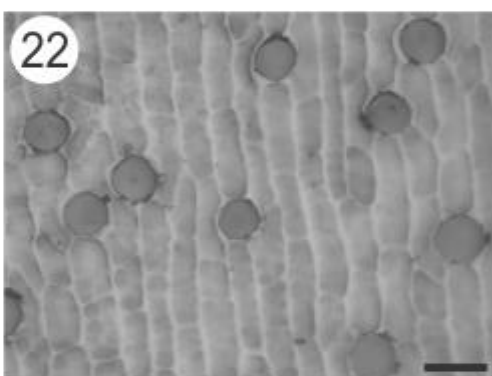
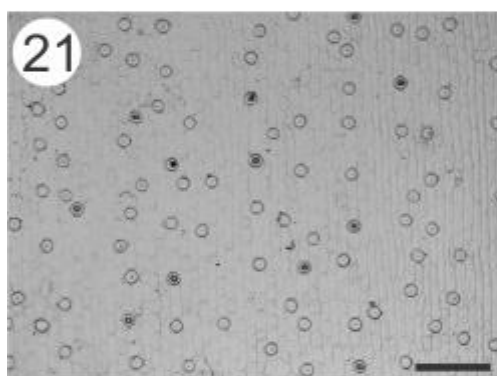
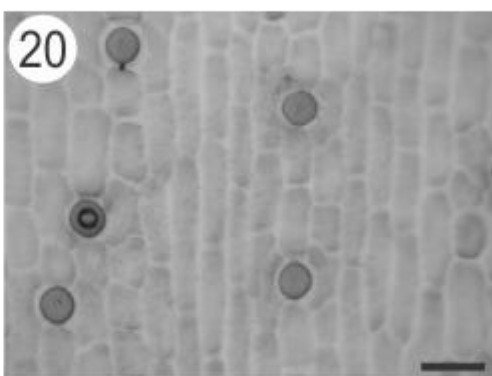
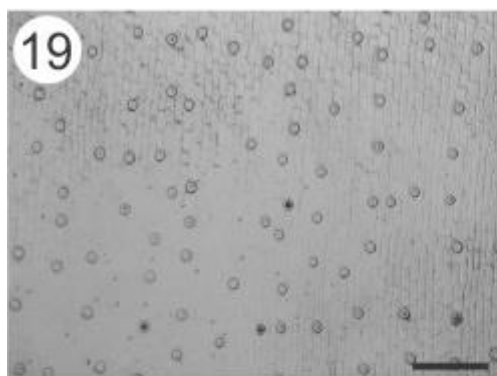
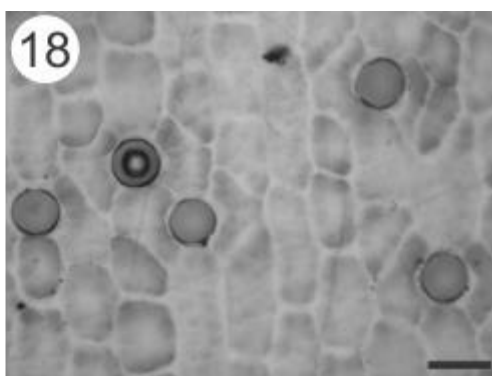
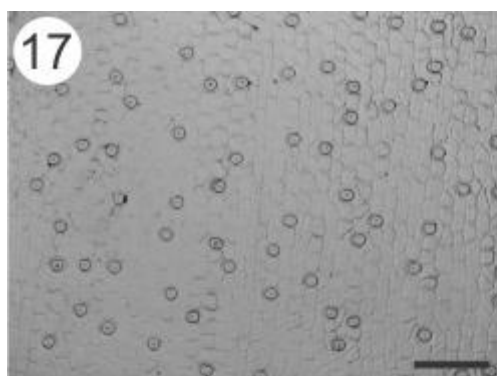
Figuras 1-8: Impressões da superfície abaxial, região mediana, das folhas de *Epidendrum*. 1-2: *E. cinnabarinum*. 3-4: *E. denticulatum*. 5-6: *E. fulgens*. 7-8: *E. orchidiflorum*. 1, 3, 5, 7: Exemplos de campos para aferição da densidade estomática. 2, 4, 6, 8: Exemplos de campos para medições dos complexos estomáticos. Barras de escalas: 1, 3, 5, 7 = 100 μm ; 2, 4, 6, 8 = 20 μm .



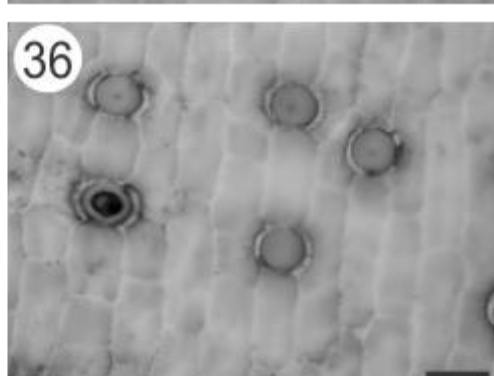
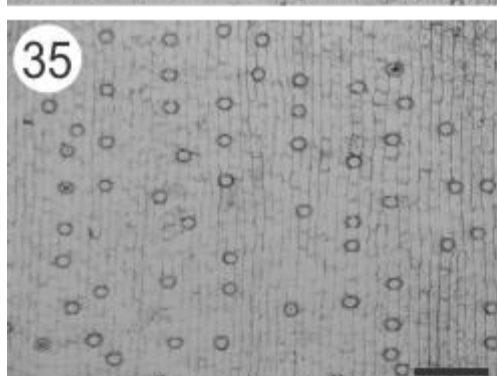
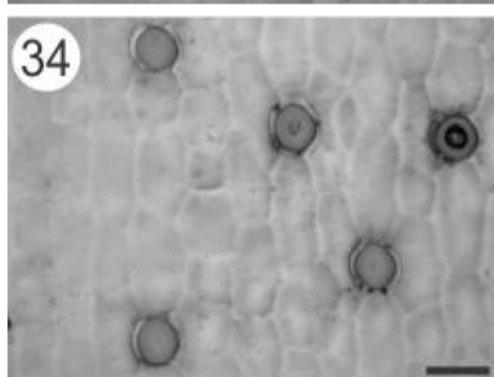
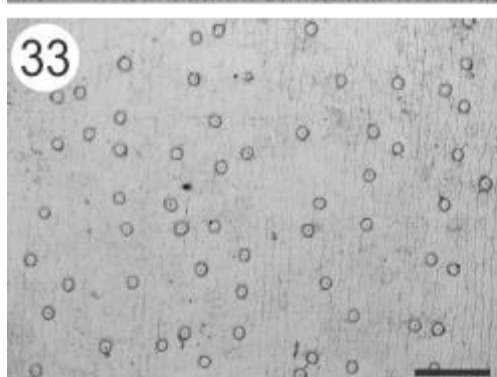
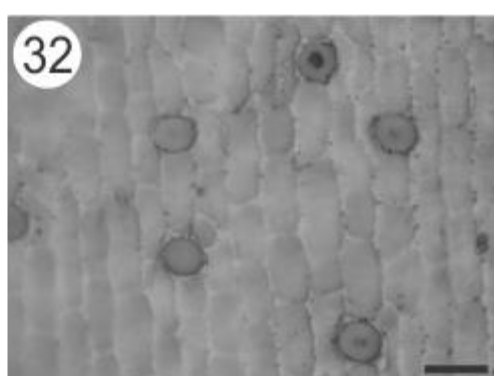
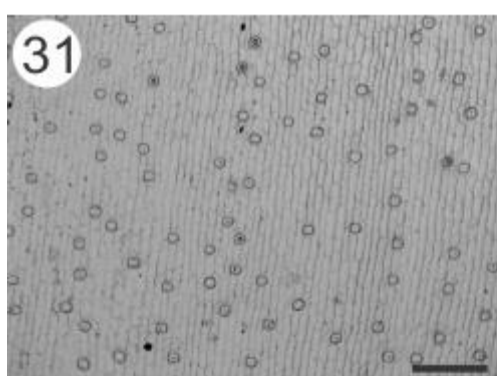
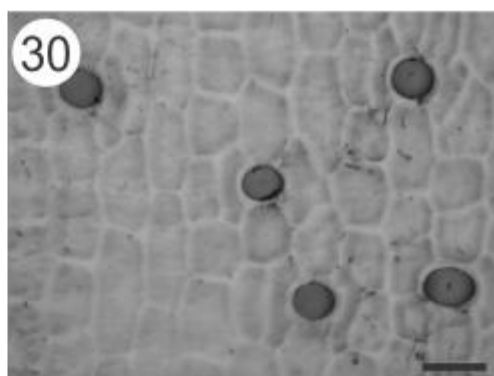
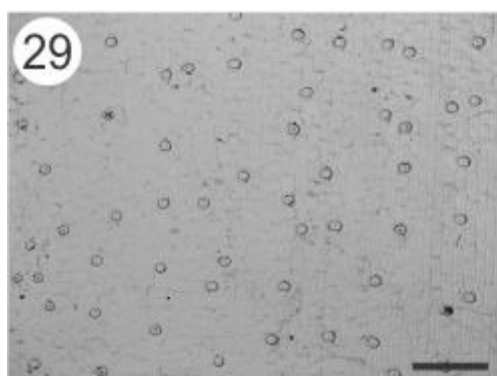
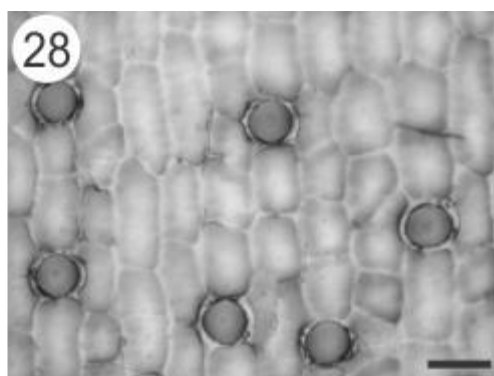
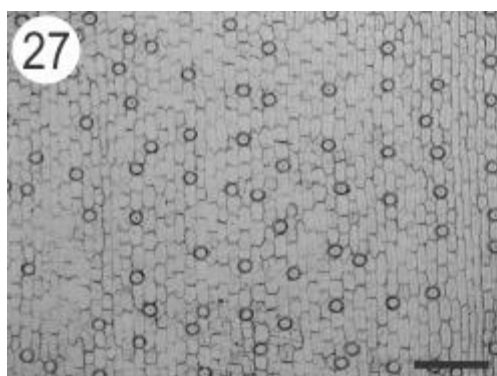
Figuras 9-16: Impressões da superfície abaxial, região mediana, das folhas das espécies estudadas de *Epidendrum*. 9-10. *E. puniceoluteum* 11-12: *E. purpureum*. 13-14: *E. radicans*. 15-26: *E. xanthinum*. 9, 11, 13, 15 Exemplos de campos para aferição da densidade estomática. 10, 12, 14, 16: Exemplos de campos de medições dos complexos estomáticos. Barras de escalas: 9, 11, 13, 15 = 100 μm ; 10, 12, 14, 16 = 20 μm .



Figuras 17-26: Impressões da superfície abaxial, região mediana, das folhas dos espécimes estudados de *Epidendrum secundum*. 17-18: F.Pinheiro 146. 19-20: F. Pinheiro 157. 21-22: F.Pinheiro 158. 23-24: F. Pinheiro 248. 25-26: F. Pinheiro 313. 17, 19, 21, 23, 25: Exemplos de campos de aferição da densidade estomática. 18, 20, 22, 24, 26: Exemplos de campos medições dos complexos estomáticos. Barras de escala: 17, 19, 21, 23, 25 = 100 μm ; 18, 20, 22, 24, 26 = 20 μm .



Figuras 27-36: Impressões da superfície abaxial, região mediana, das folhas dos espécimes estudados de *Epidendrum secundum*. 27-28: F. Pinheiro 339. 29-30: F. Pinheiro 338. 31-31: JBSP 17672. 32-33: JBSP 17924. 35-36: JBSP 18041. 27, 29, 31, 33, 35: Exemplos de campos de aferição de densidade estomática. 28, 30, 32, 34, 36: Exemplo de campo de medições dos complexos estomáticos. Barras de escala: 27, 29, 31, 33, 35 = 100 μm ; 28, 30, 32, 34, 36 = 20 μm .



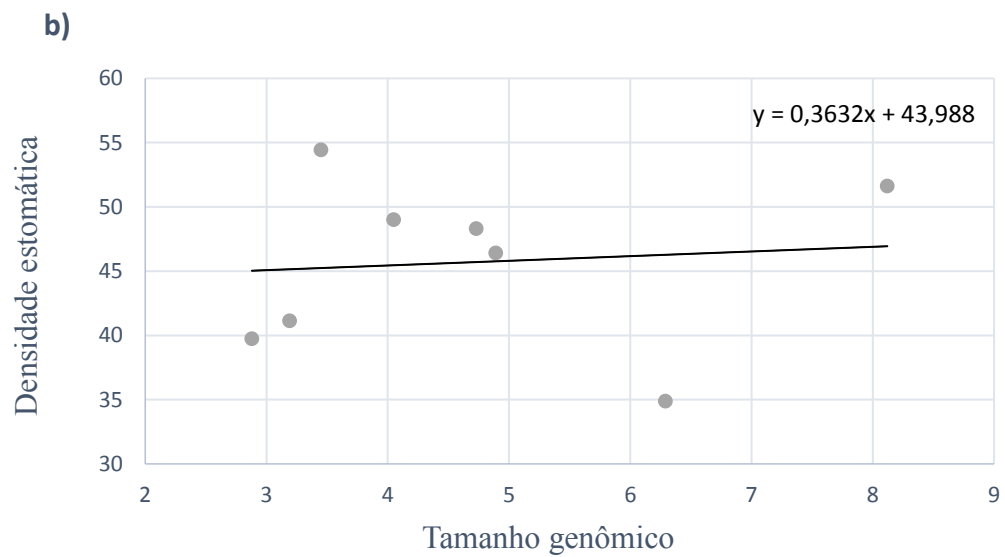
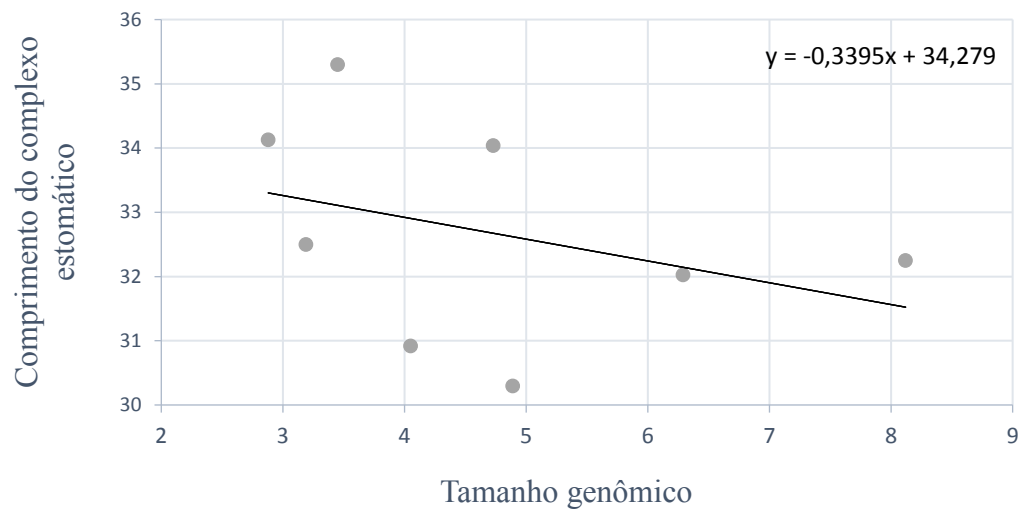


Figura 37: Gráficos de regressão linear considerando tamanho genômico x comprimento das células-guarda (a) e tamanho genômico x densidade estomática (b) das espécies estudadas de *Epidendrum*.

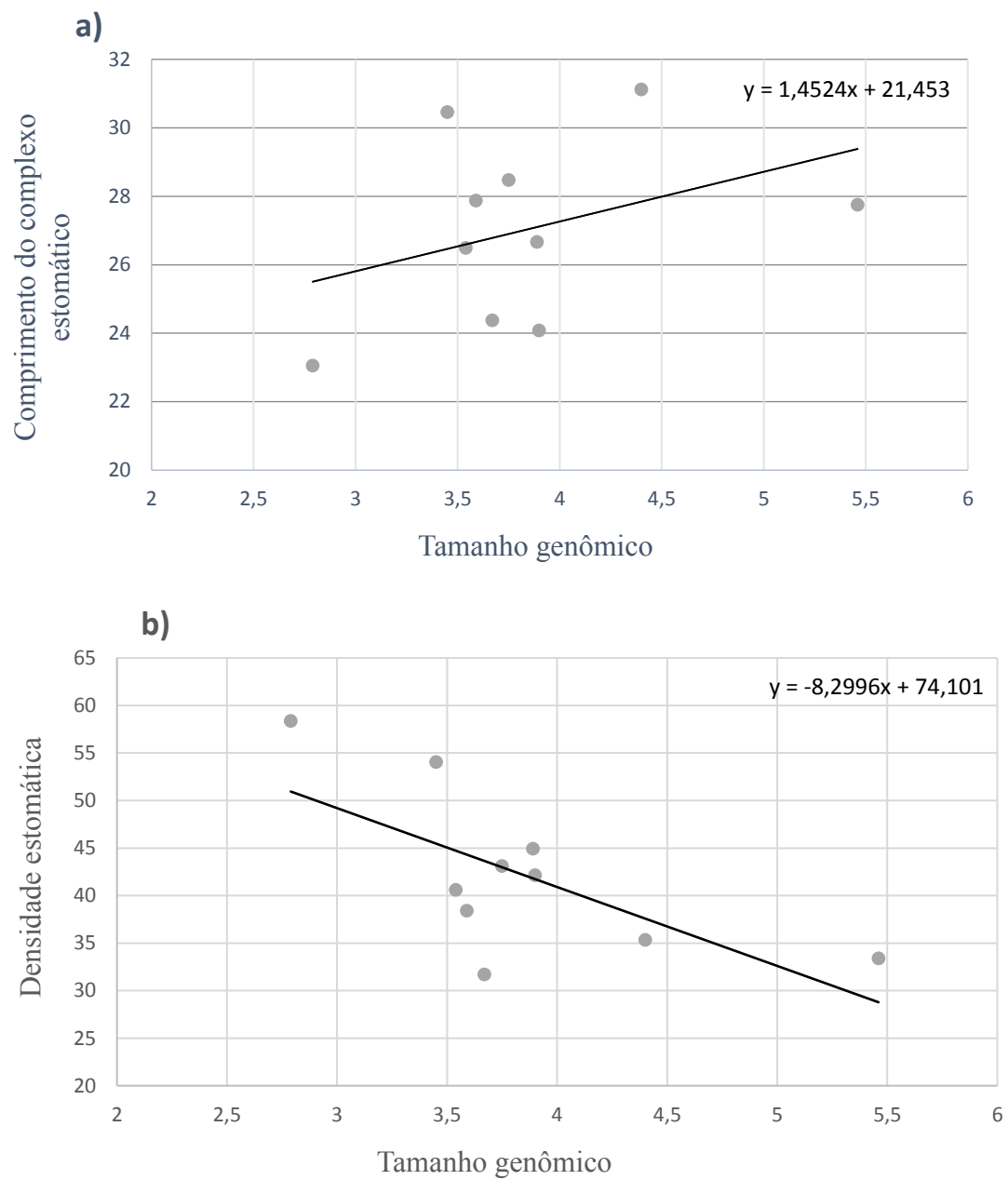


Figura 38: Gráficos de regressão linear considerando tamanho genômico x comprimento das células-guarda (a) e tamanho genômico x densidade estomática (b) dos espécimes estudados de *Epidendrum secundum*.

Rio Claro, 11 de dezembro de 2017.

Yuri Fecho Apolinário

Alessandra Ike Coan