



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

YOHANS ALVES DE MOURA

ORQUÍDEAS APOMÍTICAS FACULTATIVAS *ZYGOPETALUM MACKAYI*
PREFEREM REPRODUÇÃO SEXUADA EM ZONA DE CONTATO ENTRE
CITÓTIPOS.

CAMPINAS

2018

YOHANS ALVES DE MOURA

ORQUÍDEAS APOMÍTICAS FACULTATIVAS *ZYGOPETALUM MACKAYI*
PREFEREM REPRODUÇÃO SEXUADA EM ZONA DE CONTATO ENTRE
CITÓTIPOS.

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Vegetal*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO YOHANS ALVES
DE MOURA E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA SAMANTHA KOEHLER.

Orientadora: Dra. Samantha Koehler

Coorientadora: Dra. Anete Pereira de Souza

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M865o Moura, Yohans Alves de, 1992-
Orquídeas apomíticas facultativas *Zygopetalum mackayi* preferem
reprodução sexuada em zona de contato entre citótipos / Yohans Alves de
Moura. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Samantha Koehler.

Coorientador: Anete Pereira de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. *Zygopetalum*. 2. Poliploide. 3. Apomixia. I. Koehler, Samantha, 1975-. II.
Souza, Anete Pereira de, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Facultative apomictic orchids *Zygopetalum mackayi* prefer sexual
reproduction in contact area between cytotypes

Palavras-chave em inglês:

Zygopetalum

Polyploidy

Apomixis

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Samantha Koehler [Orientador]

Maria Imaculada Zucci

Fábio Pinheiro

Data de defesa: 28-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 28 de março de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Samantha Koehler

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi

Prof. Dr. Fabio Pinheiro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Samantha Koehler e Anete Pereira de Souza pela orientação; a Thiago Campacci pela coleta dos espécimes no campo e pela ajuda nas extrações de DNA; à equipe do Laboratório de Análises Genéticas e Moleculares (LAGM/UNICAMP), especialmente a Alessandro Alves Pereira, Carla Cristina Silva, Lívia Moura de Souza, Fábio Mattos Alves, Rebecca Ulbricht Ferreira e Aline Moraes pelo apoio técnico. Agradeço também a Evandro Marsola, Fábio Pinheiro e Maria Imaculada Zucci pelos comentários nas versões prévias dessa dissertação. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX/Unicamp) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2014/04426-5). Os espécimes vegetais foram coletados e transportados com autorização do IBAMA/SISBIO (#32837).

RESUMO

A poliploidia é considerada um processo central na diversificação de linhagens de plantas. Entender como indivíduos com variação no número cromossômico (i.e. citótipos) interagem entre si é fundamental para a compreensão do papel da poliploidia na evolução. A orquídea *Zygopetalum mackayi* é um modelo ideal para este tipo de estudo pois apresenta variação de número cromossômico ao longo de um gradiente geográfico. Os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$ ocorrem, respectivamente, ao sudeste e nordeste de afloramentos rochosos no leste brasileiro. Há ainda uma zona de contato com a presença de um citótipo intermediário, $2N = 72$. Estudos anteriores para esta espécie confirmaram a ocorrência de apomixia facultativa e a necessidade do polinizador para formação de frutos. Nesse estudo nós desenvolvemos marcadores microssatélites para indivíduos de seis populações de *Z. mackayi* com intuito de entender a relação entre reprodução apomítica e ocorrência de citótipos. Nós testamos a hipótese de que populações formadas por citótipos mistos apresentam maior incidência de reprodução apomítica do que populações dominadas por apenas um citótipo. Adicionalmente, nós descrevemos a natureza do contato entre citótipos em populações mistas (primária vs. secundária) e a origem do citótipo intermediário. Os resultados sugerem que a apomixia não é relevante para estrutura genética de populações de *Z. mackayi*, independente da frequência de citótipos distintos. As populações mistas têm origem no contato secundário entre os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$, sugerindo a existência de pelo menos duas espécies crípticas distintas. O citótipo $2N = 72$ apresenta perfil genético intermediário e provável origem híbrida a partir dos demais citótipos. Nossos resultados indicam que a reprodução do citótipo $2N = 72$ é sexuada, o que sugere que este citótipo atua mediando o fluxo gênico entre os demais citótipos nas populações mistas. Levantamos aqui a necessidade de um estudo que inclua cruzamentos controlados entre citótipos considerando várias gerações e citótipos a fim de se investigar a fundo os impactos genéticos do fluxo gênico, da introgressão e motivo da ausência de citótipos maiores que $2N = 96$ nas populações mistas de *Z. mackayi*.

ABSTRACT

Polyploidy is considered a main diversification process in plants. Understanding how individuals with distinct chromosome numbers (i.e. cytotypes) interact is key to describe the role of polyploidy in evolution. The orchid *Zygopetalum mackayi* is an ideal model to address this question. The frequency of cytotypes vary along a geographical gradient. Cytotypes $2N = 48$ and $2N = 96$ occur, respectively, in southeastern and northeastern Brazil, on rocky outcrops. There is a contact zone between cytotypes where an intermediate cytotype $2N = 72$ is also found. Previous studies confirmed the occurrence of facultative apomixis and pollinator dependence for fruit development in this species. In this study, we developed microsatellite markers for individuals of six populations of *Z. mackayi*. Our goal was to understand the relationship between apomictic reproduction and cytotype frequency within populations. We tested the hypothesis that apomictic reproduction is more frequent in mixed cytotype populations compared to single cytotype populations. Moreover, we described the contact nature of mixed cytotype populations (primary vs. secondary) and the origin of the intermediate cytotype. Results suggest that apomixis is not relevant for *Z. mackayi* population genetic structure, regardless of cytotype frequency. Mixed populations originated by secondary contact between $2N = 48$ and $2N = 96$ cytotypes, suggesting there are at least two cryptic species within *Z. mackayi*. Our results indicate the cytotype $2N = 72$ reproduces sexually, suggesting a possible role of the intermediate cytotype in enabling gene flow between cytotypes. We point to the need of further studies considering controlled crossing experiments among different generations and cytotypes to understand the effects of introgression and the absence of higher chromosome number on contact zones of *Z. mackayi*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
-Sistema de estudo.....	12
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
-Amostragem.....	15
-Determinação do citótipos.....	16
-Desenvolvimento dos marcadores moleculares.....	16
-Otimização e Seleção dos marcadores.....	17
-Estimativa da reprodução apomítica.....	18
- Diversidade genética e genotípica.....	18
- Agrupamento genético e estrutura populacional.....	19
RESULTADOS.....	20
-Otimização e seleção dos marcadores.....	20
-Diversidade genética e genotípica.....	21
-Análises de agrupamento genético e estrutura populacional.....	22
DISCUSSÃO.....	26
-Relação entre tamanho do genoma e apomixia.....	26
- O papel do citótipo intermediário.....	28
-Contato secundário.....	30
CONCLUSÕES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	40

INTRODUÇÃO

A poliploidia, ou multiplicação completa dos conjuntos cromossômicos, é um processo central na diversificação de linhagens de plantas e, possivelmente, em outras linhagens de eucariotos (Otto & Whitton, 2000). A redundância gênica encontrada nos eucariotos como um todo sugere a ocorrência de vários eventos de duplicação genômica, com pelo menos uma grande duplicação na fase inicial da diversificação das angiospermas (Soltis et al., 2003). Eventos de poliploidia parecem ser também muito frequentes ao longo da diversificação de linhagens internas nas angiospermas, sendo estimados para até 80% das espécies atuais desse grupo (Masterson, 1994).

A poliploidia é ainda considerada a principal via de especiação simpátrica em plantas, uma vez que a ocorrência de citótipos distintos frequentemente determina o imediato isolamento reprodutivo entre indivíduos de uma população (Otto & Whitton, 2000). Isso porque a poliploidia está frequentemente associada a caracteres que definem isolamento reprodutivo e diferenciação fenotípica, devido aos efeitos da duplicação genômica (Masterson, 1994). A compreensão de eventos de poliploidização em espécies nativas é, portanto, fundamental para compreensão do estabelecimento e manutenção de novas espécies (Sotis & Soltis, 2004).

A origem de um poliploide pode ser definida através de dois critérios distintos. O primeiro, proposto por Khiara & Ono (1921), considera que organismos poliploides formados a partir de indivíduos da mesma espécie são chamados autopoliploides, enquanto que organismos formados a partir de hibridização interespecífica são considerados alopoliploides. Em um segundo critério, são considerados o padrão de herança e o comportamento cromossômico. Em indivíduos com herança multissômica, os cromossomos de subconjuntos diferentes podem se parear sendo considerados autopoliploides, já em indivíduos com padrão dissômico, os cromossomos de subconjuntos diferentes não se pareiam durante a meiose, sendo considerados alopoliploides (Muntzing, 1936). Contudo, há casos intermediários entre esses dois extremos. Diversos estudos indicaram que alguns organismos de origem híbrida podem apresentar herança multissômica, sendo denominados de alopoliploides segmentados (Stebbins, 1950; Jones et al., 1996). Assim como autopoliploides podem também apresentar herança dissômica ou intermediária em função de processos de reestruturação genômica e reorganização da expressão gênica após a duplicação genômica (Parisod et al., 2010).

Dentre as modificações genômicas comuns nas angiospermas, há ainda o processo reverso à poliploidização, que é a diploidização de poliploides. Normalmente, rearranjos cromossômicos como deleções, fusões e inserções, somados ao silenciamento e mudanças epigenéticas começam a ocorrer logo após o evento de duplicação (Leitch & Leitch, 2008). Com o passar das gerações, o comportamento genômico passa a ser cada vez mais próximo de um genoma diploide. Indivíduos atualmente diploides que apresentam sinais de eventos de duplicação genômica no passado são denominados de paleopoliploides (Soltis & Soltis, 1999).

Estudos de autores clássicos durante o Século XX (Stebins, 1950; 1971; Wagner, 1970) tratavam linhagens poliploides como “becos evolutivos sem saída”. Tais estudos baseavam-se em observações de esterilidade e/ou baixa fertilidade, estabilidade genômica e “letargia evolutiva”, supostamente causadas pelo aumento de cópias alélicas. A taxa de diversificação era, portanto, considerada lenta e pouco expressiva quando comparada às linhagens diploides. No entanto, com a disponibilização crescente de informações sobre a reorganização do genoma em neopoliploides e paleopoliploides, da possibilidade em realizar experimentações em poliploides sintéticos e o incremento de estudos filogenéticos e de genética de populações, foi possível compreender que a poliploidização pode ser um processo evolutivamente vantajoso (Soltis et al., 2014). Atualmente, genomas poliploides são vistos como altamente dinâmicos. Além de sofrerem profundas mudanças estruturais e epigenéticas, aspectos como a formação recorrente de poliploides e a ocorrência de hibridação em zonas de contato secundário entre citótipos sustentam a poliploidia como uma das principais forças de diversificação de linhagens (Soltis & Soltis, 1999; Soltis et al., 2014).

A incidência de populações com citótipos mistos é de particular interesse para compreensão do papel da poliploidia na diversificação de linhagens, uma vez que permite inferir sobre os mecanismos responsáveis pela origem e coexistência de citótipos (e.g. Trávníček et al., 2011; Kolář et al., 2012). Há dois cenários que explicam a ocorrência de populações com citótipos mistos (Husband et al., 2013). No contato primário, poliploides originam-se repetidas vezes a partir de diploides locais, enquanto que no contato secundário, poliploides originaram-se em uma área geograficamente distinta e expandem-se até a área de ocorrência dos diploides. Esses dois cenários não são excludentes, uma vez que mosaicos de zonas de contato primário e secundário já foram descritas em vários estudos prévios (e.g. Stuessy et al., 2004; Balao et al., 2009; Kolář et al., 2009; Duchoslav

et al., 2010). A origem primária e secundária de poliploides pode ser verificada com a descrição de padrões de distribuição da variação genética (Husband et al., 2013; Kólar et al., 2017). A previsão é que eventos de contato primário produzirão populações de indivíduos diploides e poliploides geneticamente mais similares entre si do que quando comparados a populações distintas, enquanto que no contato secundário, citótipos distintos encontrados em uma mesma população são geneticamente mais divergentes.

A produção de indivíduos com citótipos intermediários (i.e. ploidia em número ímpar; triploides) é particularmente interessante para entender como poliploides se estabelecem em populações naturais. Poliploides recentes podem enfrentar uma desvantagem reprodutiva, pois a maioria dos cruzamentos resultam em citótipos intermediários (Levin, 1975). Quando esses citótipos intermediários geram descendentes férteis, há um aumento na formação de poliploides. Esse processo, denominado de ponte triploide, contribui para a manutenção e o estabelecimento de citótipos poliploides (Ramsey & Schemske, 1998; Husband, 2004; Husband et al., 2013). Por outro lado, citótipos intermediários podem apresentar adaptabilidade reduzida, seja por infertilidade ou baixa viabilidade (Levin 1975). Nesse caso, a produção de indivíduos com citótipos intermediários atua como barreira ao fluxo gênico entre citótipos, sendo denominada de bloco triploide (Köhler et al., 2010).

A evolução de estratégias reprodutivas alternativas, como a apomixia, pode garantir a perpetuação do citótipo de menor frequência na população, mesmo quando os citótipos intermediários apresentam adaptabilidade reduzida (Husband et al., 2013). A associação entre poliploidia (neo- ou paleopoliploides) e apomixia (obrigatória ou, geralmente, facultativa) já foi demonstrada em diversos estudos (e.g. Powers, 1945; Campbell & Dickenson, 1990; Carman, 1997). A expressão descompassada de genes no genoma duplicado está relacionada à formação de megásporos não reduzidos e sementes com múltiplos embriões, ambos característicos da reprodução apomítica (Carman, 1997). Estudos considerando populações de citótipos mistos apontam que a ocorrência de citótipos intermediários está geralmente relacionada à reprodução apomítica e à ocorrência de múltiplos citótipos em uma única população (revisado por Kolář et al., 2017).

Os resultados de estudos realizados nas últimas décadas sugerem fortemente que a reprodução assexuada, em geral, e a apomixia, em particular, podem ser um estágio transitório para fixação de genótipos poliploides e não uma sentença de estagnação

evolutiva (Horandl et al., 2009). No entanto, há ainda muitas questões em aberto sobre o papel da reprodução apomítica facultativa na dinâmica evolutiva de populações de citótípos mistos. A assexualidade pode tanto favorecer a coexistência a longo prazo de citótípos ou apenas postergar o efeito da seleção natural sobre citótípos desfavorecidos (i.e. reprodução sexuada dependente de frequência e/ou competição entre citótípos) (Krahulcová et al., 2009; Kolář et al., 2017).

Sistema de estudo

A orquídea *Zygopetalum mackayi* Hook. foi definida por Campacci et al. (2017) como populações morfologicamente e ecologicamente similares que são encontradas principalmente nos campos de altitude e campos rupestres do sudeste do Brasil. Gomes (2017) descreveu para esta espécie a ocorrência de três citótípos ($2N = 48$, $2N = 72$ e $2N = 96$) geograficamente estruturados e associados a variáveis climáticas distintas. Citótípos $2N = 96$ são muito mais frequentes ao longo da porção sul-sudeste da distribuição do grupo, nas Serras do Mar e Mantiqueira, onde há maior precipitação e amplitude térmica ao longo do ano. Já na porção norte da Serra do Espinhaço (norte de Minas Gerais e Bahia) e nos afloramentos graníticos do leste de Minas Gerais, há maior incidência de citótípos $2N = 48$, onde a precipitação e amplitude térmica anuais são menores. Uma clara zona de contato entre os indivíduos com citótípos $2N = 48$ e $2N = 96$ foi identificada ao norte-nordeste de Minas Gerais, onde há uma elevada frequência de indivíduos com citótípos intermediários ($2N = 72$) (Figura 1). Dados obtidos por FISH, utilizando genes ribossomais 45S e 5S sugerem uma origem autoploide de indivíduos $2N = 96$ de acordo com padrões de quantidade, posição e proporção de marcações cromossômicas entre os citótípos (Gomes, 2017). Entretanto a estrutura da distribuição geográfica dos citótípos, sua associação com variáveis climáticas distintas e o fato de outras espécies de *Zygopetalum*, ocorrentes em florestas também apresentarem exclusivamente número cromossômico $2N = 48$ sugerem que os citótípos $2N = 48$ e $2N = 96$ constituem linhagens evolutivas distintas (Gomes, 2017).

Dados preliminares sobre a meiose nos grãos de pólen reforçam a hipótese da ocorrência de histórias evolutivas distintas para os citótípos $2N = 48$ e $2N = 96$. Gomes (2017) mostrou que quanto maior o genoma, maior a irregularidade da meiose em *Z. mackayi*. Desta forma, citótípos $2N = 96$ produzem mais pólen inviável do que citótípos $2N = 48$. Tal fato sugere que citótípos $2N = 96$ são poliploides recentes ou neopoliploides,

enquanto que citótipos $2N = 48$ são paleopoliploides (Gomes, 2017). Considerando a maior amplitude geográfica do citótipo $2N = 96$ e a provável origem independente dos citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$, a elevada inviabilidade polínica observada por Gomes (2017) no pólen de indivíduos $2N = 96$ sugere que a reprodução apomítica pode estar restrita a citótipos poliploides. A ocorrência de reprodução apomítica em citótipos poliploides pode, portanto, garantir o sucesso dessa linhagem em detrimento do citótipo $2N = 48$.

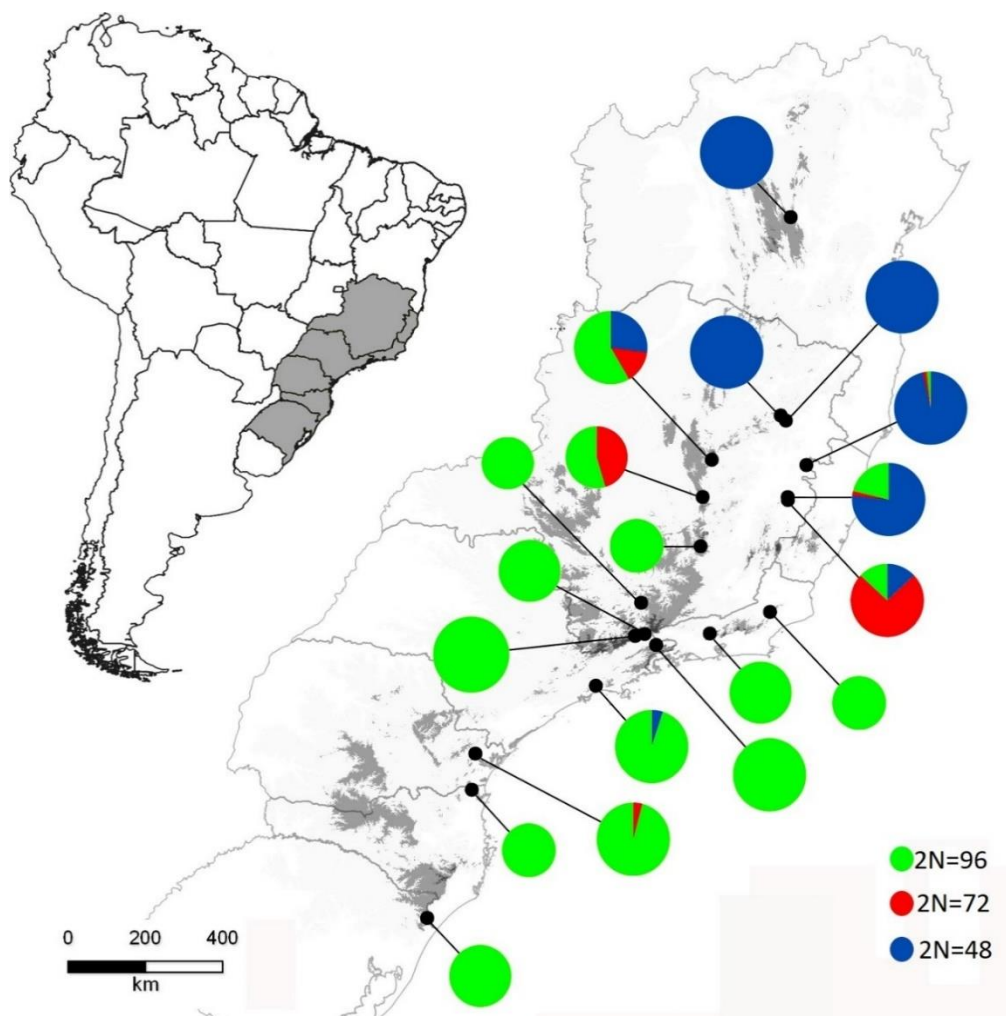


Figura 1- Mapa de distribuição dos citótipos de *Zygopetalum mackayi* Hook dos campos vegetacionais de altitude e campos rupestres do Brasil. Os círculos correspondem às populações, o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos: o maior por volta de 30, o médio por volta de 15, e o menor abaixo de 15. As cores representam as porções dos citótipos nas populações, sendo azul $2N = 48$, vermelho $2N = 72$ e verde $2N = 96$.

Plantas do complexo *Z. mackayi* foram de fato descritas como apomíticas (Suessenguth, 1923; Afzelius, 1950). Estudos recentes sobre embriogênese em *Z.*

mackayi realizados pelo nosso grupo de pesquisa esclareceram que apenas os citótipos $2N = 72$ e $2N = 96$ produzem embriões apomíticos de forma facultativa - o pólen é necessário para a formação das sementes apomíticas, que são formadas junto com embriões sexuados (G.V. Costa, com. pess.). O citótipo $2N = 48$ só produz embriões sexuados (G.V. Costa, com. pess.). *Z. mackayi* é, ainda, dependente do polinizador para produção de sementes (i.e. não há formação de frutos por autopolinização), sendo que plantas fertilizadas por pólen de populações distintas produzem mais sementes sexuadas viáveis do que plantas autopolinizadas (Campacci et al. 2017, Nunes et al. 2017). Adicionalmente, Campacci et al. (2017) mostraram que plantas autopolinizadas produzem mais sementes apomíticas, apesar do número total de sementes viáveis (sexuadas e apomíticas) entre autopolinizações e polinizações cruzadas não apresentar diferença. A partir dos resultados obtidos, Campacci et al. (2017) sugeriram a hipótese de que a baixa variabilidade genética do pólen nas autopolinizações estimula a reprodução apomítica para compensar a perda de embriões por endogamia. Entretanto, apesar do estudo de Campacci et al. (2017) ter feito importantes contribuições sobre a biologia reprodutiva em *Z. mackayi*, os autores não tinham conhecimento da ocorrência de múltiplos citótipos nessa espécie e, conseqüentemente, da relação entre citótipos e a ocorrência de apomixia.

Neste estudo exploramos o papel da apomixia para a manutenção e expansão de populações ao longo da distribuição geográfica de *Z. mackayi*. Adicionalmente, investigamos a origem dos citótipos e discutimos o papel da poliploidia na dinâmica evolutiva das populações de *Z. mackayi*. Especificamente propomos às seguintes perguntas:

1. Existe uma relação entre o tamanho do genoma (i.e. citótipos) e a ocorrência de reprodução apomítica, conforme sugerido por estudos embriológicos em andamento?
2. Há maior incidência de reprodução apomítica na zona de contato entre citótipos?
3. O contato dos citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$ de *Z. mackayi* é de origem primária ou secundária?
4. O citótipo $2N = 72$ tem sua origem na hibridização dos citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$?

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Para identificar a origem dos citótipos poliploides e entender sua relação com a ocorrência de reprodução apomítica, nós descrevemos a variabilidade genética a partir de marcadores microssatélites considerando 155 indivíduos de seis localidades, sendo duas representadas apenas pelo citótipo $2N = 48$ (NB-2X e PD-2X), duas pelo citótipo $2N = 96$ (GAR-4X e MAR-4X) e duas populações com citótipos mistos (ANG-M e PI-M), incluindo intermediários $2N = 72$ (Figura 2, Tabela 1). A coleta de indivíduos foi realizada pela equipe de S. Koehler como parte do projeto FAPESP (2014/04426-5; licença de transporte e coleta IBAMA/SISBIO processo 32837). Material testemunho referente a cada uma das populações amostradas foi depositado no herbário UEC.

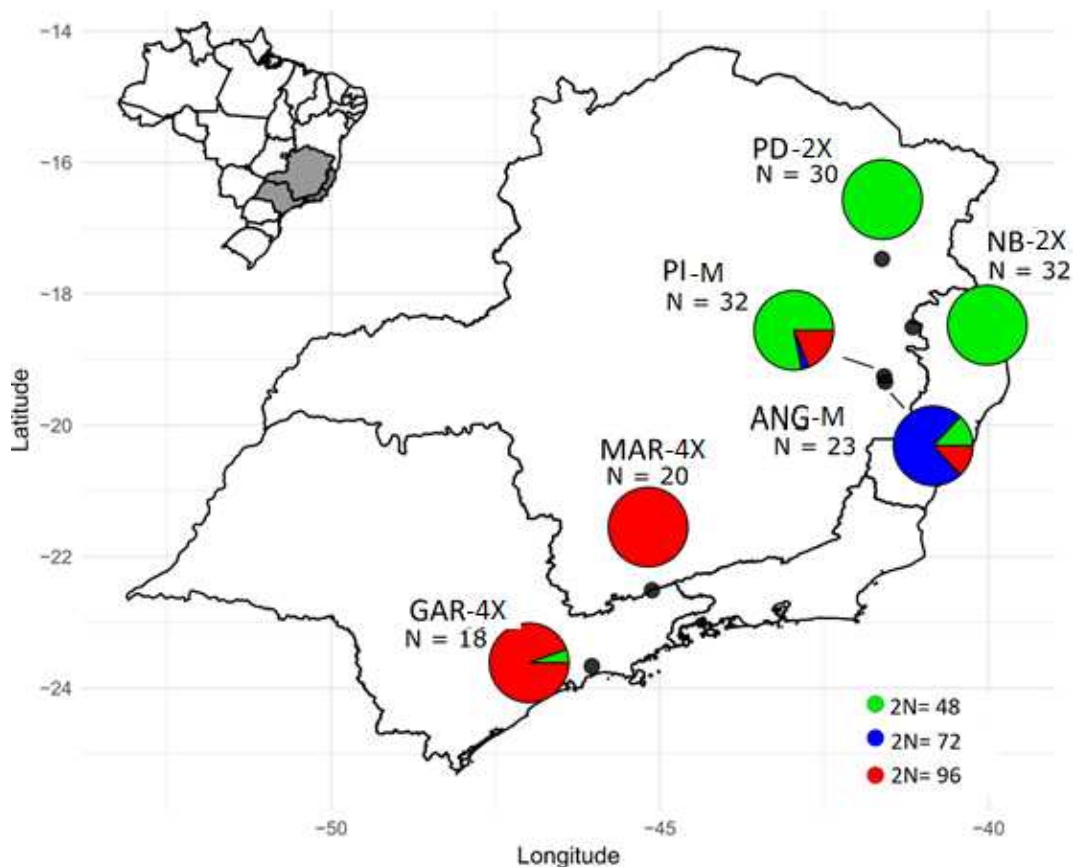


Figura 2- Populações de *Zygotetium mackayi* Hook. amostradas neste estudo. Os círculos representam as populações, as cores são referentes aos citótipos encontrados e sua proporção em cada população (N = número de indivíduos amostrados por população). A cor verde representa o citótipo $2N = 48$, azul $2N = 72$ e vermelho $2N = 96$.

Tabela 1 - Nome da população e localidade de origem; número de indivíduos amostrados (*N*) e proporção de citótipos dos 155 indivíduos de *Zygopetalum mackayi* Hook. considerados neste estudo.

Código	Localidade	<i>N</i>	% de citótipos
ANG-M	Conselheiro Pena-MG	23	11% : 2n=48, 75% : 2n=72; 14% : 2n=96
GAR-4X	Biritiba Mirim-SP	18	2n=96: 99%; 2n = 48: 1%
MAR-4X	Piquete –SP	20	2n=96: 100%
NB-2X	Nova Belém-MG	32	2n=48 :100%
PD-2X	Itape-BA	30	2n=48 :100%
PI-M	Conselheiro Pena-MG	32	77% : 2n=48, 2% : 2n=72, 21% : 2n=96

Determinação de citótipos

O tamanho do genoma dos indivíduos amostrados neste estudo foi determinado por Gomes (2017) em citômetro de fluxo de acordo com o protocolo de Dolezel et al. (2007), Loureiro et al. (2007) e Pellicer & Leitch (2014).

Desenvolvimento dos marcadores moleculares

Iniciadores para amplificação de regiões microssatélites foram desenhados a partir de bibliotecas enriquecidas com microssatélites. Inicialmente foram construídas sem sucesso duas bibliotecas de microssatélites baseadas em indivíduos 2N = 48 e 2N = 96 da população GAR-4X (Anexo1). Como os resultados desta primeira etapa foram insatisfatórios, duas novas bibliotecas baseadas nos mesmos indivíduos da população GAR-4X foram construídas novamente junto com cinco bibliotecas adicionais baseadas em um indivíduo de cada uma das cinco populações restantes amostradas para este estudo (Tabela 2).

O DNA total foi extraído com o kit de extração de DNA Nucleospin (MN LTDA) ou DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda). Para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, foram desenvolvidas bibliotecas enriquecidas com sequências microssatélites seguindo o protocolo de Billote et al. (1999) com modificações.

Tabela 2- Indivíduos de *Zygopetalum mackayi* Hook. utilizados para construção das bibliotecas enriquecidas com sequências microssatélites. População ao qual o indivíduo pertence, código do indivíduo selecionado e citótipo (ploidia) referente a cada indivíduo.

População	Código do indivíduo	Citótipo
NB-2X	ZM398	2N = 48
PD-2X	PD22	2N = 48
ANG-M	ANG22	2N = 72
PI-M	PI14	2N = 96
MAR-4X	ZM106	2N = 96
GAR-4X	ZM150	2N = 96

O DNA total de cada indivíduo foi digerido com enzima *RsaI* e ligado aos adaptadores *Rsa21* e *Rsa 25*. Os fragmentos foram selecionados usando sondas biotizadas contendo oligonucleotídeos GT e CT presas a esferas magnéticas cobertas com estreptavidina. Os fragmentos selecionados foram amplificados e clonados utilizando células competentes transformadas de *Escherichia coli* XL1-BLUE (Stratagene, La Jolla, CA, EUA), utilizando o vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA). Foram sequenciados 336 clones positivos considerando 48 clones de cada uma das bibliotecas construídas, dos quais os 56 de melhor qualidade foram selecionados para o desenho dos iniciadores de microssatélites (Anexo 3) a partir da amplificação do DNA plasmidial com iniciadores T7 e SP6 em um sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Otimização e seleção dos marcadores

A otimização e a seleção dos iniciadores mais informativos foram realizadas através de um estudo piloto, no qual um indivíduo de cada uma das seis populações foi amplificado com todos os 56 marcadores (Anexos 4, 5 e 6). A reação de amplificação considerou 50 mM de KCl, 20 mM de Tris– HCl (pH 8.4), 15 mM de MgCl₂, 0,48 mM DNTP, 1 mM de cada primer, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e 20 ng de DNA total, sendo o volume final foi ajustado para 12,15 µl com água ultra purificada. Para amplificação do DNA adotamos 95 °C 5 min, 10x [95 °C 1 min, 63-54 °C (-0,5 °C/ciclo), 72 °C 1 min], 25x [95 °C 1 min, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min], 72 °C 5 min. A qualidade e concentração dos produtos da amplificação foram verificadas em gel de agarose (2-3%), Em seguida os

produtos amplificados foram genotipados preliminarmente em gel de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata (AgNO_3). Após a seleção dos marcadores, todos os indivíduos foram genotipados seguindo os mesmos parâmetros do estudo piloto para reação e protocolo de amplificação. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Botstein et al., 1980) para cada um dos oito iniciadores foi calculado utilizando *poppr* (Kamvar et al., 2015) do programa R 3.4.0.

Estimativa de reprodução apomítica

A inferência de ocorrência de reprodução apomítica nas populações amostradas foi baseada nas estimativas de diversidade genética e genotípica das populações. Nas populações/citótipos onde a reprodução apomítica é dominante esperamos observar menor diversidade genética quando comparadas a populações/citótipos que se reproduzem principalmente de forma sexuada.

Diversidade genética e genotípica

Uma vez que os padrões de herança genética são desconhecidos para *Z. mackayi*, a comparação da diversidade genética entre citótipos distintos só foi possível através da transformação dos alelos amplificados em uma matriz binária, considerando a presença ou ausência de cada alelo para cada indivíduo. Os parâmetros genéticos estimados para cada população foram: número total de alelos (N_a); número de alelos privados (N_p); proporção média de heterozigotos por loco (H_p) para cada população e total. Adicionalmente foi calculado o número de genótipos multilocos (MGL). Cada genótipo multiloco consiste no conjunto de alelos provenientes de dois ou mais locos (riqueza genotípica).

A diversidade genética foi estimada a partir de três índices distintos que se adequam ao tipo de dado utilizado (diversidade alélica) e não assumem pressupostos biológicos: índice de Shannon (Shannon, 2001), índice de Simpson (Simpson, 1949) e diversidade de Nei (Nei, 1978). Todos estes parâmetros foram estimados utilizando o pacote *poppr* (Kamvar et al., 2015) do programa R 3.4.0.

Os indivíduos diploides (NB-2X, PD-2X e PI-M) também foram analisados separadamente utilizando o modo leitura codominante devido ao cariótipo diploide, possibilitando uma investigação mais profunda sobre os aspectos reprodutivos dos indivíduos $2N = 48$. Para esses indivíduos foram estimados os seguintes parâmetros:

heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e a porção da endogamia causada por endocruzamento/assexualidade (F_{is}). Todos os parâmetros foram estimados utilizando o pacote *diversity* (Keenan et al., 2013) do programa R 3.4.0.

Agrupamento genético e estrutura populacional

A origem dos diferentes citótipos (primária vs. secundária) foi inferida através da descrição da estrutura da diversidade genética considerando todos os indivíduos amostrados nas seis populações.

Inicialmente foi calculada a distância genética entre os indivíduos pelo método de Bruvo (2004). Essa distância é a mais adequada para sistemas envolvendo ploidias pequenas e mais de um citótipo (Bruvo, 2004). A matriz de distâncias genéticas de Bruvo e a posterior análise de componentes principais (PCA) foram obtidas utilizando-se o pacote *polysat* (Clarck & Jasienut, 2011) implementado no programa R 3.4.0.

Para análise de agrupamentos genéticos foi realizada uma análise de discriminantes de componentes principais (DAPC; Jombart et al., 2010). A DAPC é similar ao STRUCTURE no uso de testes bayesianos para a atribuição de indivíduos a agrupamentos identificados, mas dispensa a necessidade de assumir algum modelo genético populacional para estimar os agrupamentos (Jombart et al., 2010). O número de agrupamentos foi estimado com a função *find.clusters* do pacote *adegenet* (Jombart et al., 2008) do R3.4.0. Foram estimados agrupamentos a partir de todos os indivíduos juntos e separados por citótipo.

Adicionalmente à DAPC, foi realizada uma análise molecular de variância (AMOVA), utilizando a distância de Excoffier (Excoffier et al., 1992) para comparar hipóteses alternativas sobre a origem dos citótipos. Se a origem dos citótipos é primária, citótipos poliploides originaram-se repetidamente e independentemente em cada população. Neste caso esperamos que os genótipos estejam aninhados em cada citótipo, que por sua vez estão aninhados em cada população. Se a origem dos citótipos é secundária, cada um dos citótipos originou-se uma única vez, expandindo-se geograficamente. Neste caso os genótipos estarão aninhados em populações, sendo estas aninhadas em citótipos. Para isso foram analisados três níveis hierárquicos de variação, o primeiro consiste na variação entre as populações, o segundo diz respeito à variação entre os citótipos dentro das populações, e o terceiro à variação entre os indivíduos dentro dos citótipos dentro das populações. O método de reamostragem utilizado foi a permutação

(1999 réplicas). A AMOVA foi realizada utilizando o pacote *poppr* (Kamvar et al., 2015) do R 3.4.0.

A fim de mensurar o nível da estruturação da diversidade genética foram calculados o *Gst* global e par a par entre as populações, ambos calculados utilizando o pacote *poppr* (Kamvar et al., 2015) do R 3.4.0. Os resultados das comparações par a par de estimativas *Gst* foram representados em um *heatmap* gerado a partir do pacote *heatmap3* (Zhao et al., 2014) do R 3.4.0.

RESULTADOS

Otimização e seleção dos marcadores

Oito marcadores (NB2, NB8, Pi-1, Pi-3, Pi-9, MA6, GAR1 e GARD2) apresentaram amplificação bem sucedida e polimorfismo em todos os seis indivíduos das seis populações amostradas (Tabela 3). Os iniciadores apresentaram valores médios elevados de PIC, todos acima de 0,5 (Tabela 3).

Tabela 3- Iniciadores para amplificação de regiões microssatélites desenhados na segunda etapa de bibliotecas construídas e que apresentaram amplificação positiva em indivíduos de todas as populações amostradas da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook., Código do iniciador, motivo microssatélite, sequência do iniciador, tamanho do produto de amplificação em pares de base, e valor de conteúdo de informação polimórfico médio (PIC).

Código	Motivo	Sequência (F;R)	Produto (pb)	PIC
NB2	(GA)23	TCCCTCCATATTCCTCTCC GCCAAAAAGTTTCCAAAAAGTG	260	0,794
NB8	(TG)10.. (GA)10	CTGCATGTATGTTTGTGCATGT CACACACACATTCCTCCCTCT	133	0,613
PI1	(GT)5...(AG)14(GT)5	GCGTCTATGCAGCTGTGTGT GGCACATGCACACTCTATTCC	151	0,693
PI3	(TG)7...(TG)6	TTGAGTGAGAGTGTGAGCGAAT CGCATAACACAGAACACATTG	157	0,837
PI9	(TC)15	CGCATGTCAAGTGATGGTTT CCCACCACATGAGATCAGC	294	0,768
MA6	(ACC)4	GATGAAGAGGAGGAGAAACC CATTCTCACTAAGGGCTAC	258	0,695

GAR1	(TG)15	ACGCGCCTAGAAAATCCTAA ACCCGAAAGATCCTAGTAGG	270	0,862
GARD2	(GT)5	TTGAGTGTGTTTGTGTGAAC CACACAGCTCACTAACACAT	112	0,532

Diversidade genética e genotípica

Em geral, as populações mistas (ANG-M e PI-M) apresentaram maior riqueza alélica. Não foram observadas diferenças em relação à proporção de alelos privados e a proporção de heterozigotos entre citótipos por população ou quando comparadas populações mistas com populações com um citótipo dominante (Tabela 4). Os índices de diversidade calculados também não apresentaram relação com os citótipos ou com a frequência dos mesmos nas populações (Tabela 4). O número de genótipos multilocos (*MGL*) revelou apenas um único clone na população GAR-4X. Para os indivíduos 2N = 72 nenhum clone foi amostrado (Tabela 4).

Tabela 4- Diversidade genética e genotípica das populações analisadas de *Zygopetalum mackayi* Hook. *Na*= número de alelos; *Np*= alelos privados; *Hp*= proporção de heterozigotos média por loco e desvio padrão; *MGL*= genótipos multilocos; *eMGL*= genótipos multilocos esperados para o menor número populacional amostrado; diversidade de Shannon; diversidade de Simpson; diversidade de Nei.

População	<i>Na</i>	<i>Np</i>	<i>Hp</i>	<i>MLG</i>	<i>eMLG</i>	Shannon	Simpson	Nei
ANG-M	44	9	0,576+/-0,24	32	18	3,14	0,969	0,188
GAR-4X	42	7	0,868+/-0,15	17	17	2,81	0,938	0,303
MAR-4X	36	5	0,592+/-0,25	20	18	3	0,95	0,113
NB-2X	38	8	0,617+/-0,28	30	18	3,47	0,967	0,144
PD-2X	30	7	0,425+/-0,20	23	18	3,4	0,957	0,296
PI-M	47	5	0,636+/-0,20	32	18	3,47	0,969	0,277
Global				154	154	5,03	0,993	0,293

As análises realizadas apenas com os indivíduos 2N = 48 considerando os marcadores como codominantes indicaram elevada diversidade com ausência de endogamia (valores de *Fis* entre -0.36 e -0.11) e excesso de heterozigotos para todas populações analisadas (NB-2X, PD-2X e PI-M) (Tabela 5).

Tabela 5- Parâmetros populacionais estimados a partir da leitura codominante dos dados dos indivíduos $2N = 48$ (diploides) amostrados de *Zygopetalum mackayi* Hook. População, (N) número de indivíduos; (H_o) heterozigosidade observada; (H_e) heterozigosidade esperada; (F_{is}) coeficiente de endogamia..

População	N	H_o	H_e	F_{is}
NB-2X	32	0.63	0.47	-0.3617
PD-2X	32	0.65	0.58	-0.1107
PI-M*	27	0.69	0.59	-0.1697

*Apenas os indivíduos $2N = 48$ da população PI-M foram analisados considerados nessa análise.

Agrupamento genético e estrutura populacional

Na PCA feita a partir da distância genética de Bruvo, os indivíduos das populações com um único citótipo (NB-2X, PD-2X, MAR-4X e GAR-4X) agruparam-se com indivíduos da mesma população, porém, nas populações mistas, (ANG-M e PI-M) os indivíduos de citótipos diferentes emergiram como geneticamente mais próximos aos indivíduos de mesmo citótipo provenientes de outras populações (Figura 3). Os indivíduos do citótipo $2N = 72$ se apresentaram em posição intermediária entre $2N = 48$ e $2N = 96$ (Figura 3).

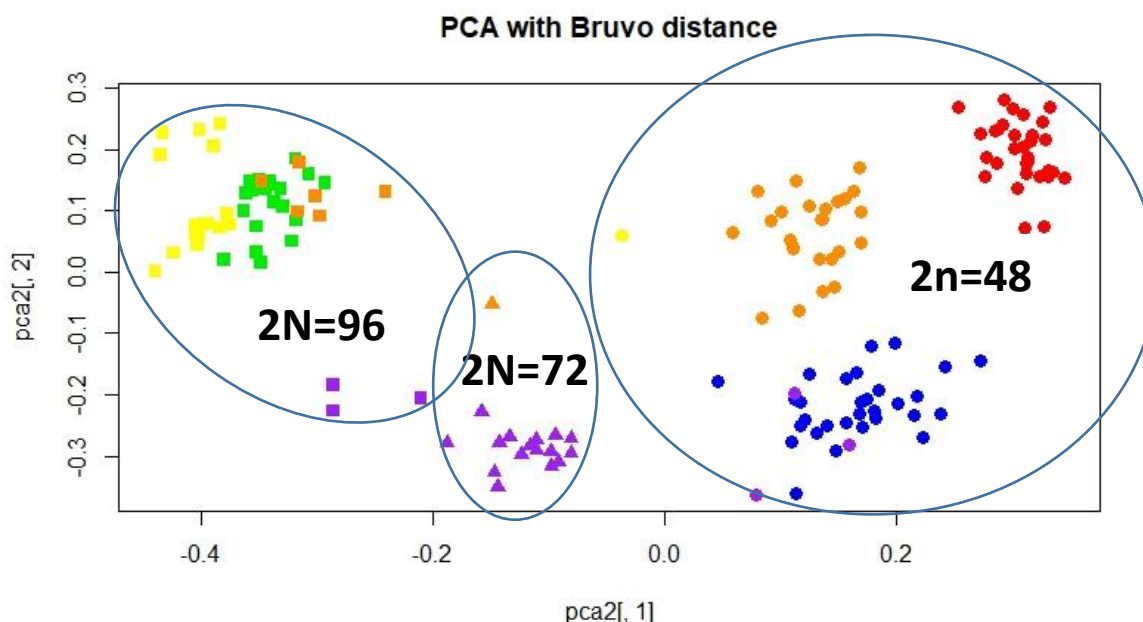


Figura 3. Análise de componentes principais estimada a partir da distância de Bruvo das populações de *Zygopetalum mackayi* Hook. amostradas de acordo com a Tabela 1. NB-2X= vermelha; PD-2X= azul; ANG-M= roxa; PI-M= laranja; GAR-4X= amarela; MAR-4X= verde; citótipo $2N = 48$ (círculos); citótipo $2N = 72$ (triângulos); $2N = 96$ (quadrados).

A DAPC considerando todos os indivíduos apontou para um número de agrupamentos igual a 10 ($k=10$). A diversidade genética nas populações estudadas mostrou-se muito estruturada (Figura 4). As populações formadas exclusivamente por citótipos $2N = 96$ (MAR-4X e GAR-4X) são geneticamente mais homogêneas, as mistas (PI-M e ANG-M) apresentam indivíduos que combinam características de indivíduos de outras populações e as populações formadas exclusivamente por citótipos $2N = 48$ (NB-2X e PD-2X) são as geneticamente mais heterogêneas. Os indivíduos $2N = 96$ da população PI-M emergiram no agrupamento dos indivíduos $2N = 96$ da população MAR-4X. As análises considerando apenas os indivíduos com citótipo $2N = 48$ resultaram em três agrupamentos, que coincidiram com as populações (Figura 5).

As análises considerando apenas os indivíduos com citótipo $2N = 96$ resultaram em quatro agrupamentos, sendo que os indivíduos de MAR-4X e PI-M emergiram como geneticamente mais semelhantes entre si quando consideramos todos os indivíduos amostrados. A população GAR apresentou dois grupos genéticos distintos das demais, barras em turquesa e verde (Figura 6).

A AMOVA indicou que a maior parte da variação está entre os indivíduos (88%), as variâncias contidas entre as populações (5%) e entre os citótipos dentro das populações foram baixas (6%) (Tabela 7). Os índices de fixação calculados, ϕ_{CT} indica diferenciação entre as populações, ϕ_{SC} indica diferenciação entre citótipos dentro de grupos e ϕ_{ST} indica diferenciação entre citótipos entre populações apresentaram valores altos (Tabela 6). Porém apenas o ϕ_{CT} apresenta valor de $p < 0,001$, os demais apresentaram $p > 0,05$.

O valor global de Gst foi de 0,233, o que reflete a alta estrutura da diversidade genética nas populações estudadas. Os valores de Gst par-a-par variaram de -0,08 a 0,245 e indicam que PI-M e MAR-4X, assim como ANG-M e PD-2X são as populações com menor divergência devido a estruturação geográfica (Figura 7).

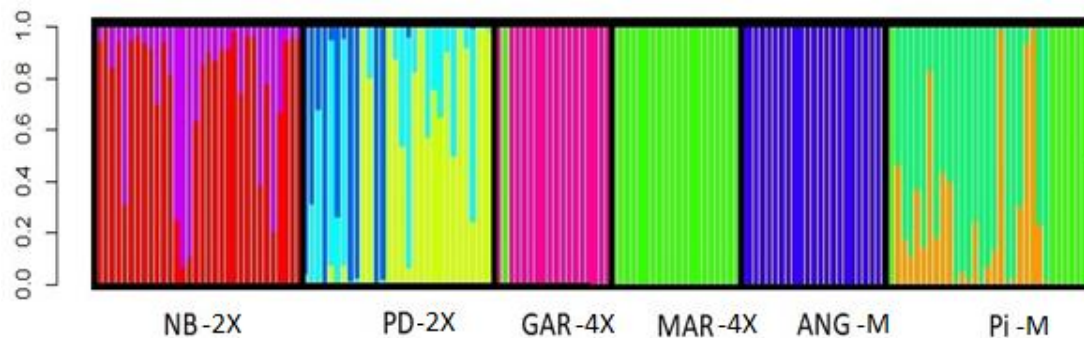


Figura 4. Resultado da análise de discriminantes dos componentes principais (DAPC) considerando todos os citótipos amostrados de *Zygopetalum mackayi* Hook. As cores indicam a probabilidade de um indivíduo pertencer a um agrupamento genético (indicado pela cor). As siglas abaixo da figura indicam as populações de acordo com a Tabela 1. Valor de $k=10$.

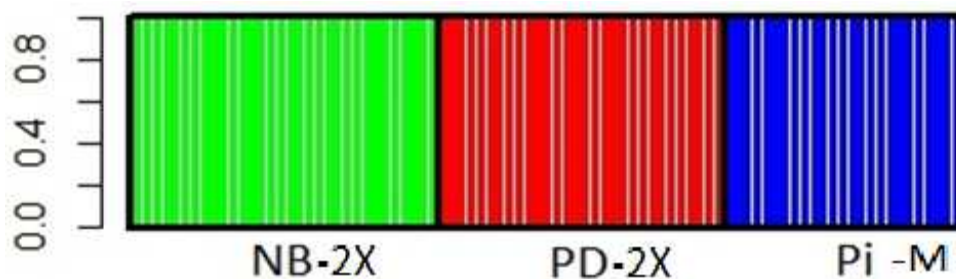


Figura 5. Resultado da análise de discriminantes dos componentes principais (DAPC) considerando apenas os indivíduos amostrados do citótipo $2N = 48$ de *Zygopetalum mackayi* Hook. As cores indicam a probabilidade de um indivíduo pertencer a um agrupamento genético (indicado pela cor). As siglas abaixo da figura indicam as populações de acordo com a Tabela 1. Valor de $k=3$.

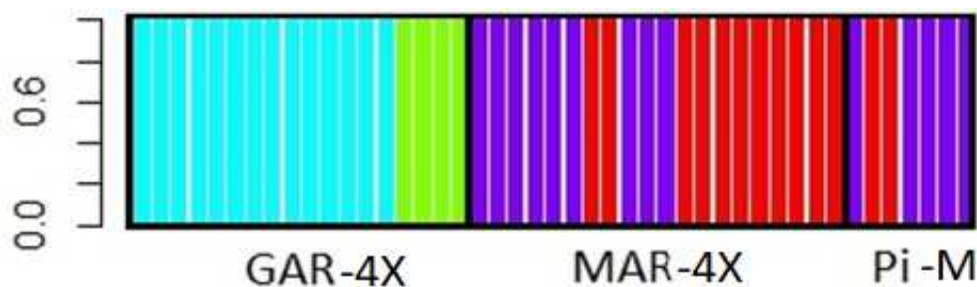


Figura 6. Resultado da análise de discriminantes dos componentes principais (DAPC) considerando apenas os indivíduos amostrados do citótipo $2N = 96$ de *Zygopetalum mackayi* Hook. As cores indicam a probabilidade de um indivíduo pertencer a um agrupamento genético (indicado pela cor). As siglas abaixo da figura indicam as populações de acordo com a Tabela 1. Valor de $k=4$.

Tabela 6. Resultados da análise de variância molecular AMOVA realizada a partir das populações amostradas de *Zygopetalum mackayi* Hook. conforme apresentado na Tabela 1. GL= graus de liberdade.

Agrupamentos AMOVA	GL	% de variância	Componentes de variância	Índices de fixação	Significância
Entre populações	5	5.700.303	4.597.912	$\phi_{ct} = 0,570$	$p = 0,0150$
Entre citótipos dentro das populações	5	6.297.451	5.079.576	$\phi_{sc} = 0,667$	$p = 0,2700$
Entre indivíduos	144	88.002.245	70.983.339	$\phi_{st} = 0,119$	$p = 0,0001$
Total de variação	154	100.000.000	80.660.827		

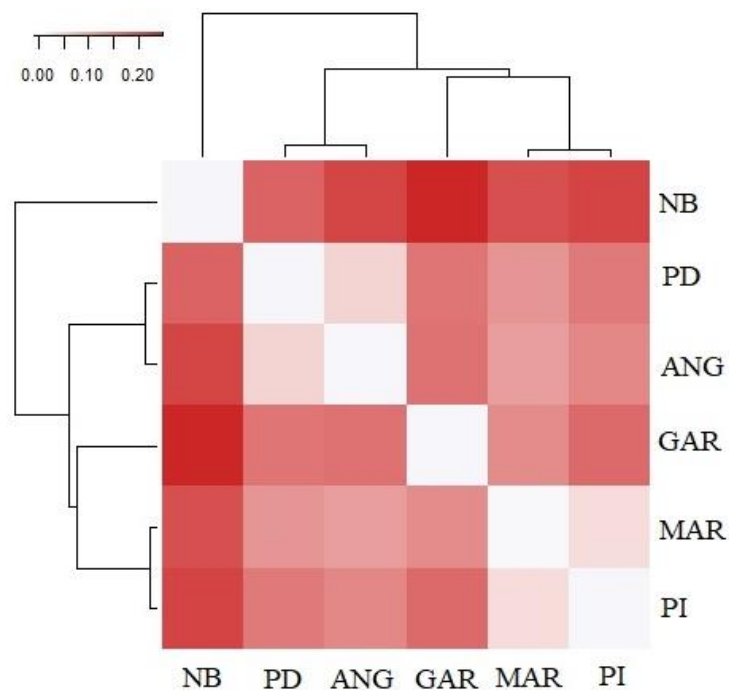


Figura 7- Heatmap baseado nos valores de G_{ST} par-a-par calculados para indivíduos das populações de *Zygopetalum mackayi* Hook. amostradas. As siglas indicam as populações de acordo com a Tabela 1.

DISCUSSÃO

Nesse estudo nós desenhamos marcadores microsatélites para indivíduos de seis populações da orquídea *Z. mackayi* com intuito de entender a relação entre reprodução apomítica e a ocorrência de múltiplos citótipos nesta espécie. Especificamente, nós testamos a hipótese de que populações de *Z. mackayi* formadas por citótipos mistos apresentam maior incidência de reprodução apomítica do que populações dominadas por apenas um citótipo. Adicionalmente, nós descrevemos a natureza do contato entre citótipos em populações mistas (primária vs. secundária) e a origem do citótipo intermediário. Os resultados são discutidos considerando o papel da apomixia na dinâmica evolutiva de populações de *Z. mackayi*.

Relação entre tamanho de genoma e apomixia

Nós não identificamos nenhuma evidência de reprodução apomítica preferencial em populações mistas quando comparadas a populações com citótipos dominantes. As estimativas de diversidade genética intrapopulacionais (Tabela 4) em populações mistas são semelhantes às aquelas em populações com citótipos dominantes, sugerindo que não há maior frequência de reprodução apomítica em populações mistas. No entanto, a reprodução sexuada parece ser mais frequente em populações formadas por citótipos $2N = 48$, representadas neste estudo pelas populações NB-2X e PD-2X. Isso porque, a análise dos indivíduos $2N = 48$ considerando a leitura codominante dos marcadores indicou que esse citótipo é exclusivamente alógamo (Tabela 6). Este resultado concorda com estudos embriológicos em andamento pela nossa equipe que mostraram que não há formação de embriões apomíticos no citótipo $2N = 48$ (G. Vieira, dados não publicados).

O único clone identificado pertence à população GAR-4X ($2N = 96$), sugerindo que há reprodução apomítica nesse citótipo como o esperado em poliploides recentes (Carman, 1996). Quando comparados a estudos com outras espécies apomíticas facultativas, nossos dados de diversidade genética apresentam valores muito superiores, sugerindo que a sobrevivência de embriões sexuais é superior aos apomíticos. Braccacia et al. (2006) obtiveram 0,06 contra 0,29 de diversidade global de Nei para *Hypericum*, Dias et al. (2017) obtiveram 0,16 pra diversidade global de Nei, e 2,4 para diversidade de Shannon para *Miconia* contra 0,29 e 5 estimados para *Z. mackayi* (Tabela 5).

A maneira com que a variação genética se distribui em *Z. mackayi* também difere quando comparada à esperada para apomíticos facultativos. Nossos dados revelam que a

maior parte da variação genética está contida entre os indivíduos dentro das populações 70% e 5% dentro das populações, sugerindo que há maior diversidade entre os indivíduos que o esperado para apomíticos facultativos, o padrão encontrado se assemelha mais com espécies de reprodução sexuada (Tabela 6). Já em Dias et al. (2017), a maior variação encontra-se entre as populações 74% e apenas 26% dentro delas, devido à menor diferenciação genética entre indivíduos dentro da população e ao baixo fluxo gênico causados pela reprodução apomítica. Os resultados de Dias et al. (2017) estão de acordo com o padrão esperado para plantas apomíticas facultativas (revisado por Horandly & Paun, 2007). O número de genótipos multilocos (*MGL*) neste estudo também foram mais altos: quase 100% de genótipos distintos enquanto Bayer (1990) e Horandly & Paun (2007) identificaram uma taxa de 2%.

Quando comparados os índices de diversidade calculados para as populações $2N = 48$ (exclusivamente alógamas) e $2N = 96$, dominantes os valores foram similares (Tabela 4). Portanto, nossos resultados sugerem que a apomixia ocorra em baixa frequência no citótipo $2N = 96$, do contrário teríamos valores de diversidade menores para o citótipo $2N = 96$, haja vista que a ocorrência de apomixia impactaria negativamente na diversidade com o decorrer das gerações (Adolfsson et al., 2007; Horandl et al., 2009).

A baixa estimativa de clonalidade no citótipo $2N = 96$ pode ser explicada pela formação reduzida ou pela baixa sobrevivência de embriões apomíticos em relação aos sexuados. Campacci et al. (2017) já haviam demonstrado a baixa viabilidade das sementes poliembriônicas (i.e. com embriões apomíticos e sexuados) em relação às monoembriônicas (i.e. apenas com embriões sexuados). Ambos os fatores podem ainda ocorrer conjuntamente, tornando raros os clones sobreviventes.

A reprodução apomítica tende a ter papel importante na manutenção das populações mistas, sendo uma forma de driblar a exclusão do citótipo minoritário (Levin 1972), devido à dificuldade de reprodução sexuada causada pela baixa frequência do citótipo recém formado na população (Kolár et al., 2016; Pettit et al, 1999). Contudo, nossos resultados para os índices de diversidade (Tabela 4) apresentam valores similares para populações mistas (ANG-M e PI-M) e puras contendo $2N = 96$ (MAR-4X e GAR-4X), indicando que mesmo em populações mistas a reprodução apomítica não ocorre em taxas elevadas.

Existem outros caminhos para manutenção de múltiplos citótipos em uma população, como modos de reprodução que favoreçam o cruzamento preferencial e

evitem interações reprodutivas entre os citótipos pois, a hibridização e a introgressão podem eliminar o citótipo minoritário (Kolár et al, 2017). Podendo haver entre os citótipos a existência de barreiras pré-zigóticas como diferenças fenológicas e de polinizadores ou pós-zigóticas como inviabilidade de híbridos e baixo sucesso de clones, já documentados por Husband & Sabara (2004) e Sabara et al. (2013). Estudos posteriores, considerando cruzamentos entre citótipos distintos são necessários para identificar quais fatores estão atuando para manutenção do citótipos nas populações mistas.

É possível que a reprodução em populações dominadas por citótipos $2N = 96$ também seja principalmente alógama, mas o padrão de herança dos marcadores microsatélites em poliploides de *Z. mackayi* é desconhecido, não permitindo a inferência de endogamia de maneira direta nesses indivíduos. Nossos resultados sugerem, portanto, que a reprodução em *Z. mackayi* é sexuada no citótipo $2N = 48$ e predominantemente sexuada no citótipo $2N = 96$. Para o citótipo intermediário $2N = 72$ a amostragem não é suficiente para descartar a ocorrência de apomixia. Os estudos disponíveis na literatura (revisado por Petit et al., 1999 e Kolár et al., 2017) indicam que indivíduos com citótipos intermediários geralmente apresentam reprodução apomítica pois a meiose é afetada pelo desbalanceamento do número de cromossomos, gerando gametas estéreis (Ramsey & Schmesk, 2002). Nossos resultados, no entanto, sugerem a ocorrência de reprodução apomítica em conjunto com a reprodução sexuada no citótipo $2N = 72$. Isso porque a população ANG-M apresenta altíssima frequência de indivíduos $2N = 72$ (triploides) (Figura 2) e altos valores de diversidade genética (Tabela 4), sem nenhum clone identificado em nossa amostragem.

O papel do citótipo intermediário

Populações com múltiplos citótipos são consideradas evolutivamente instáveis devido à teoria de exclusão do citótipo minoritário (Levin, 1972), que prevê que dificuldades de reprodução sexuada levam ao seu desaparecimento. Quando férteis, ou parcialmente férteis, indivíduos com citótipos intermediários podem possibilitar a reprodução sexuada entre citótipos, mediando o fluxo gênico e a introgressão entre os demais citótipos, formando uma ponte triploide (Ramsey & Schemske, 1998; Husband, 2004; Husband et al., 2013). Pontes triploides podem ser unilaterais ou bilaterais, de acordo com o número de citótipos que o triploide pode reproduzir-se, gerando

descendentes férteis (Kolár et al, 2017). A consequência de pontes triploides para a evolução são a ocorrência de fluxo gênico e a introgressão entre os citótipos parentais, diminuindo assim a pressão de exclusão sobre o citótipo menos frequente (Ramsey & Schemske, 1998; Husband, 2004; Husband et al., 2013; Kolar et al., 2017).

Alternativamente, a coexistência de citótipos em uma zona de contato pode ser viabilizada pela ocorrência de cruzamento preferencial entre indivíduos com mesmo citótipo e pelo isolamento reprodutivo entre citótipos (Weiss, 2002). Nesse caso, citótipos intermediários podem atuar como blocos triploides, que consistem de híbridos interploides inférteis e pode significar uma desvantagem ao citótipo menos frequente (Ramsey & Schemske, 1998; Koehler, 2010; Husband et al., 2013).

Em *Z. mackayi*, verificamos que os indivíduos $2N = 72$ apresentam índices de diversidade similares aos outros citótipos e apresentam reprodução exclusivamente ou majoritariamente sexuada. O fato de todos os indivíduos $2N = 72$ analisados neste estudo serem geneticamente distintos entre si e da população de citótipos $2N = 72$ apresentar elevada diversidade genética sugere que seus gametas sejam, em algum grau, férteis. De fato, Gomes (2017) mostrou que a viabilidade polínica no citótipo $2N = 72$ de *Z. mackayi* é intermediária entre os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$, o que suporta a hipótese de que o citótipo $2N = 72$ gere parcialmente descendentes férteis através de reprodução sexuada. Neste caso, o citótipo $2N = 72$ pode atuar como uma ponte entre os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$. No entanto, a ausência de citótipos com número cromossômicos maiores (e.g. pentaploides, $2N = 120$; e hexaploides, $2N = 144$) sugere que a ponte triploide é unilateral. Os indivíduos com ploidias ímpares podem produzir gametas tanto reduzidos (N) quanto não reduzidos ($2N$ ou $3N$) (Ramsey & Schemske, 1998). A ausência de citótipos de número cromossômico mais alto sugere a existência de barreiras reprodutivas para sua formação. O fluxo gênico pode ser desigual entre o citótipo intermediário e os demais, pois a proximidade genética entre as populações ANG-M e PD-2X (Figura 7) sugere a ocorrência de fluxo gênico entre os citótipos $2N = 48$ e $2N = 72$, porém é necessário amostrar um maior número de populações para confirmar a hipótese da ponte triploide em *Z. mackayi*.

O fluxo gênico desigual entre citótipos e a ausência de citótipos com números cromossômicos mais elevados podem estar relacionados também à formação específica desses citótipos, pois algumas combinações de gametas com ploidias diferentes podem ser deletérias ou mesmo incompatíveis (Bretagnolle & Thompson, 1994). Citótipos com

ploidias ímpares férteis ou parcialmente férteis são raros (Husband, 2004; Kolár et al., 2017), mas já documentados por Mandaková, (2013) e Zozomová-Liová (2014). No entanto, a literatura carece de estudos que investiguem os impactos genéticos da reprodução sexual desses indivíduos na dinâmica evolutiva das populações (Kólar et al., 2017). Nosso estudo mostra a existência de triploides ($2N = 72$) com comportamento reprodutivo próximo ao de plantas alógamas.

O fato dos citótipos parentais apresentarem pouca mistura genética mesmo em populações mistas (PI-M e ANG-M) (Figura 3), pode indicar que a introgressão é pouco frequente e ou recente. Estudos futuros devem considerar o impacto do citótipo intermediário no sucesso reprodutivo dos demais citótipos, considerando um estudo genético populacional que abranja várias gerações. Conhecendo o padrão de segregação dos marcadores, pode-se explorar todo potencial codominante dos microssatélites, o que possibilita inferências mais precisas sobre endogamia e introgressão também em populações poliploides.

Outra possível razão para as populações contendo triploides terem valores de diversidade genética semelhante aos de citótipos que são exclusivamente ou majoritariamente sexuados é que a formação desses indivíduos ocorre em taxas muito altas, sendo recorrente nas populações mistas (Kolár et al., 2017). Na literatura, a grande maioria dos casos de ocorrência de citótipos intermediários está relacionada à formação de híbridos entre demais citótipos (revisado por Kólar et al, 2017). Para testar tal hipótese um estudo genético geracional se faz necessário novamente, a fim de investigar as relações de introgressão e quantidade de indivíduos $2N = 72$ recém formados a partir de hibridização dos demais citótipos.

Contato secundário

A ocorrência do citótipo $2N = 72$ apenas em populações mistas, sendo geneticamente intermediário aos citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$, aliada à distribuição parapátrica dos citótipos mais comuns, reforça o cenário de contato secundário entre os citótipos e a hipótese de pelo menos duas espécies distintas em *Z. mackayi* (Figuras 3, 4 e 6). Os resultados da PCA, AMOVA e da DAPC indicam que indivíduos com o mesmo citótipo, mas de populações distintas são geneticamente mais similares entre si do que em relação a indivíduos da mesma população que apresentam citótipos distintos. Esse resultado sugere que um ou mais eventos de poliploidização originaram o citótipo $2N =$

96, que posteriormente se expandiu geograficamente, entrando em contato (secundário) com o citótipo $2N = 48$.

O contato secundário também foi verificado em diversos estudos em complexos poliploides, tais como Mrás et al. (2012) e Zozomová et.al. (2015). Populações mistas com origem no contato secundário entre os citótipos são os casos mais comuns na natureza (revisado por Kolar et al., 2017). Porém, complexos poliploides contendo citótipos intermediários incomuns, ainda mais incomum em conjunto com sistema de reprodução predominantemente sexuado como nossos dados demonstraram para *Z.mackayi*.

A principal consequência da identificação da natureza do contato secundário em *Z. mackayi* é para delimitação de novas espécies. Os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$ ocorrem majoritariamente em áreas com histórias geológicas distintas e características de solo e clima distintos (Gomes, 2017). Os campos rupestres do leste do Brasil, onde o citótipo $2N = 48$ é mais comum, restringem-se a Serra do Espinhaço, localizada no centro-norte de Minas Gerais e ao sul da Bahia. Essas formações são constituídas principalmente por rochas quartizíticas (Amorim et al., 2012). Já as Serras do Mar e Mantiqueira, onde concentra-se o citótipo $2N = 96$, são formadas principalmente por rochas graníticas (Giuliette & Pirani, 1989, Silveira et al., 2015). A divergência genética encontrada entre os citótipos descrita aqui aliada à ocorrência de citótipos em ambientes geologicamente e climaticamente distintos são fortes indicativos de que os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$ sejam linhagens distintas, que correspondem a pelo menos duas espécies crípticas. Estudos ecológicos e em biologia reprodutiva estão em andamento para verificar a existência de barreiras pré-zigóticas e pós-zigóticas entre os citótipos.

Poucas espécies são classificadas levando em conta a questão dos citótipos, a poliploidia mesmo sendo umas das principais forças de especiação nas angiospermas vem sendo negligenciada do ponto de vista taxonômico, pois muitas vezes diferenças genéticas e genômicas não correspondem necessariamente a diferenças morfológicas (Mayr 1992; Soltis et al., 2007). Estudos recentes na área de genômica, modelagem de nicho ecológico e experimentos em fisiologia vegetal, têm conseguido identificar adaptações específicas para citótipos distintos que podem explicar processos de especiação. Por exemplo, os estudos de Laport et al. (2013) e Mrás et al. (2012) verificaram que citótipos distintos ocupam nichos ecológicos distintos. Maheralli et al. (2009) verificaram diferenças fisiológicas distintas em resposta ao estresse hídrico, mostrando que divergência genética

e geográfica (em fina ou larga escala) somadas à diferenciação ecológica e fisiológica suportam o reconhecimento de linhagens evolutivas distintas como espécies distintas.

CONCLUSÕES

Neste estudo, demonstramos que a apomixia não tem papel expressivo na estrutura populacional da orquídea *Z. mackayi*, independente da frequência de citótipos em cada população. Nossos resultados sugerem que a apomixia seja apenas um traço ligado ao fenômeno da poliploidização. Mostramos também que as populações mistas têm origem no contato secundário, onde hipotetizamos que os citótipos $2N = 48$ e $2N = 96$ apresentam origens geográficas distintas, sugerindo a ocorrência de pelo menos duas espécies crípticas distintas. O citótipo $2N = 72$ apresenta perfil genético intermediário e provável origem híbrida em relação aos demais citótipos. Adicionalmente, o citótipo intermediário também não depende da apomixia para se manter em alta frequência, reproduzindo-se sexuadamente e mediando o fluxo gênico entre os citótipos nas populações mistas. Levantamos aqui a necessidade de um estudo que inclua cruzamentos controlados entre citótipos considerando várias gerações, a fim de se investigar a fundo os impactos genéticos do fluxo gênico, da introgressão e motivo da ausência de citótipos maiores que $2N = 96$ nas populações mistas de *Z. mackayi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOLFSSON, S.; BENGTSSON, B. O. 2007. The spread of apomixis and its effect on resident genetic variation. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1933–1940.
- AFZELIUS, K. 1959. Apomixis and polyembryony in *Zygopetalum mackayi* Hook. Almqvist & Wiksell.
- AMORIN, A. M.; JARDIM, J. G.; LOPES, M. M. M.; FIASCHI, P.; BORGES, R. A. X.; PERDIZ, O. R.; THOMAS, W. W. 2012. Angiospermas em remanescentes de floresta montana no sul da Bahia, Brasil. *Biota Neotropica* 9(3): 313-348.
- BALAO, F.; CASIMIRO-SORIGUER, R.; TALAVERA, M.; HERRERA, J. & TALAVERA, S. 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variation. *Oxford Journals, Annals of Botany* 104: 965.
- BAYER, R. J. 1990. Patterns of Clonal Diversity in the *Antennaria rosea* (Asteraceae) Polyploid Agamic Complex. *American Journal of Botany* 77(10): 1313-1319.
- BILLOTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M. & BAURENS, F. C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, M.; DAVIS, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
- BRACACCIA, G.; ARZENTON, F.; SHARBEL, T. F.; VAROTTO, S.; PARRINI, P.; LUCCHIN, M. 2006. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L. *Heredity* 96: 322-334.
- BRETAGNOLLE, B. F.; THOMPSON, J. D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129 (1): 1-22.
- BRUVO, R.; MICHIELS, N. K.; D'SOUZA, T.G.; SCHULENBURG, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* 13: 2101–2106.
- BORBA, E. L.; FELIX, J. M.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J.; 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (ORCHIDACEAE) species have high genetic variability: Evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88(3): 419–428.

- CAMPACCI, T. V. S.; CASTANHO, C. T.; OLIVEIRA, R. L. F.; SUZUKI, R. M.; CATHARINO, E. L. M.; KOEHLER, S. 2017. Effects of pollen origin on apomixis in *Zygopetalum mackayi* orchids. *Flora* 226: 96-103.
- CARMAN, J. G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94.
- CAMPBELL, C. S.; DICKINSON, T. A. 1990. Apomixis, Patterns of Morphological Variation, and Species Concepts in subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 15(1): 124-135.
- CLARK, L. V.; JASIENIUK, M. 2011. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11: 562–566.
- DIAS, A. C. C.; SERRA, A. C.; SAMPAIO, D. S.; BORBA, E. L.; OLIVEIRA, P. E. 2017. Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the apomictic Neotropical tree *Miconia albicans*. *Plant Biology*. 10.1111/plb.12654
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233–2244.
- DUCHOSLAV, M.; SAFAROVA, L.; KRAHULEC, F. 2010. Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the Czech Republic. *Annals of Botany*, 105: 719–735.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini PE, Heyer WR (eds) *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências 39–69
- HÖRANDL, E.; TEMSCH, E. M. 2009. Introgression of apomixis into sexual species is inhibited by mentor effects and ploidy barriers in the *Ranunculus auricomus* complex. *Annals of Botany* 104: 81–89.
- HORANDL, E.; PAUN, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials and ecology. *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. Liechtenstein: RGV Regnum Vegetabile 147: 169-194.

- HUSBAND, C. B. 2004 The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 537–546.
- HUSBAND , B. C.; SABARA, H. A. 2004. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fi reweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703-713 .
- HUSBAND, C. B; SARAH, J.; BALDWIN, J. S.; SUDA, J. 2013. The Incidence of Polyploidy in Natural Plant Populations: Major Patterns and Evolutionary Processes. *Plant Genome Diversity* 2: 255-276.
- JOMBART, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* 11(1): 94.
- JONES, G. H.; KHAZANEHDARI, K. A.; FORD-LLOYD, B. V. 1996. Meiosis in the leek (*Allium porrum L.*) revisited. 11. Metaphase I observations. *Heredity* 76: 186-19.
- KAMVAR, Z. N.; BROOKS, J. C.; GRÜNWARD, N. J. 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetic* 6: 208.
- KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. G.; CROISER, W. W.; PRODOHIL, P. A. 2013. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in ecology and evolution* 4: 782-788.
- KIHARA, H.; ONO, T. 1926. Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 4(3): 475-481.
- KÖHLER, C.; SCHEID, O. M.; ERILOVA, A. 2010. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in genetic* 26 (3): 142-148.
- KOLÁR, F.; STECH, M.; TRAVNICEK, P.; RAUCHOVA, J.; URFUS T.; VÍT, P.; KUBESOVA, M.; SUDA, J. 2009. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. *Annals of Botany* 103: 963–974.
- KOLÁR, F.; CERTNER, M.; SUDA, J.; SCHONWESTTER, P.; HUSBAND, B. C. 2017. Mixed-Ploidy Species: Progress and Opportunities in Polyploid Research. *Trends in Plants Science* 22(11): 1041-1055.

KOLÁR, F.; FÉR, T.; STECH, M.; TRÁVNÍČEK, P.; DUSKOVÁ, E.; SCHÖNSWETTER, P.; SUDA, J. 2012. Bringing together evolution on serpentine and polyploidy: spatiotemporal history of the diploid-tetraploid complex of *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). PLoS One 7:e39988.

KRAHULCOVÁ, A.; ROTREKLOVÁ, O.; KRAHULEC, F.; ROSENBAUMOVÁ, R.; PLAČKOVÁ, I. 2009. Enriching ploidy level diversity: the role of apomictic and sexual biotypes of *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae) that coexist in polyploid populations. Folia Geobotanica, 44(3): 281-306.

LAPORT, R. G.; HATEM, L.; MINCKLEY, L. R.; RAMSEY, J. 2013. Ecological niche modeling implicates climatic adaptation, competitive exclusion, and niche conservatism among *Larrea tridentata* cytotypes in North American deserts. Journal of the Torrey Botanical Society 140: 349–363.

LAPORT, G. R.; JULIENNE, N. G. 2017 Out of one, many: The biodiversity considerations of polyploidy. American Journal of Botany 104 (8): 1119–1121

LELES, B.; CHAVES, A. V.; RUSSO, P.; BATISTA, J. A. N.; LOVATO, M. B. 2015. Genetic structure is associated with phenotypic divergence in floral traits and reproductive investment in a high-altitude orchid from the Iron Quadrangle, southeastern Brazil. PLoS One 10, e0120645

LEVIN, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plant populations. Taxon 24:35-43.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. 2008. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. Science 320: 481-483.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. Annals of Botany 100:875-888.

LOUSADA, J. M.; LOVATO, M. B.; BORBA, E. L. 2013. High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. Brazilian Journal of Botany 36(1): 45-53.

MAHERALI, H.; WALDEN, A. E.; HUSBAND, B. C. 2009. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. New Phytologist 184: 721–731.

- MANDÁKOVÁ, T.; KOVAŘÍK, A.; ZOZOMOVÁ-LIHOVÁ, J.; SHIMIZU-INATSUGI, R.; SHIMIZU, K.; MUMMENHOFF, K.; MARHOLD, K.; LYSAK, M. A. 2013. The more the merrier: recent hybridization and polyploidy in *Cardamine*. *The Plant Cell* 25(9): 3280-3295.
- MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421–423.
- MAYR, E. 1992. A local flora and the biological species concept. *American Journal of Botany* 79: 222–238.
- MRÁZ, P.; ŠPANIEL, S.; KELLER, A.; BOWMANN, G.; FARKAS, A.; ŠINGLIAROVÁ, B.; ROHR, R. P.; BROENNIMANN, O.; MÜLLER-SCHÄRER, H. 2012. Anthropogenic disturbance as a driver of microspatial and microhabitat segregation of cytotypes of *Centaurea stoebe* and cytotype interactions in secondary contact zones. *Annals of Botany* 110: 615–627.
- MUNTZING A. 1936. The evolutionary significance of autopolyploidy. *Hereditas* 21:263–378.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590.
- NUNES, C. E. P.; WOLOWSKI, M.; PANSARIN, E. R.; GERLACH, G.; AXIMOFF, I.; VERECKEN, J. N.; SALVADOR, M. J.; SAZIMA, M. 2017. More than euglossines: the diverse pollinators and floral scents of Zygopetalinae orchids. *Science of Nature* 104(11-12): 92.
- OTTO, S. P.; WHITTON, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34:401–437.
- PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New phytologist*, 186 (1), 5-17.
- PELLICER, J.; LEITCH, I. J. 2014. The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*: 279-307.
- Petit , C.; Bretagnolle, F.; Felber, F. 1999 . Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology & Evolution* 14 : 306 - 311.
- POWERS, L. 1945. Fertilization without reduction in Guayule (*Parthenium argentatum gray*) and a apomixis and polyploidy. *Genetics* 30:323

- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Review of Ecology, Evolution and Systematics* 29: 467-501.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. 2002 . Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 33: 589-639.
- RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L.; SMIDT, E. C.; LAMBERT, S. M.; SCHNADELBACH, A. S.; VAN DEN BERG, C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematic and Evolution* 270(1-2): 109-137.
- Sabara, H. A.; Kron, P.; Husband, B. C. 2013. Cytotype coexistence leads to triploid hybrid production in a diploid–tetraploid contact zone of *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* 100: 962–970 .
- SHANNON, C. E. 2001. A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* 5: 3-55.
- SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D.; BARBOSA, N. P. U.; BUISSON, E.; CARMO, F. F.; CARSTENSEN, D. W.; CONÇEIÇÃO, A. A.; CORNELISSEN, T. G.; ECHTERNATCH, L.; FERNANDES, G. W.; GARCIA, Q. S.; GUERRA, J. T.; JACOBI, C. M.; LEMOS-FILHO, J. P.; STRADIC, S.; MORELLATO, L. P. C.; NEVES, F. S.; OLIVEIRA, R. S.; SCHAEFER, C. E.; VIANA, P. L.; LAMBERS, H.; 2015. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil* 403 (1-2): 129-152.
- SIMPSON, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*: 163:688.
- SOLTIS, D. E. and SOLTIS, P. S. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree* (14): 348-352.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; BENNETT, D. M.; LEITCH, I. J. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany* 90(11): 1596–1603.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; SCHEMSKE, D. W.; HANCOCK, J. F.; THOMPSON, J. N.; HUSBAND, B. C.; JUDD, W. S. 2007 . Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: 3–30 .
- SOLTIS, D. E. ; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. 2004 . Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161 : 173–191 .

- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; VISGER, C. J.; 2014 The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany* 101(7): 1057 – 1078.
- STEBBINS, G. L. 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University. Press, New York.
- STEBBINS, G. L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London, UK.
- STUESSY, F.T.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; KEIL, J. D. 2004. Diploid and poliploid cytotype distribution in *Melapodium cinereum* and *M. leucanthum* (ASTERACEAE, HELIANTHEAE), *American Journal of Botany* 91(6): 889–898.
- SUESSENGUTH, K. 1923. Über die Pseudogamie bei *Zygopetalum mackayi* Hook. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 41: 16-23.
- TRÁVNÍČEK, B.; KUBATOVA, B.; CURN, V.; RAUCHOVÁ, J.; KRANJKOVÁ, E.; JERSAKOVÁ, J.; SUDA, J. 2011. Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. *Annals of Botany* 107:77–87.
- WAGNER, W. J. R. 1970. Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon* 19:146-151.
- WEISS, H. C.; DOBE, Š.; SCHNEEWEISS, G. M.; GREIMLER, J. 2002. Occurrence of tetraploid and hexaploid cytotypes between and within populations in *Dianthus* sect. *P lumaria* (Caryophyllaceae). *New Phytologist* 156: 85-94.
- ZHAO, S.; GUO, Y.; SHENG, Q.; SHYR, Y. 2014. Heatmap3: an improved heatmap package with more powerful and convenient features. *BMC Bioinformatics* 10(15): 16.
- ZOZOMOVÁ-LIHOVÁ, J.; MALÁNOVÁ-KRÁSNÁ, I.; VÍT, P.; URFUS, T.; SENKO, D.; SVITOK, M.; KEMPA, M. M.; MARHOLD, K. 2015. Cytotype distribution patterns, ecological differentiation, and genetic structure in a diploid-tetraploid contact zone of *Cardamine amara*. *American Journal Botany* 102: 1380-1395.
- ZOZOMOVA-LIHOVÁ J.; KRAK, K.; MANDAKOVÁ, T.; SHIMIZU, K. K.; PAINEL, S. Š.; VIT, P.; LYSAK, M. A. 2014. Multiple hybridization events in *Cardamine* (Brassicaceae) during the last 150 years: Revisiting a textbook example of neopolyploidy. *Annals of Botany* 113 : 817-830.

ANEXOS

Anexo 1. Informações para todos os iniciadores desenhados para amplificação de regiões microssatélites na primeira etapa de bibliotecas construídas a partir dos indivíduos ZM25 e ZM150 da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook.

Biblioteca	Código	Sequência	Motivo	Produto(pb)
ZM25	ZD1	GGTGTGTGTGCCCATATTTT CTCTTTCCCACGCACACTTA	(AG)9	109
ZM25	ZD2	GAGGAAGGCATCTGTAGTCC TTTCAATGGCCTGGCTGAT	(CA)5	103
ZM25	ZD3	TCTGTGTCTGTGTCTGTGTC CTCACTCACTCACTCACACG	(TG)9	104
ZM25	ZD4	AGCATGTTTGTGTGAGTGAG AACACATTGACACACGCATT	(GT)11	88
ZM25	ZD5	TCACATCAACACACACAAAC GAGTGTATGTGAGAGTGAGGA	(AC)9	81
ZM25	ZD6	CGTTTTTGTGAGTGTGTGTA CAAACACTCACAAATGCTCT	(TG)8	108
ZM25	ZD7	TTGTGCGCGTGTCTATGTT ACAGACACGTACAAACACAT	(TG)8	73
ZM25	ZD8	TGTGTGCGTGTGTATGTCTA CAACACACACACATGCACA	(GT)8	110
ZM25	ZD9	GCGCGTGTGTTTTATGTGT CACACACAAAGGCATACAAA	(TG)16	100
ZM25	ZD10	GCTTCAATCTGTGCATGACT ACTCACACGCACGACATAG	(TG)6	105
ZM25	ZD11	CCACCATCACACCTAATCCA GTTGTGATAATGGTGTGGTGG	(CA)15	132
ZM25	ZD12	GCGCGTGTGTTTTATGTGT CACACACAAAGGCATACAAA	(GT)17	105
ZM25	ZD13	CGTTTTTGTGAGTGTGTGTA CAAACACTCACAAATGCTCT	(TG)8	108
ZM25	ZD14	ACTGAAGTAGAAGGAACCGG	(CT)5	153

Biblioteca	Código	Sequência	Motivo	Produto(pb)
		GGCTCGAGATGATTTGAGGA		
ZM25	ZD15	TGTCTATGTGTGCGTGTT ACCACTCACTCAATCAAGCT	(TG)10	101
ZM25	ZD16	TGCTTAAGTCTCACCAACCT AGAGACCTTAGCACTTTCCC	(GT)7	102
ZM25	ZD17	TGTGTGTTTAGTGTGTGTTTT GAGTGTTAAATTTACCGTTATGGG	(TG)12	116
ZM150	ZTC1	GTGTGATTGTGAGATAGAGGGA CACACACACACATATAGATGCA	(GA)9(GT)10	125
ZM150	ZT2	TACGCACACACACAAACATG GAGTGTGTATGTGAATGCTTGT	(AC)10	105
ZM150	ZT3	ACACACACTTCCACATGA GCATTGGTTATGTGAGTGTGA	(AC)12	100
ZM150	ZT4	ACACTCTCATTCACTCACACA TGTGTGTGGACATGAGTGAA	(AC)8	100
ZM150	ZT5	TATATGTGTGCCCGATGTGT ACATATGCACACACAACACA	(GT)7	103
ZM150	ZT6	ACACACACTCACAAACAC GTGTGTGTATGTTGGTGT	(CA)5	80
ZM150	ZT7	GTGTGTTTGTGTGAGTTAGTGA CACACTCTCTCACACACATA	(GT)5	81
ZM150	ZT8	ATGTGTGTCTGTGAGTGTGA ACTCACTCATGCACAACACTCA	(GT)8	108
ZM150	ZT9	CAACACACACCAACCACAC TGGTGTGTGTATTGGTGGG	(AC)26	180
ZM150	ZTT10	ACCACCACCAATAACAACAA ATGTATGTAGTGGTGGTGGT	(CAC)8	111
ZM150	ZT11	TGAATGCTTGTGTGTGTGTA TCACACACACAGCCACATA	(GT)10	141
ZM150	ZT13	GTTTGCATGAGGGTGTGTTT ACTCGTTCACACTCACTCTC	(TG)7	76
ZM150	ZT14	AGAGAGAGTGCATGTCTGTG	(TG)9	83

Biblioteca	Código	Sequência	Motivo	Produto(pb)
		CACGTACTACTAACATCACACA		
ZM150	ZT15	CACACATACTCATTTCACACACT GTGTTCCCTTGTGAGTGTATGT	(AC)8	108
ZM150	ZTC17	TGATTGTGAGATAGAGGGAGAT CACACACACATATAGATGCA	(GA)9(GT)10	120
ZM150	ZT18	GTGCATGTCTGTGTATGTGC CACACAAAGATACACGTACT	(TG)9	83
ZM150	ZT19	TGTGGGTGTTTCAGAGTGC CACACACTCAAACACGCACT	(TG)10	100
ZM150	ZT20	CACACAAAGATACACGTACT GTGAGAGTGAGAGAGAGTGC	(AC)9	106

Anexo 2. Informações para os iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados na primeira etapa de bibliotecas construídas a partir dos indivíduos ZM25 e ZM150 para a espécie *Zygotetulum mackayi* Hook. As sequências senso apresentam a cauda M13 indicada em vermelho.

Código	F	R
ZD1	CACGACGTTGTAAAACGACGGTGTGTGTG CCCATATTTT	CTCTTTCCACGCACACTTA
ZD5	CACGACGTTGTAAAACGACTCACATCAAC ACACACAAAC	GAGTGTATGTGAGAGTGAGG A
ZD6	CACGACGTTGTAAAACGACCGTTTTTGTG AGTGTGTGTA	CAAACACTCACAAATGCTCT
ZD8	CACGACGTTGTAAAACGACTGTGTGCGTG TGTATGTCTA	CAACACACACACATGCACA
ZD9	CACGACGTTGTAAAACGACGCGCGTGTGT TTTATGTGT	CACACACAAAGGCATACAAA
ZD11	CACGACGTTGTAAAACGACCCACCATCAC ACCTAATCCA	GTTGTGATAATGGTGTGGTG G
ZD12	CACGACGTTGTAAAACGACGCGCGTGTGT TTTATGTGT	CACACACAAAGGCATACAAA
ZT9	CACGACGTTGTAAAACGACCAACACACAC CAACCACAC	TGGTGTGTGTATTGGTGGG
ZTT1 0	CACGACGTTGTAAAACGACACCACCACCA ATAACAACAA	ATGTATGTAGTGGTGGTGGT

ZT19 **CACGACGTTGTAAAACGACTGTGGGTGTT** CACACACTCAAACACGCACT
 TCAGAGTGC

Anexo 3. Informações para os iniciadores para amplificação de regiões microsatélites desenhados na segunda etapa de bibliotecas construídas para a espécie *Zygopetalum mackayi* Hook., a partir de um indivíduo de cada população considerada neste estudo.

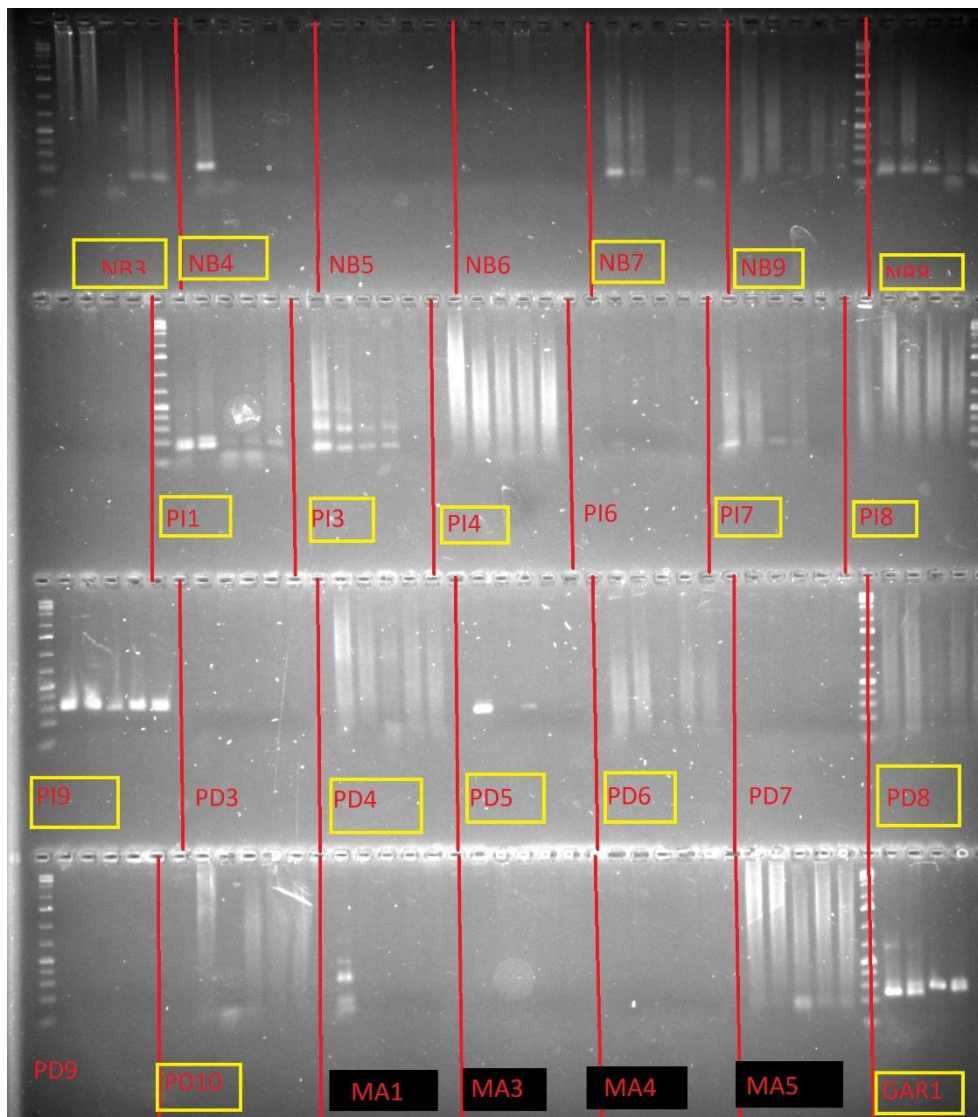
Biblioteca	Código	Motivo	Sequência (F;R)	Produto (pb)
NB(ZM398)	NB1	(GT)7	CGCGCTTACAATGCAATTAG CTGACTTTTCCCGAGCCTTA	238
NB(ZM398)	NB2	(GA)23	TCCCTCCATATTCCCTCTCC GCCAAAAAGTTTCCAAAAAGTG	260
NB(ZM398)	NB3	(TG)6	GAGTGAGAGTGCGTGCAT CACACACACAAAACACATAGAT	123
NB(ZM398)	NB4	(TG)6(GT)7	TTTGATTGTGTGTCATTTGTG CTCCATCTCTCACACACCTCA	195
NB(ZM398)	NB5	(TG)8(GA)9	TCTTGCTTACGCGTGGACTA CACTCTCACACCCACAAAGAAA	102
NB(ZM398)	NB6	(GT)13	CGCATGCGTGAATTAGTCTG TCTTGCTTACGCGTGGACTA	132
NB(ZM398)	NB7	(TG)5(GT)7(AG)7(TG)5	TGTGGTTGTATGTGTATGTCCT CACACACTGGTAAACACACACT	142
NB(ZM398)	NB8	(TG)10.. (GA)10	CTGCATGTATGTTTGTGCATGT CACACACACATTCACTCCCTCT	133
NB(ZM398)	NB9	(TG)12(GT)5	TGTAGGTTTGGATTTGTGTA ACATCCTCACTCACTCACAC	111
NB(ZM398)	NB10	(AC)8(AG)18	AATCCTTCCCAAGGAGCAAT TCTTGCTTACGCGTGGACTA	251
PI(Pi-14)	PI1	(GT)5...(AG)14(GT)5	GCGTCTATGCAGCTGTGTGT GGCACATGCACACTCTATTCC	151
PI(Pi-14)	PI2	(GT)8(GT)6	TGATGTATGTGAGACCATTTGTG TCACTCACTCACATAAACATGCTC	221
PI(Pi-14)	PI3	(TG)7...(TG)6	TTGAGTGAGAGTGTGAGCGAAT CGCATAACACAGAACACATTG	157
PI(Pi-14)	PI4	(TG)10	GTGAGAGCTTTTTGCGTGTG CACTCATTCACTCACGCTCAC	125
PI(Pi-14)	PI5	(CA)8	AAGACGCACAGACACCCATA GTGCGTGTGTGTGAGTGA	117
PI(Pi-14)	PI6	(TG)10-TT-(AG)25	ATCGCAAACCCATGAAAAG	136

Biblioteca	Código	Motivo	Sequência (F;R)	Produto (pb)
			GTTGAGTTTGAAGGACTTCTATTT	
			G	
			TGTGTAAGTTGTGTATGTAAGAGT	
PI(Pi-14)	PI7	TG(10)-TT-(AG)25	T	133
			CATGTATGCACACACACTCAT	
PI(Pi-14)	PI8	(TG)6(GA)5...(TG) 10	CTGAGTGTGTTTGCGCATTT CCCCCTTACACACACACACA	148
PI(Pi-14)	PI9	(TC)15	CGCATGTCAAGTGATGGTTT CCCACCACATGAGATCAGC	294
PD 22	PD1	(CA)6(AC)5	ACACCCATGCACTGACACAT TGTGAGTTTGTGCGTAGTGTG	130
PD 22	PD2	(TG)22	CCCGATTCTGTGTAGTGTTT CTAACAAGGCCATCAGAAGA	151
PD 22	PD3	(TG)14	ACGGATTATGCCTGAAAATCCA CTCTTGCTTACGCGTGGACT	212
PD 22	PD4	(AC)8	CCACACACCCACACACTCAA AGTGTCAATGTGTTGTGTATGCA	129
PD 22	PD5	(AC)7	ACCTTGGGCATGAGACTAGC ACAGCAACATTCTCTAGCACC	274
PD 22	PD6	(AC)20	TTTCATTCGGCACCCACACA TGTGCGTGTATATGTTTGTGTGA	109
PD 22	PD7	(CA)6	AGGTATGATTGATAACAACCAAG TTTTTAGAGCTTAGCTGACTT	155
PD 22	PD8	(AC)9	GACACAAAACTCACACGAA GTGTGGGTTTATGTGAGTGT	151
PD 22	PD9	(CA)11(AC)5	CTCAAGAACACACAAAATAGGC TTACGCGTGGACTAGAT	160
PD 22	PD10	(AC)7	AAAGACATACACACAAACGC ACGTGTGTTGTTTGTGTTTG	154
ZM106- MAR	MA1	(CA)6	CTAGACTCACCACGCATGCA ACATTTGCCCTATCTGCCCC	228
ZM106- MAR	MA2	(TG)6(TATG)5	TATGTGTGCTTCTAGTGCTC ACTCAAATGACAGACACACT	146
ZM106- MAR	MA3	(AT)5(GT)16	TGAAGCAGACGTTTCCAGAAAC ACACATATACACACAAGCACAG	170
ZM106- MAR	MA4	(TG)12	GTAGTGGGATTAAGGCTTGT ATCACCTGGGTGGAATTTTT	260
ZM106- MAR	MA5	(AC)14	CCACACATACTCACTCACTC GAGAGTGCATGTCTGTGTAT	133

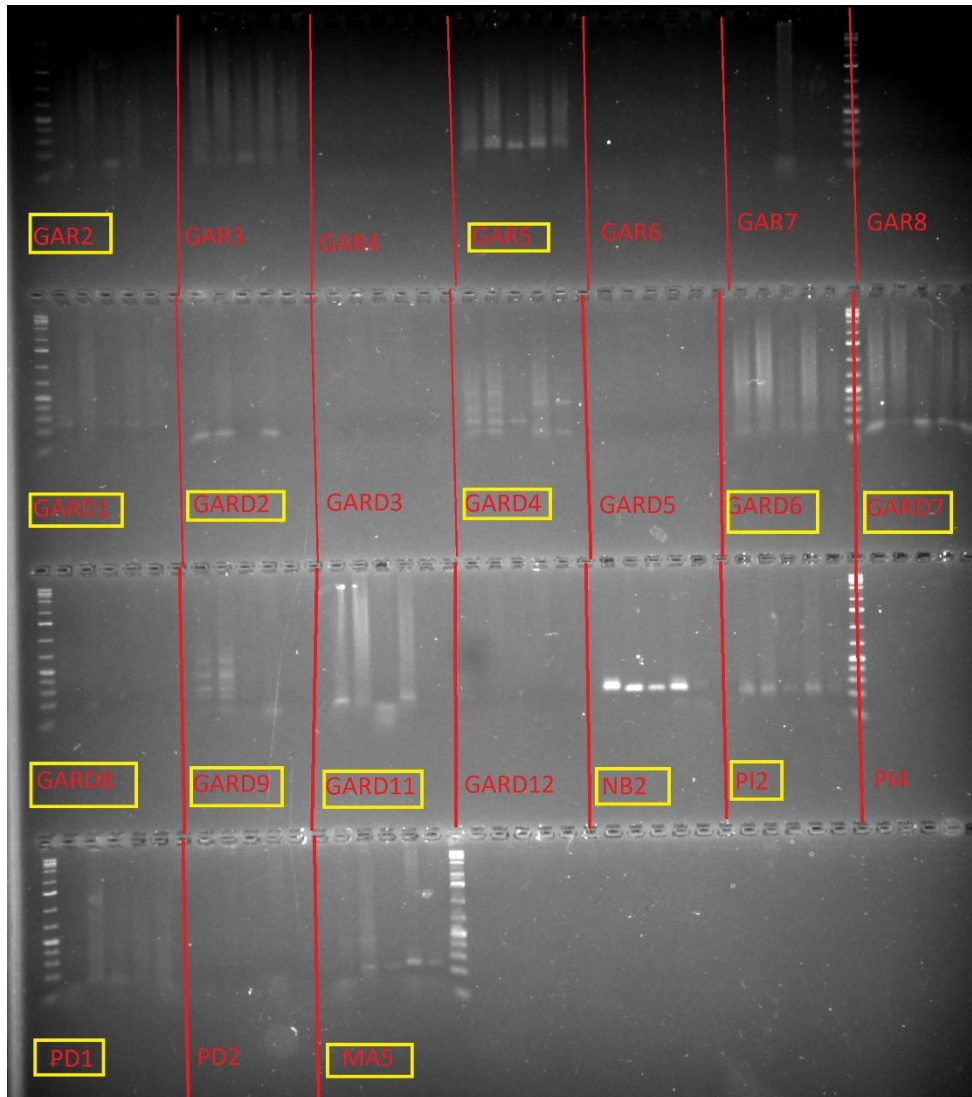
Biblioteca	Código	Motivo	Sequência (F;R)	Produto (pb)
ZM106-MAR	MA6	(ACC)4	GATGAAGAGGAGGAGAAACC CATTCCTCACTAAGGGCTAC	258
ZM150-GAR	GAR1	(TG)15	ACGCGCCTAGAAAATCCTAA ACCCGAAAGATCCTAGTAGG	270
ZM150-GAR	GAR2	(AC)5	GCACACACATGGACATACAA GCATGTTTTTGGGTGAGTGT	112
ZM150-GAR	GAR3	(GT)24	CATGCATGAGTGTGTGTGTA CAGGCACTCACAAACACAAA	142
ZM150-GAR	GAR4	(CA)12	GAGGATTTAATACCTACATCCT AAAAATCCAAAACCTTCACCC	214
ZM150-GAR	GAR5	(GC)9(CA)7	ACCCACACAAACCTACTCAC GGGTGTGTGTGTCTGTCAAT	216
ZM150-GAR	GAR6	(TG)6	AGTGTTTTGTGAGTGGAT TCACAAACTTATACACAACAC	111
ZM150-GAR	GAR7	(AT)10(TG)8	CAAAAAGGTGAGCTGCGTTA TCTTTGGGTTCTATCCTCGC	152
ZM150-GAR	GAR8	(AC)9	GCTTAGGCTCTATAAGAAAATTG ACTAACAACACAACAACAGA	306
ZM150-GAR	GAR9	(CT)5(CA)6	GAGACAAATCTACACACGCG TGTGTGTGTGTGTCTCTCTC	195
ZM25-GAR	GARD1	(GT)10	TGTGTGTGTGCATGCATTTT CATAGACAAACACTCGCACA	209
ZM25-GAR	GARD2	(GT)5	TTGAGTGTGTTTGTGTGAAC CACACAGCTCACTAACACAT	112
ZM25-GAR	GARD3	(TG)25(AG)(GT)8	TCATCCTATGTGATTTGGCAC GGAGAGAATGGTTTGTAGTTCT	190
ZM25-GAR	GARD4	(CA)8	ACCCCCTTGAAAATTTTGGC TGTTAAGTGGTGGGCTCAAT	129
ZM25-GAR	GARD5	(TG)8	TGTCCAATATGATTGAGATCA TCTCAGTTTTGATGATC	339
ZM25-GAR	GARD6	(AC)21	TACACGCACACAACACATAG TGTATGAGTGTATGTGTGGA	112
ZM25-GAR	GARD7	(CA)7...(CA)5	CTAACACACACGCACACTTG GCGTGTCAATGTGTTGTGTA	107
ZM25-GAR	GARD8	(AC)20	ATACACAGATGCACACAC AACAGTTTTAGCTCCATACA	261
ZM25-GAR	GARD9	(GT)5	TGTGTGTGTGTGTGTCTTCA TTTTTGGTTGATGCGCAGG	143
ZM25-GAR		(TA)6(AC)8	AATGGGTGCTTACGCTTTTT	219

Biblioteca	Código	Motivo	Sequência (F;R)	Produto (pb)
	GARD1 0		ACAGCTAACCCCTGCTCTTTT	
ZM25-GAR	GARD1 1	(TG)5	GTATTTTTGTGTGGGTGTC ACACATACCAACTACACAC	160
ZM25-GAR	GARD1 2	(TG)15	AATCTGATGCACATTAATAATTT CTAAGGCTTGTATCTCAGTT	305

Anexo 4. Gel de agarose 3% referente ao estudo piloto com os iniciadores desenvolvidos na segunda etapa para *Zygotetulum mackayi* (Parte 1). Iniciadores que obtiveram amplificação no tamanho esperado estão destacados com formas amarelas sobre os nomes



Anexo 5. Gel de agarose 3% referente ao estudo piloto com os iniciadores desenvolvidos na segunda etapa para *Zygopetalum mackayi* (Parte 2). Iniciadores que obtiveram amplificação no tamanho esperado estão destacados com formas amarelas sobre os nomes.



Anexo 6. Transferibilidade dos iniciadores desenvolvidos para *Zygopetalu mackayi*, na segunda etapa, entre os citótipos $2N = 48$, $2N = 72$ e $2N = 96$. (+) = Transferível, e (-) Intransferível.

Iniciador	Citótipos		
	$2N = 48$	$2N = 72$	$2N = 96$
NB2	+	+	+
NB8	+	+	+
PI1	+	+	+
PI3	+	+	+
PI9	+	+	+

MA6	+	+	+
GAR1	+	+	+
GARD2	+	+	+
NB3	+	+	+
NB4	+	-	-
NB7	+	-	-
NB9	+	+	+
PI4	+	+	+
PI7	+	+	+
PI8	+	+	+
PD4	+	+	+
PD5	+	-	-
PD6	+	+	+
PD9	+	+	+
PD10	+	-	-
MA5	+	+	+
GAR5	+	+	+
GARD1	+	+	+
GARD4	+	+	+
GARD9	+	+	+
GARD11	+	+	+

Anexo 7. Resultado da genotipagem de indivíduos da população NB-2x da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook. considerando os oito iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados conforme o Anexo 3.

Citótípo	Indivíduo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	NB1	228/228	258/258	268/294	256/256	116	135/137	155	165/169
2N = 48	NB2	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	151/153	165/169
2N = 48	NB3	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	137		165/169
2N = 48	NB4	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	149/151	
2N = 48	NB5	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	137/139	157/159
2N = 48	NB6	228/228	256/258	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	159/169
2N = 48	NB7	228/228	258/271	268/294	256/256	112/116	135/137	149	
2N = 48	NB8	228/228	258/271	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	159/169
2N = 48	NB9	228/260	258/271	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	
2N = 48	NB10	228/260	258/271	268/294	256/256	112/112	135/137		159/169
2N = 48	NB11	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	159/169
2N = 48	NB12	228/228	258/258	268/294	246/256	116	135	147/149	
2N = 48	NB13	228/240	258/258	268/294	246/256	112/116	135/137	147/149	157/159
2N = 48	NB14	228/260	258/258	268/294	256/256	116	137	147/149	157/159
2N = 48	NB15	228/228	258/258	268/294	246/256	112/112	137	147/149	159/162
2N = 48	NB16	228/228	258/258	268/294	246/256	116	137	147/149	

2N = 48	NB17	228/228	258/258	268/294	246/256	116	135/137	147/149	165/169
2N = 48	NB18	228/228	258/258	268/294	246/256	116	135/137	149/151	165/169
2N = 48	NB19	228/260	258/258	268/294	246/256	116	135/137	147/149	165/169
2N = 48	NB20	228/260	258/258	268/294	246/256	116	135/137		165/169
2N = 48	NB21	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	165/169
2N = 48	ZM394	228/260	258/258	268/294	246/256	112/116	135/137	151/153	165/169
2N = 48	NB22	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	147/151	
2N = 48	ZM395	228/260	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	153/157
2N = 48	NB25	228/260	258/258	268/294	256/256	116	135/137	147/149	153/157
2N = 48	NB26	228/228	258/258	268/294	246/256	112/116	137	145/147	153/157
2N = 48	NB27	228/260	258/258	268/294	Falhou	116	135/137	147/159	153/157
2N = 48	NB28		258/258	268/294	246/256	112/116	135/137	139/147	159
2N = 48	NB29	228/228	258/258	268/294	256/256	116	135/137	145/139	159
2N = 48	NB30		258/258	268/294	256/256	116	135/137	149	153/157
2N = 48	ZM397	228/228	258/258	268/294	256/256	112/116	135/137	147/149	153/157
2N = 48	ZM398	228/260	258/258	268/294	256/256	112/116	133/135	147/149	153/157

Anexo 8. Resultado da genotipagem de indivíduos da população GAR-4x da espécie *Zygotetulum mackayi* Hook. considerando os oito iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados conforme o Anexo 3.

Citótipo	Indivíduo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GAR D-2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	ZM25	240/290	271	250/294		102/108	139	147	161/165
2N = 96	ZM007		271				139	147/149	161/165
2N = 96	ZM107	100/240/250	271	300/312	250/270	102/108	135/137/139	147	161/165
2N = 96	ZM119	240/250/260	271	312		102/108	135/137/139	147/149	161/165
2N = 96	ZM130	100/240/250/290	271	294/300	240/250/270	102/108	137	147/149/151	161
2N = 96	ZM131	240/250	261	300	270/280	102/108	133/135/139	147/149/151	161
2N = 96	ZM132	240/250	261	294/300		102/108	133/135/139	149	161
2N = 96	ZM133	240/250/280	261	Falhou	270/280	102/108	137/139	147/151/153	161

2N = 96	ZM134	240/250/260	261	284/3 00/33 0		102/1 08	135/137/13 9	147/149/15 1/153	161
2N = 96	ZM136	240/250/260/290	271	284/3 00/33 0	270/280	102/1 08	137	147	
2N = 96	ZM137	Falhou	265	294/3 00	260/270	102/1 08		147	161/165 /167
2N = 96	ZM138	2540/250/260	271	300	260/270	102/1 08	133/135/13 7/139	147/149/15 1/153	161
2N = 96	ZM139	240/250	271	300/3 12	260/270	102/1 08	133/135/13 9	147/149/15 1/153	161
2N = 96	ZM140	250	271	284/2 94		102/1 08	137		161
2N = 96	ZM144	250	271	284/2 94		102/1 08	137		161
2N = 96	ZM146	240/250	271	294/3 00	270/280	102/1 08	133/135/13 7/139	147/149/15 1	157/161 /165
2N = 96	ZM148	240/250	271	294/3 00	270	108/1 08	133/135/13 7/139	147	157/161 /165
2N = 96	ZM145	240/250/260	271	294/3 00	276	108/1 08	133/135/13 7/139	147	157/161 /165
2N = 96	ZM150	100/240/260	271	294/3 00	270/280/290	108/1 08	133/135/13 7/139	147	157/161 /165

Anexo 9. Resultado da genotipagem de indivíduos da população PI-M da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook. considerando os oito iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados conforme o Anexo 3.

Citótipo	Indivíduo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD-2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	ZM346	246	261		245/255	112/116	137/1 39	147/149	169
2N = 48	ZM347	240/246	261/2 71	294	250/260	112/116	141	147	169
2N = 96	ZM348	240/246	261	290/300	250/260/270 /280	112/116	137/1 39	147	161/165/ 169
2N = 96	ZM349		261	290/300		112/116	137/1 39	147/149	

Citóti- po	Indiví- duo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD-2	NB8	PI1	PI3
2N = 72	ZM350	246	250/2 70	290/300		112/116	135/1 39	147/149/ 151	159/163
2N = 48	ZM351	242	261	300	250/260	112/116		147	
2N = 48	ZM352	246	261	300	250/260	112/116	135/1 39	149	159
2N = 48	ZM353	246	261	290/300	250/260	112/116	135/1 37	147	159
2N = 48	ZM354	246	261	280/310	250/260	112/116		149	159
2N = 96	ZM355	246	261	300	250/260/270 /280	112/116	133/1 35	151	159/165
2N = 48	ZM356	240/246	261	290/300	250/270	112/116	131/1 35	151/153	
2N = 48	ZM357	240/246	261	280/290	250/260	112/116	131/1 35	151/153	157/159
2N = 48	ZM358	240/246	261	292/300	250/260	112/116	131/1 35	149/155	159
2N = 48	ZM359	246/260	261		250/260	112/116	133	147/149	
2N = 48	ZM360	246/260	261	290/310	250/260	112/116	133/1 37	147	157/159
2N = 48	ZM361	270	261	290	250	112/116		147/151	157/159
2N = 48	ZM362	240/270	261	292/310	260	112/116	135/1 37	147/149	157/159
2N = 48	ZM363	falhou	261	296/300	250/260	112/116	131/1 33	147/149	157/159
2N = 48	ZM364	240/246	261	300	250/260	112/116	133/1 37	147/149	157/159
2N = 48	ZM365	240/280	261	296/310	250/260	112/116	135	147/149	157/159
2N = 48	ZM366	240/270	261	300/320	250/260	112/116	135	151/153	157/159
2N = 48	ZM367	falhou	261	290/310	260	112/116	135	151/155	157/159
2N = 48	ZM368	falhou	261/2 71	290	250/260	100/116	135	147/149	157/159

Citóti- po	Indiví- duo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD-2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	ZM369	240/246	261	280/290	250/260	112/116	135/1 37	147/149	157
2N = 96	ZM370	falhou	261	280/290	270/280	112/116	135/1 37	147/149	157/159
2N = 48	ZM371	246/250	261	290/300	250	112/116	135/1 37	153/155	157/159
2N = 48	ZM372	240/246	261		250/260	112/116	135/1 37	153/155	157/159
2N = 96	ZM373	240/246/ 250	261	290/300/ 310		102/112/ 116	135/1 37	147/151	157/159
2N = 48	ZM374	240/246	261/2 71			112/116	135/1 37	149/153	157/159
2N = 48	ZM375	240/246	261			100/112/ 116	135/1 37	147/149	157
2N = 96	Pi-14	240/246/ 260	261/2 7	320		112/116	135/1 37	155	157/159
2N = 48	Pi-15	240/246	261/2 71	290/310		100/116	135/1 37	149	157

Anexo 10. Resultado da genotipagem de indivíduos da população MAR-4x da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook. considerando os oito iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados conforme o Anexo 3.

Citóti- po	Indiví- duo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD- 2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	ZM25	246	261	300/310	250/266	112/120	135/139	147/149	159/163
2N = 96	ZM31	240/246 /248	261	300/310	250/266/2 80	112/116	135/137 /139	147/149	159
2N = 96	ZM46	240/246	261/281	290/300	250/260/2 70/280	112/116 /120	135/137 /139	147/149/1	157/159 /163
2N = 96	ZM47	240	261	300/310	250/266	112/116	135/137 /139	147	157/159 /163
2N = 96	ZM48	240/246 /250	261/281	300/310	290	112/116 /120	137	147/149	157/159 /163
2N = 96	ZM83		260/280	300/310	250/266/2 80	112/116 /120	135/137 /139	147/149/1	157/159 /163

2N = 96	ZM85	240	261	300/310	260/270/2 80/290	112/116	135/137 /139	149	159
2N = 96	ZM91	246/248 /250	261/281	290/300	280/290	112/116	135/137 /139	147/149	159/163
2N = 96	ZM92	240/246	261	290/300	260/270	112/116	135/137 /139	147/149	157/159
2N = 96	ZM93	240/246	261	300/310	256/260/2 70/280	112/116	135/137 /139	147/149/1 53	157/159 /163
2N = 96	ZM94	240	261	300/310	260/270	112/116	135/137 /139	147/149	157/159 /163
2N = 96	ZM98	240	261	300/310	270/280/2 90	112/116	135/137 /139	147/149/1 51/190	159
2N = 96	ZM10 0	240/250	261	290/300	256/270/2 80/300	112/116	135/137 /139	147/149/1 51/190	159/161
2N = 96	ZM10 2	240	261/271/2 81	300/310	280/290	112/116	135/137 /139	147/149/1 51	159/161
2N = 96	ZM10 3	240/246	261/271/2 81	300	280/290	112/116	135/137 /139	147/149	159/161
2N = 96	ZM10 5	240/246	261/271/2 81	290/300	250/260/2 80/290	112/116	135/137 /150	147/149	159/161
2N = 96	ZM10 6	240/250	260/270	290/300	270/280/2 90	112/116	135/137 /139	147/149	159/161
2N = 96	ZM10 7	240	261	290/300 /310	260/270/2 80/290	102/112 /116	135/137 /139	147/149	159/161
2N = 96	ZM10 8	240	261/271/2 81	290/300 /310	270/280/2 90	112/116	135/137 /139	147/149	159
2N = 96	ZM11 2	240	261/271/2 81/291	290/300	276/280/2 96	112/116	135/137 /139	147/149	159

Anexo 11. Resultado da genotipagem de indivíduos da população PD-2x da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook. considerando os oito iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados conforme o Anexo 3.

Citóti- po	Indiví- duo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD- 2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	PD1	256/28 0	271	300	256	112/116	139	145/147	149/15 5
2N = 48	PD2	240/25 2	271/28 1	300	250/25 6	112/116	137	151/153	149/15 5

Citóti- po	Indiví- duo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD- 2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	PD3	240/25 2	271/28 1	290/30 0		112/116	135/137	147/149	149/15 5
2N = 48	PD4	252/26 0	271/28 1	290/30 0	256	112/116	137	143/153	149/15 5
2N = 48	PD5	240/25 2	271	290/30 0		112/116	135/137	147/149	149/15 5
2N = 48	PD6	250/25 6	271	290/30 0	256	112/116		153/155	155
2N = 48	PD7	240/25 0	271/28 1	290 290	254	112/116	121/135/13 7	147/149	149/15 5
2N = 48	PD8	250/25 6	271/28 1	290/30 0	252/29 6	112/116		149/151	155
2N = 48	PD9	240/25 6	271/28 1	300	256	112/116	133/135/13 7	147/149	149/15 5
2N = 48	PD10							149	155
2N = 48	PD11	240/25 6	271	290/30 0	256	112/116	133/135	149/151	
2N = 48	PD12	256	271	290/30 0		112/116		151/153	149/15 5
2N = 48	PD13	230/25 6	265	290/30 0	256	112/116		151/153	155
2N = 48	PD14						133/135	149	155
2N = 48	PD15	230/30 0	271		248/25 6	112/116		149	155
2N = 48	PD16	230/24 0	271	290/30 6	256	112/116		149/159	155
2N = 48	PD17	230/24 0	271	300/31 0	248/25 6	112/116	135	147/149	149/15 5
2N = 48	PD18	230/34 0	271	290/31 0	248/25 6	112/116	135	149/151	155
2N = 48	PD19				248/25 6	112/116	135/137	149/151	149/15 5
2N = 48	PD20	230/24 0	271	290/31 0	248/25 6	116	135/137	147/149/15 1	149/15 5
2N = 48	PD21	240/25 6		300		116		147/149	149
2N = 48	PD22	230/24 0	271/28 1	290		112/116	135/137	147/149	149

Citótipo	Indivíduo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD-2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	PD23	230/240	271	290/300	256	112/116	137	147/149	149
2N = 48	PD24	240/256	271	300	256	116		147/149	149
2N = 48	PD25	230/240	271	290	256/270	112/116	135	151/153	149
2N = 48	PD26	230/256	271/29	290/310	256/270	112/116	135/131	149/151	155
2N = 48	PD27	240	265/271	290	256	112/116	135/141	149/151	149/155
2N = 48	PD28	230/240		310	256/270	112/116	135/141	149	155
2N = 48	PD29	230/240	271	290/310	256	112/116	135/137	149/151	155
2N = 48	PD30	240	271	290/310	256/270	112/116		149	155

Anexo 12. Resultado da genotipagem de indivíduos da população ANG-M da espécie *Zygopetalum mackayi* Hook. considerando os oito iniciadores para amplificação de regiões microssatélites selecionados conforme o Anexo 3.

Citótipo	Indivíduo	NB2	MA6	PI9	GAR1	GARD-2	NB8	PI1	PI3
2N = 48	ANG1	230/240	275	300//320	248/270	112/116	135	147/149	129/155
2N = 96	ANG2	230/240/248/256	275	290	248/270	112/116	135	147/149/169	129/149/155
2N = 72	ANG3	240	281	290/300/310	248/268	112/116	135/137	149/159	149
2N = 72	ANG4	240	271	300	248/268	112/116	135	147/159	129/149/155
2N = 72	ANG5	240	271	290	248/268	112/116	135		155
2N = 72	ANG6		271/281	292/300	248/268	112/116	135/137	157	155
2N = 72	ANG7	230/240/250	271	290/300/310	248/268	112/116	135/137	149/155/157	129/155

2N = 96	ANG8	240	271/281	290/300	248/268	112/11 6	135/1 37	155/157	155
2N = 48	ANG9	240/276	271	290	248/268	112/11 6	135	155/157	149
2N = 72	ANG10	240	271/281	292/300/ 310	248/268	112/11 6	135/1 37	147/151	149/155
2N = 72	ANG11	240/260/276	271/281/ 291	300	248/268	112/11 6	135/1 37	147/151	149
2N = 72	ANG12		271/281/ 291	290	248/268	112/11 6	135/1 37	147/149	149
2N = 48	ANG13	230/248	271/291	290	248/268	112/11 6	135/1 37		155
2N = 72	ANG14	240	271/281/ 291	290	248/268	116	135/1 37		149
2N = 72	ANG15	240/276	271		248/268	112/11 6	135/1 37	149/155/ 157	155
2N = 72	ANG16		265	290/292	248	112/11 6	135/1 37	147/149	149/155
2N = 72	ANG17	230/240/276	271	290/292	248/268	116	135/1 37	147/149/ 159	149
2N = 72	ANG18	230/240	271	290/292	230/248/ 268	116	135/1 37	147/151/ 159	149/155
2N = 72	ANG19	230/240/276	275	290/292	248/270	112/11 6	135/1 37	147/151/ 159	149
2N = 72	ANG20	240/260/276	271/281	290/300/ 320		112/11 6	135/1 37	147/151/ 159	149/155
2N = 72	ANG21	230/240	271	290	248/270	112/11 6	135/1 37	147/151/ 159	149/155
2N = 72	ANG22	230/240	271	290/300	248/272	112/11 6	135/1 37	147/151/ 159	149
2N = 96	ANG23	230/240/276	271	290/300	248	112/11 6	135/1 37	147	149

Anexo 13. Documento referente a Bioética e Biossegurança referentes ao experimento desenvolvido nesta dissertação.




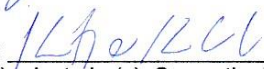
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Orquídeas apomíticas facultativas Zygotetulum mackayi preferem reprodução sexuada em zona de contato entre citótipos*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Yohans Alves de Moura

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Samantha Koehler

Data: 28/03/2018

Anexo 14. Declaração referente a não infringência de direitos autorais nesta dissertação.

Declaração


As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Orquídeas apomíticas facultativas *Zygopetlum mackayi* preferem reprodução sexuada em zona de contato entre citótipos**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28/03/2018

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Yohans Alves de Moura**

RG n.º 48709354-9

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Samantha Koehler**

RG n.º 103893475