

MILENA CRISTINA MORAES

**ESTUDO BIOTECNOLÓGICO, CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS ENDÊMICAS DA FLORA BRASILEIRA**

ASSIS

2014

MILENA CRISTINA MORAES

**ESTUDO BIOTECNOLÓGICO, CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS ENDÊMICAS DA FLORA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras de Assis – UNESP –
Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do título de Mestre em Biociências
(Área de Conhecimento: Caracterização e
Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Dr. Darío Abel Palmieri

ASSIS
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M827e Moraes, Milena Cristina
Estudo biotecnológico, citogenético e molecular em espécies
de orquídeas endêmicas da flora brasileira / Milena Cristina
Moraes. Assis, 2014.
67 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de
Assis – Universidade Estadual Paulista.

Orientador: Prof. Dr. Dário Abel Palmieri

1. Cattleya. 2. Cultivo in vitro. 3. Número cromossômico.
4. ISSR. I. Título.

CDD 584.15

MILENA CRISTINA MORAES

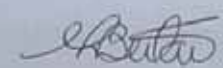
ESTUDO BIOTECNOLÓGICO, CITOGENÉTICO E
MOLECULAR EM ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS
ENDÊMICAS DA FLORA BRASILEIRA

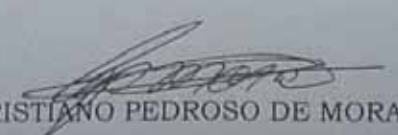
Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências e Letras - UNESP para a
obtenção do título de Mestra em
Biociências (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da
Diversidade Biológica)

Data da Aprovação: 25/07/2014

COMISSÃO EXAMINADORA


Presidente: PROF. DR. DARIO ABEL PALMIERI - UNESP/Assis


Membros: PROFA. DRA. MONICA ROSA BERTÃO - UNESP/Assis


PROF. DR. CRISTIANO PEDROSO DE MORAES - UNIARARAS/Araras

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, por iluminar meu caminho durante esta jornada.

Ao meu orientador Dr. Darío Abel Palmieri, por compartilhar seu conhecimento e confiar no meu trabalho.

À Dra. Mônica Rosa Bertão, pela parceria científica, dedicação em estar sempre por perto, compartilhar todo seu conhecimento e por me aguentar por tanto tempo.

Aos meus colegas de laboratório, Priscila e Anderson, pelas conversas, fofocas, desesperos e por estarem ao meu lado para ajudar em todas as etapas da realização deste trabalho.

Aos estagiários Fernanda e Diego, por toda ajuda possível.

Aos funcionários Eliana, Allan e Gilberto, sempre dispostos a nos atender.

Aos orquidófilos Celso Andreos, Sandra Takebayashi e Maria do Rosário de Almeida Braga, pela sabedoria e pelos materiais gentilmente cedidos.

À Delfina de Araujo, por me permitir utilizar as preciosas informações disponíveis em seu website.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa concedida.

Aos meus pais Jorge e Márcia e ao meu futuro marido Juliano, que mantiveram a calma na minha correria, me deram força nos momentos de cansaço e entenderam a importância deste trabalho para mim.

A todos que participaram e estiveram presente, muitíssimo obrigada!

MORAES, Milena Cristina. **Estudo Biotecnológico, Citogenético e Molecular em Espécies de Orquídeas Endêmicas da Flora Brasileira**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

RESUMO

O cultivo comercial de orquídeas é significativo no mundo. Alguns gêneros e espécies nativas do Brasil, como *Cattleya*, são apreciados e têm elevado valor econômico devido à capacidade de recombinação genética, beleza, forma, tamanho e durabilidade de suas flores. Contudo, muitas dessas espécies e gêneros encontram-se em risco de extinção, o que as torna objeto para diversos estudos. Técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro* (germinação assimbiótica de sementes e micropropagação) são valiosos instrumentos na obtenção de mudas. Devido à polinização na natureza ser limitada e com baixa probabilidade de germinação, o cultivo *in vitro* utiliza formulações de meios de cultivo adequados à germinação de sementes e ao crescimento de diferentes espécies, resultando em maiores percentuais de germinação, em comparação com condições naturais. Neste trabalho foi comparada a atuação de diferentes meios de cultivo na germinação e desenvolvimento de *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*. Contudo, os resultados obtidos são preliminares e a procura por um meio de cultivo específico para cada espécie, visando crescimento rápido e em quantidade, necessita de continuidade para somente então afirmar com propriedade qual dos protocolos ensaiados é mais adequado a cada espécie. Existem conflitos taxonômicos envolvendo *C. guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*. Muitos taxonomistas consideram *C. tigrina* e também *C.*

leopoldii como sinônimos de *C. guttata*. O conhecimento relativo à citogenética da família Orchidaceae tem contribuído expressivamente para o entendimento das relações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos em diferentes gêneros. Entre as Cattleias, estudos cariológicos identificaram indivíduos com 40 até 100 cromossomos, sendo que $n = 20$ é o número básico mais frequente. Para diagnosticar o número cromossômico das espécies *C. guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina* foi empregado o método de Feulgen em raízes pré-tratadas com 8-hidroxoquinolina. Todavia, os estudos citogenéticos obtidos não foram suficientemente adequados para afirmar que as três espécies estudadas são semelhantes ou distintas entre si. Diversas pesquisas têm utilizado diferentes ferramentas para elucidar relações filogenéticas entre as mais diferentes espécies vegetais, a fim de complementar o entendimento da taxonomia. No presente trabalho, marcadores ISSR foram usados para determinar as relações filogenéticas entre *C. guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*. A análise do padrão total de bandas demonstra que *C. guttata* e *C. leopoldii* são espécies relacionadas do ponto de vista molecular e mais distantes de *C. tigrina*.

Palavras-chaves: *Cattleya*, cultivo *in vitro*, número cromossômico, ISSR.

MORAES, Milena Cristina. **Biotechnological, Cytogenetic and Molecular Study on Endemic Orchid Species from the Brazilian Flora**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

ABSTRACT

The commercial orchids cultivate is significant in the world. Some genera and species native to Brazil, as the *Cattleya*, are appreciated and have high economic value because of the genetic recombination ability, beauty, shape, size and durability of its flowers. However, many of these species and genera are at risk of extinction, making them subject to several studies. Biotechnological techniques of in vitro (asymbiotic seed germination and micropropagation) are valuable tools for seedlings obtainment. Due to pollination in nature be limited and with low germination probability, in vitro cultivation uses suitable formulations of media culture for germination and growth of different species, resulting in higher germination rates compared to natural conditions. In this work we compared the performance of different culture media on germination and development of *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* and *C. tigrina*. However the results are preliminary and the search for a specific medium culture for each species, aiming rapid growth in quantity, need continuity to say properly which of the tested protocols is the most suitable to each species. There are taxonomic conflicts involving *C. guttata*, *C. tigrina* and *C. leopoldii*. Many taxonomists consider *C. tigrina* and also *C. leopoldii* as synonyms of *C. guttata*. The knowledge concerning the cytogenetics of the Orchidaceae family has contributed significantly to the understanding of the phylogenetic relationships at all taxonomic levels in different

genus. Among *Cattleya*, karyological studies have identified subjects with 40 to 100 chromosomes, where $n = 20$ is the most frequent basic number. To diagnose the chromosome number of *C. guttata*, *C. leopoldii* and *C. tigrina* was employed Feulgen method in 8-hydroxyquinoline pre-treated roots. However, cytogenetic studies obtained were not proper enough to say that the three studied species are similar or different from one another. Several studies have used distinct tools to elucidate phylogenetic relationships among many different plant species, to supplement the taxonomy understanding. In the present study, ISSR markers were used to determine the phylogenetic relationships among *C. guttata*, *C. tigrina* and *C. leopoldii*. The analysis of total banding pattern shows that *C. guttata* and *C. leopoldii* are related species of the molecular point of view and more distant from *C. tigrina*.

Keywords: *Cattleya*, *in vitro* culture, chromosome number, ISSR.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Mercado Brasileiro de Flores	12
Orquídeas de interesse ornamental.....	16
Ferramentas Citogenéticas e Moleculares	21
REFERÊNCIAS	24
Capítulo 1. Molecular Study on Endemic Orchid Species from Brazilian Flora	29
1.1 Resumo	29
1.2 Introdução.....	31
1.3 Material e Métodos.....	32
1.4 Resultados.....	34
1.5 Discussão	35
1.6 Agradecimentos	36
1.7 Referências	37
Tabela 1. Cidade de origem, código e quantidade de plantas adquiridas das espécies <i>Cattleya guttata</i> , <i>C. leopoldii</i> e <i>C. tigrina</i>	39
Tabela 2. Temperatura de anelamento otimizada e taxa de polimorfismo dos iniciadores utilizados para <i>Cattleya guttata</i> , <i>C. leopoldii</i> e <i>C. tigrina</i>	40
Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os acessos de <i>C. guttata</i>	41
Figura 2. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os acessos de <i>C. leopoldii</i>	42
Figura 3. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os acessos de <i>C. tigrina</i>	43
Figura 4. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para todos os acessos de <i>C. guttata</i> , <i>C. leopoldii</i> e <i>C. tigrina</i>	44

Capítulo 2. Aplicação de ferramentas citogenéticas em orquídeas endêmicas brasileiras	45
2.1 Resumo	45
2.2 Introdução	47
2.3 Material e Métodos	48
2.4 Resultados e Discussão	49
2.5 Conclusões	50
2.6 Agradecimentos	50
2.7 Referências	50
Figura 1. Complementos mitóticos de <i>C. guttata</i> (A e B), <i>C. leopoldii</i> (C e D) e <i>C. tigrina</i> (E e F). Barra = 1 µm.	53
Capítulo 3. Comparação da germinação de sementes de espécies do gênero <i>Cattleya</i> submetidas a diferentes meios de cultivo	54
3.1 Resumo	54
3.2 Introdução	56
3.3 Material e Métodos	57
3.4 Resultados e Discussão	59
3.5 Conclusões	62
3.6 Agradecimentos	62
3.7 Referências	62
Figura 1. Desenvolvimento das espécies <i>C. guttata</i> aos 120 dias (A – T0; B – T1; C – T2; D – T3; E – T4; F – T5), <i>C. leopoldii</i> aos 210 dias (G – T0; H – T1; I – T2; J – T3; K – T4; L – T5) e <i>C. tigrina</i> aos 90 dias (M – T0; N – T1; O – T2; P – T3; Q – T4; R – T5).	66
CONCLUSÃO	67

INTRODUÇÃO

Mercado Brasileiro de Flores

O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais vem acompanhando a tendência mundial de expansão, apresentando um crescimento de 15% nos últimos 10 anos. Segundo levantamento realizado pela IBRAFLORE (2011), as principais razões para esse crescimento foram: a) maior leque de oferta de opções e variedades ao consumidor; b) aumento da durabilidade floral; c) maior eficiência na cadeia de produção e comercialização; d) aumento do consumo pelas diferentes classes sociais; e) vantagem competitiva frente a produtos concorrentes tradicionais (CDs, chocolates e perfumes).

Com uma área cultivada de aproximadamente 13.800 hectares e cerca de 8.000 produtores, o Brasil produz mais de 350 espécies vegetais diferentes, principalmente, plantas de vaso e flores de corte, as quais são comercializadas em cerca de 60 centrais de atacado e em mais de 22.000 pontos de venda no varejo (IBRAFLORE, 2013). A região Sudeste é a maior produtora, seguida das regiões Sul e Nordeste. O Estado de São Paulo detém mais de 70% da produção, sendo também o principal consumidor (com mais de 50%).

O fato de apresentar características como diversidade de climas e solos, disponibilidade de água, de terras, de mão de obra, entre outros recursos, faz com que o nosso país apresente excelentes condições para se especializar e crescer neste mercado. No Brasil, a floricultura tem investido cada vez mais em tecnologia de produção em ambiente protegido, a fim de garantir maior qualidade na produção e atender a demanda do mercado, devido ao elevado nível de exigência do

consumidor e ao alto valor econômico agregado aos produtos deste segmento em relação aos demais produtos agrícolas.

Para entrar no mercado mundial de flores, o Brasil enfrenta produtores tradicionais e poderosos. O principal país exportador de flores é a Holanda, seguido pela Colômbia. Outros países que se destacam são Equador, Peru, Itália, Costa Rica, Chile, México, Dinamarca, Israel, Quênia, África do Sul e Austrália. As exportações brasileiras somaram pouco mais de US\$ 20,6 milhões em 2011 (IBRAFLOR, 2011).

Entre as principais demandas do setor produtivo para aumento da competitividade é possível destacar as seguintes: aumento e diversificação dos investimentos em pesquisa; aumento da durabilidade floral (novas variedades, técnicas de pós-colheita e cadeia de frio); aumento da qualidade e padronização pela certificação visando atingir níveis internacionais.

O cultivo comercial de orquídeas é significativo no mundo. No Brasil, grande número de espécies nativas e de elevado valor econômico pertencem ao gênero *Cattleya* que, com base nos estudos de van den Berg et al. (2000, 2009), atualmente engloba todas as espécies de *Sophranitis* Lindley e as espécies brasileiras anteriormente pertencentes a *Laelia* Lindley.

As Catléias são apreciadas tanto no mercado nacional quanto no internacional, evidenciando a potencialidade dessa rica biodiversidade (FRÁGUAS et al., 1999). Entretanto, muitas dessas espécies e gêneros encontram-se em risco de extinção (vulneráveis, em perigo e criticamente em perigo) (MARTINELLI; MORAES, 2013), o que as torna objeto ainda mais valioso para diversos estudos, não somente de conservação de germoplasma, mas também de desenvolvimento de estratégias sustentáveis de produção, manejo e multiplicação.

Dentro deste contexto encaixam-se as técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*, com especial atenção à germinação assimbiótica de sementes e regeneração *in vitro*, que representa um valioso instrumento na obtenção e multiplicação rápida de mudas de orquídeas, haja vista que o processo de multiplicação convencional da grande maioria das espécies é muito lento sendo, portanto, inviável do ponto de vista comercial.

Segundo Zanenga-Godoy e Costa (2003) e Pedroso-de-Moraes (2009), o cultivo de orquídeas, em especial do gênero *Cattleya*, representa uma atividade de grande importância econômica no agronegócio florícola mundial, devido à grande capacidade de recombinação genética, bem como à beleza, forma, tamanho e durabilidade de suas flores. Em geral, a propagação natural das orquídeas é realizada por meio de sementes, as quais são pequenas, desprovidas de endosperma e dependente de associações micorrízicas para germinar. Para diversas espécies propagadas naturalmente se verificam taxas de germinação muito reduzidas (IUCN/SSC, 1996), o que juntamente com a destruição de habitats pode inviabilizar sua perpetuação e até mesmo tornar tais espécies raras e, conseqüentemente, ameaçadas de extinção.

Considerando tal panorama, técnicas de cultivo *in vitro* (mais especificamente a germinação assimbiótica de sementes e a cultivo de meristemas) têm sido utilizadas para sobrepujar tais problemas possibilitando inclusive a expansão comercial de diversas espécies de orquídeas.

Assim, o maior problema observado no processo de germinação assimbiótica de sementes e na regeneração *in vitro* de diversas espécies de orquídeas está relacionado ao tempo necessário para a obtenção e produção de mudas a partir de

plantas selecionadas e a utilização de meios de cultivo adequados para cada espécie, em virtude do lento crescimento e desenvolvimento.

Entre os principais fatores que determinam o sucesso das metodologias de cultivo *in vitro* estão a fonte dos explantes e o meio nutritivo onde estes são cultivados. Considerando-se que o meio de cultivo é o fator determinante para o sucesso na propagação *in vitro* das orquídeas, diversas pesquisas têm demonstrado diferentes possibilidades para o estabelecimento de formulações dos meios de cultivo adequados à germinação de sementes e ao crescimento de diferentes espécies (STANCATO et al., 2008; YAM; ARDITTI, 2009; WATTANAWIKKIT et al., 2011, ZENG et al., 2012, HOSSAIN et al., 2013).

Em geral, tais pesquisas descrevem vários meios de cultivo para muitos gêneros e espécies diferentes, porém, existe uma unanimidade quanto ao fato de que a adição, o incremento, a redução ou mesmo a supressão de alguns componentes específicos do meio de cultivo podem promover melhor crescimento das plântulas.

Os meios de cultivo geralmente são compostos por uma fonte de carboidratos, macro e micronutrientes e outras substâncias como vitaminas, aminoácidos, agentes geleificantes, reguladores de crescimento, antibióticos, carvão ativado, componentes complexos como água de coco, polpa de banana e suco de tomate. Entre os componentes mais manipulados estão o carvão ativado, a água de coco, a polpa de banana, a sacarose, os reguladores de crescimento como a citocinina 6-benzilaminopurina e o ácido giberélico e outros compostos orgânicos, além dos fatores abióticos, principalmente, luminosidade.

Variações nas fontes de nutrientes essenciais e ativos devem ser conduzidas considerando o hábito ou genótipo do material a ser germinado e propagado. Ainda,

a falta de conhecimento e de informações em relação à nutrição de orquídeas leva os orquidicultores a empregarem meios de cultivo complexos, com diversos nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, elevando assim os custos de propagação (VENTURA, 2002).

Estudos recentes demonstraram que é possível estabelecer novas formulações e até diminuir os custos de produção de mudas de orquídeas em larga escala pela simplificação dos meios de cultivo existentes, principalmente, pelo emprego de fertilizantes como base de meios de cultivo (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009; SUZUKI et al., 2010; SOARES et al., 2011).

Dessa forma, a otimização do meio de cultivo a ser utilizado no processo de micropropagação é fundamental para a obtenção de mudas saudáveis, de alta qualidade fitossanitária e com baixo custo de produção *in vitro*.

Orquídeas de interesse ornamental

Dentre as mais diferentes e diversificadas espécies de orquídeas, duas em especial, têm chamado a atenção dos orquidófilos, colecionadores e produtores: *Cattleya guttata* Lindl. e *Cattleya tigrina* A. Rich. Tal interesse se baseia, não somente na beleza das suas flores, mas na divergência de formas, variedades e nomenclatura botânica, e no fato de tais espécies estarem classificadas como Vulneráveis no Livro Vermelho da Flora do Brasil, haja vista a pressão de coleta predatória nos principais locais de origem e distribuição, bem como a fragmentação de seu habitat e depauperação do mesmo por atividade antrópica (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Cattleya guttata é uma espécie epífita, litotrófica e arenícola, nativa e endêmica do Brasil, dispersa no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica e com

distribuição no Nordeste (Estado da Bahia), Centro-Oeste e Sudeste (Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (BARROS et al., 2014a).

Em geral esta espécie é cultivada em clima temperado ou quente e normalmente vegeta em pleno sol, necessitando de água em abundância durante o período de crescimento, reduzindo a rega durante o inverno. A ventilação é fundamental para o desenvolvimento das plantas. A haste caulinar de *C. guttata* pode atingir até 1 m de altura e a época da floração é normalmente o verão, podendo ocorrer no outono ou mesmo no inverno, dependendo do ambiente ou da origem da planta. Existem muitas variedades descritas para esta espécie, entre elas *C. guttata* var. *elator* (ou *Cattleya elator*), com pétalas amarelo-rosadas e *C. guttata* var. *leopardina*, com pétalas e sépalas amarelo-esverdeadas, intensamente pintalgadas, algumas com segmentos verde-esbranquiçados, marrons escuros ou vermelhos escuros. O labelo pode ser púrpuro, quase que inteiramente branco, esbranquiçado ou rosa (ARAUJO, 2000).

Achille Richard descreveu em 1848 o espécime de *Cattleya tigrina*, uma espécie nativa e endêmica do Brasil dispersa no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, com distribuição no Nordeste (Estados de Pernambuco e Bahia), Sudeste (Estado de São Paulo) e Sul (Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Esta espécie também compõe o grupo das catléias bifoliadas e apresenta como sinônimos relevantes *Cattleya leopoldii* f. *alba* (Fowlie) M.Wolff & O.Gruss, Orchid. Atlas: 63 (2007), *Cattleya leopoldii* var. *alba* Fowlie, Orchid Digest 28: 68 (1964), *Cattleya tigrina* var. *caerulea* L.C.Menezes, Schlechteriana 4: 153 (1993), *Epidendrum elegans* Vell., Fl. Flumin. 9: t. 12 (1831), *Cattleya leopoldii* var. *immaculata* (Rchb.f.) Fowlie, Braz. Bifol. Cattleyas: 100 (1977), *Cattleya leopoldii* f.

immaculate (Rchb.f.) M.Wolff & O.Gruss, Orchid. Atlas: 63 (2007), *Cattleya tigrina* var. *immaculata* (Rchb.f.) Braem, Cattleya Brazilian Bifoliate Cattleyas: 78 (1984), *Cattleya guttata* var. *leopardina* L.Linden & Rodigas, Lindenia 1: t. 19 (1885), *Cattleya leopoldii* var. *leopardina* (L.Linden & Rodigas), Fowlie, Orchid Digest 28: 69 (1964), *Cattleya tigrina* var. *leopardina* (L.Linden & Rodigas) Braem, Cattleya Brazilian Bifoliate Cattleyas: 78 (1984), *Cattleya guttata* var. *leopoldii* (Verschaff. Ex Lem.) Linden & Rchb.f., Pescatorea 1: t. 43 (1860), *Cattleya leopoldii* Verschaff. Ex Lem., Ill. Hort. 1(Misc.): 68 (1854), *Epidendrum elatius* var. *leopoldii* (Verschaff. ex Lem.) Rchb.f. Xenia Orchid. 2: 33 (1862), *Cattleya guttata* var. *purpurea* Cogn. Dict. Ic. Orch., Cattleya: t. 15 A (1900), *Cattleya tigrina* var. *purpurea* (Cogn.) Braem, Cattleya Brazilian Bifoliate Cattleyas: 79 (1984), *Cattleya sororia* Rchb.f. Orchid Album 2: t. 307 (1888), *Cattleya guttata* var. *williamsiana* Rchb.f., Gard. Chron. 22(2): 70 (1884), *Cattleya leopoldii* var. *williamsiana* (Rchb.f.) Fowlie, Orchid Digest 28: 70 (1964), *Cattleya tigrina* var. *williamsiana* (Rchb.f.) Braem, Cattleya Brazilian Bifoliate Cattleyas: 79 (1984), *Cattleya leopoldii* f. *caerulea* (L.C.Menezes) M.Wolff & O.Gruss, Orchid. Atlas: 63 (2007), *Cattleya guttata* subvar. *Immaculate* Rchb.f., Gard. Chron., n.s., 26: 326 (1886) (BARROS, et al., 2014b)

Nos trabalhos de AOS (1956) e Allikas (2010) *C. tigrina* foi descrita como uma planta robusta de 60 a 90 cm de altura ou mais, com inflorescência contendo 30 ou mais flores de sete a oito cm. As flores possuem forte odor adocicado parecido com goma de mascar. Dos pseudobulbos partem duas a três folhas, cuja inflorescência parte de espata ainda verde. Em estufas apresentam tamanho menor.

Algumas diferenças básicas podem ser listadas entre *C. guttata* e *C. tigrina*, entre as quais se destacam: (a) *C. guttata* entra em dormência após o bulbo crescer; floresce a partir de espata seca; o labelo é mais estreito e geralmente esverdeado

com pintas (Figura 4C); a haste contém de 5 a 10 flores; o florescimento ocorre após *C. tigrina*, especificamente no verão e outono, e as flores em geral são esverdeadas com pintas; (b) *C. tigrina* floresce logo após o bulbo crescer; floresce a partir de espata verde; o labelo é mais largo e geralmente marrom com pintas escuras (Figura 4A); a haste contém mais flores (10 ou mais); a época de florescimento é na primavera e verão e as flores são, em geral, marrons com pintas (ROCHA, 2008).

No Brasil, tanto a *C. tigrina* quanto a *C. guttata* ocorrem juntas pelo litoral, desde o Rio Grande do Sul (com maior concentração nessa área e em Santa Catarina) até o sul da Bahia. Há quem afirme tê-las visto vegetando tanto em restingas quanto na mesma árvore em matas. Existem registros de ocorrência de *C. tigrina* inclusive em Pernambuco.

Existe alguma confusão sobre os espécimes identificados como *Cattleya leopoldii*. Esta nomenclatura foi amplamente difundida entre os colecionadores de orquídeas, pois, o exemplar levado para a Europa pela empresa “Verschaffelt”, tido como uma variedade de *C. guttata* e posteriormente descrito em 1854 por Lemaire como *Cattleya leopoldii* em homenagem ao rei Leopoldo da Bélgica, teria sido descrito por Achille Richard em 1848 como *C. tigrina*.

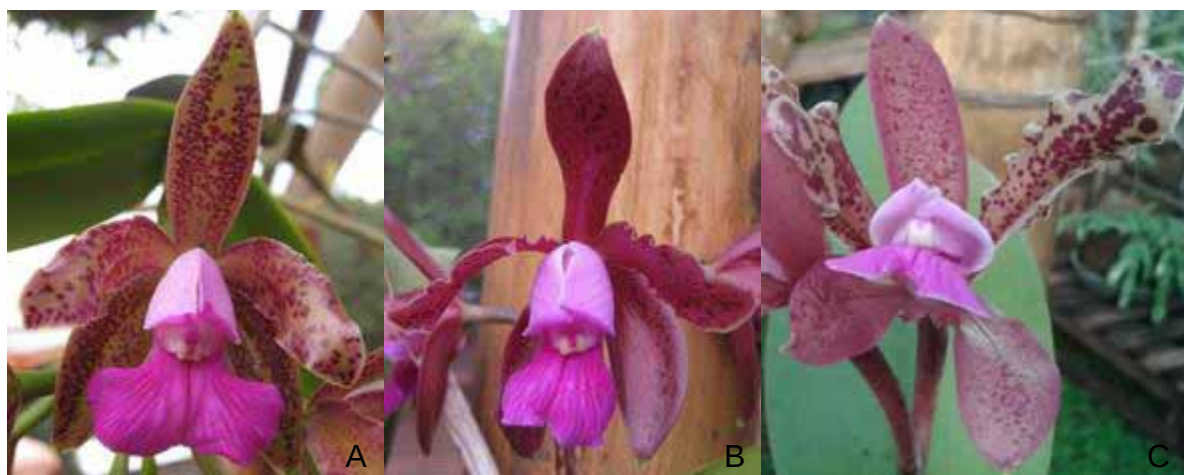
A descrição de A. Richard foi ignorada por quase 130 anos, apesar de ser indiscutivelmente a primeira a ser realizada, porque ela foi feita em francês sem o diagnóstico em latim, o que não invalida seu trabalho, pois a obrigatoriedade do uso de descrições em latim se deu a partir do ano de 1935 (BRAEM, 1984).

Ainda existem controvérsias em relação à nomenclatura, se a planta descrita por A. Richard em 1848 como *C. tigrina* seria, na verdade, uma variedade de *C. guttata*. Alguns pesquisadores consideram a *C. leopoldii* uma espécie muito próxima de *C. guttata* que foi, durante muito tempo, tida como sua variedade, sendo, porém

diferente de *C. tigrina*. Assim, muitos são os orquidicultores que continuam utilizando o sinônimo *leopoldii*, não trocam suas etiquetas e são radicais quanto a essa posição (ROCHA, 2008).

Ferry (2011) discute que os membros da Kew Royal Botanic Garden e muitos orquidófilos no mundo todo aceitam *C. tigrina* como epíteto em substituição ao nome *C. leopoldii*, porém há quem prefira continuar usando o termo *C. leopoldii*.

A espécie *C. guttata* estaria intimamente relacionada com *C. leopoldii*, porém, podendo ser distinguida por suas flores menores, com um labelo estreito e pequeno. Plantas denominadas de *C. leopoldii* também apresentariam, normalmente, metade do tamanho das plantas de *C. guttata* e produziriam poucas flores.



Flores de (A) *Cattleya tigrina*, (B) *Cattleya leopoldii*, (C) *Cattleya guttata*.

Atualmente, *C. leopoldii* é descrita como apresentando um colorido muito variável. As sépalas e pétalas são cerosas e pintalgadas de púrpura escuro ou marrom-avermelhado. Podem ser verdes ou variar do amarelo-esverdeado passando por diversas tonalidades até chegar ao verde-oliva. Os lóbulos laterais do labelo podem ser esbranquiçados e encobrem a coluna. O lóbulo mediano é ametista-purpúreo (Figura 4B). O número de flores por haste normalmente varia de 5 a 10, ou até mais flores, podendo florir com 20 ou até mesmo 30 flores perfumadas

que emergem da espata já seca. O tamanho da flor varia de 5 a 8 cm de diâmetro, porém pode ser bem maior (PFAHL, 2013).

Muitos taxonomistas consideram *C. tigrina* e também a *C. leopoldii* como sinônimos de *C. guttata*, a qual seria apenas uma forma de maior interesse horticultural cuja permanência como espécie autônoma é perpetuada mais por hábito dos colecionadores do que por diferenças de comprovação científica.

Ferramentas Citogenéticas e Moleculares

O conhecimento relativo à citogenética da família Orchidaceae é extremamente complexo e está longe de ser completo. A maioria dos estudos cromossômicos existentes tem sido feita em espécies de áreas temperadas, enquanto a contagem de cromossomos em espécies tropicais e subtropicais é relativamente limitada (DEMATTEIS, 1999).

A família apresenta extensa variação nos números cromossômicos, o que é um fato intrigante, visto que a maioria dos gêneros de orquídeas tem altos níveis de ploidia e números básicos variáveis. No caso da subtribo Laeliinae, na qual se encontra o gênero *Cattleya*, o número cromossômico é $2n = 40$ (TANAKA; KAMEMOTO, 1984). É importante que os orquidófilos e orquidicultores tenham conhecimento do exato número cromossômico das orquídeas, pois segundo Carnier (1996) é necessário que os cruzamentos ocorram entre plantas com número e morfologia dos cromossomos compatíveis para permitir a produção de sementes viáveis.

Para as três espécies selecionadas neste estudo não há informações sobre a determinação do número cromossômico ou do padrão cariotípico, o que justifica o emprego de ferramentas citogenéticas como estratégias valiosas que podem contribuir para esclarecer a relação entre as espécies.

Quanto à aplicação de metodologias moleculares, diversas pesquisas têm lançado mão destas ferramentas visando elucidar relações filogenéticas entre as mais diferentes espécies vegetais. Tais metodologias são importantes para seleção, identificação de genótipos e estudo da organização e evolução dos genomas das plantas (DETTORI et al., 2001). Marcadores moleculares têm sido utilizados na caracterização genética de populações naturais de plantas e animais, por permitirem a obtenção de um grande número de informações com um esforço relativamente pequeno (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; WEISING et al., 2005).

O advento da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) acelerou o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares. A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990), baseada na amplificação de segmentos anônimos de DNA genômico, por meio de iniciadores arbitrários, tornou-se muito popular, principalmente, pela acessibilidade tecnológica e baixo custo. Entretanto, dada a sua característica dominante (não permite diferenciar indivíduos heterozigotos) e a baixa repetibilidade relatada por diversos autores, desta técnica tem sido questionada, principalmente, em estudos de genética de populações (WEISING et al., 2005).

Os marcadores dominantes ISSR (Internal Simple Sequence Repeat) foram desenvolvidos por Gupta et al. (1994) e por Zietkiewicz et al. (1994) e, da mesma forma que os RAPD, são baseados na técnica de PCR. Os produtos da reação de PCR gerados pelos marcadores ISSR correspondem a sequências de tamanhos diferentes que se localizam entre regiões repetidas de microssatélites, idênticas e orientadas em direções opostas. Na reação é utilizado um único primer que contém de 16 a 25 bases e é composto de dinucleotídeos ou trinucleotídeos que ancoram na extremidade 5' ou 3' da fita molde.

Marcadores ISSR são de fácil utilização e contornam a problemática do conhecimento prévio das sequências que flanqueiam os microssatélites, gerando assim, alto grau de polimorfismo com o uso de pequenas quantidades de DNA por reação. A utilização de marcadores ISSR em estudos sobre eventos de hibridização e diversidade genética em populações naturais vem crescendo nos últimos anos, sendo possível observar um aumento considerável de estudos que utilizam os marcadores ISSR como ferramenta para a delimitação de espécies de plantas (DOGAN et al., 2007; WOODS; NAKAZATO, 2009; ANAND et al., 2010).

Considerando-se a crescente preocupação com a preservação de espécies de orquídeas de grande potencial econômico, o presente trabalho avaliou diferentes protocolos de germinação e desenvolvimento utilizando meios de cultura alternativos para *Cattleya guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*, inferindo que é possível simplificar os processos de germinação e desenvolvimento destas espécies de orquídeas utilizando meio de cultura a base de fertilizante comercial, a fim de tornar o processo menos custoso.

Outra perspectiva foi a avaliação citogenética e molecular de modo a investigar a hipótese de que *C. tigrina* e *C. leopoldii* são a mesma espécie e diferentes de *C. guttata*, e assim, contribuir para elucidar as relações filogenéticas entre estas espécies.

Com base no exposto essa dissertação foi dividida nos seguintes capítulos:

Capítulo 1. Molecular Study on Endemic Orchid Species from Brazilian Flora.

Capítulo 2. Aplicação de ferramentas citogenéticas em orquídeas endêmicas brasileiras.

Capítulo 3. Comparação da germinação de sementes de espécies do gênero *Cattleya* submetidas a diferentes meios de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ALLIKAS, G. **Collector Item – *Cattleya tigrina* A. Rich**, 2010. Disponível em: <<http://www.aos.org/Default.aspx?id-161>> Acesso em: 11 mar. 2014
- ANAND, K. K.; SRIVASTAVA, R. K.; CHAUDHARY, L. B.; SINGH, A. K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. **Taiwania**, v. 55, p. 197-207, 2010.
- AOS, American Orchid Society. **The bifoliat *Cattleyas* beginners handbook – XVIII**. Disponível em: <<http://www.aos.org/Default.aspx?id-447>> Acesso em: 11 mar. 2014.
- ARAUJO, S. **Brazilian Orchids**, 2000. Disponível em: <<http://www.delfinadearaujo.com>>. Acesso em: 11 mar. 2014.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. **Orchidaceae in lista de espécies da flora do Brasil, 2014a**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11336>>. Acesso em: 11 mar 2014.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. **Orchidaceae in lista de espécies da flora do Brasil, 2014b**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11345>>. Acesso em: 11 mar 2014.
- BRAEM, G. J. ***Cattleya*. Die bifoliaten Cattleyen Brasiliens**. Brucke-verlag, Kurt Schmerson, Hildensheim, Germany, 1984, 94 p.
- CARNIER, A. Variação no número de cromossomos nas orquídeas. **Jornal da ABRACC: Associação Brasileira de Cultivadores de Catasetíneas**, ano 2, n. 6, 1996.

- DEMATTEIS, M.; DAVIÑA, J. R. Chromosome studies on some orchids from south America. **Selbyana**, v. 20, p. 235-238, 1999.
- DETTORI, M. R.; QUARTA, R.; VERDE, I. G. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. **Genome**, v. 44, p. 783-790, 2001.
- DOGAN, B.; DURAN, A.; HAKKI, E. E. Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from turkey bases on ISSR amplification. **Annales Botanici Fennici**, v. 44, p. 353-358, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-Cenargen, 1998, 220 p.
- FERRY, R. J.: A few Brazilian bifoliate cattleyas, **The McAllen International Orchid Society Journal**, v. 12, p. 2-14, 2011.
- FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, V. A.; PASQUAL, M. **Propagação in vitro de espécies ornamentais**. Lavras: Editora UFLA, (Boletim técnico) 1999.
- GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SERVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.
- HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; SILVA, J. A. T. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, p. 69-139, 2013.
- IBRAFLOR, Instituto brasileiro de floricultura, 2011. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com>> Acesso em 14 nov. 2011.

IBRAFLOR, Instituto brasileiro de floricultura. **Ibraflor – Release Imprensa, 2013.**

Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/ww.php?cod=213>> Acesso em: 14 mar. 2014.

IUCN/SSC Orchid Specialist Group. **Orchids – Status Survey and Conservation Action Plan.** IUCN: Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1996, 161 p.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Orgs.) **Livro vermelho da flora do Brasil.** Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1ª ed, Rio de Janeiro, 2013, 1100 p.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; SANTOS, N. S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; LEAL, T. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência**, Campo Grande, v. 8, p. 57-65, 2009.

PFAHL, J. **Internet orchid species photo encyclopedia**, 2014. Disponível em: <<http://www.orchidspecies.com>>. Acesso em: 11 mar. 2014.

ROCHA, R. **ABC do orquidófilo de uma, várias ou muitas orquídeas.** Ed. Ceres Ltda. 2008, 424 p.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; CARVALHO, J. G.; ARAUJO, A. G. Propagação *in vitro* de orquídea: iodeto de potássio e cloreto de cobalto em meio de cultura Knudson C. **Revista Ceres**, v58, n. 2, p. 273-277, 2011.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v. 67, p. 51-57, 2008.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindlev (orchidaceae). **Hoehnea** v. 4, p. 731-742, 2010.

- TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and number. In ARDITTI, J. (ed). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York. 1984, 432 p.
- VAN DEN BERG, C; HIGGINS, W.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; SOTO-ARENAS, M.A.; CULHAM, A.; CHASE. M.W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from Internal Transcribe Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana**, v. 15, p. 96–114, 2000.
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; SOTO-ARENAS, M.A; CHASE, M.W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417–30, 2009.
- VENTURA, G. M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya* (Dissertação de Mestrado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002, 147p.
- WATTANAWIKKIT, P.; BUNN, E.; CHAYANARIT, K.; TANTIWAT, S. Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2.4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. **Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 45, p. 12-19, 2011.
- WEISING, K.; NYBOM. H.; WOLFF. K.; KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants – principles, methods and application**. CRC Press, 2005, 444p.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WOODS, T. E.; NAKAZATO, T. Investigating species boundaries in the *Giliopsis* group of Ipomopsis (Polemoniaceae): strong discordance among molecular and morphological markers. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 853-861, 2009.

YAM, T. W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, v. 3 p. 1-56, 2009.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do planalto central brasileiro. **Acta Botânica Brasília**, v. 17, p. 101-118, 2003.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; Zhang, J.; Chen, Z.; Xia, N. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh. an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198-209, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

Capítulo 1. Molecular Study on Endemic Orchid Species from Brazilian Flora

Short name: Molecular Study on Orchids

Milena Cristina Moraes*, Mônica Rosa Bertão, Priscila Ventura Loose, Anderson Felipe dos Santos Cordeiro, Darío Abel Palmieri

Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, São Paulo, Brasil.

*Corresponding author: milena.bio@uol.com.br

1.1 Resumo

As orquídeas são conhecidas pela beleza de suas flores, a capacidade de recombinação genética e pela classificação taxonômica da família Orchidaceae não estar bem definida. Por meio das ferramentas moleculares, estudos filogenéticos permitem complementar o entendimento da taxonomia. Marcadores ISSR podem determinar as relações filogenéticas entre espécies e indivíduos da mesma espécie. Neste estudo foram comparados os padrões de bandas polimórficas em indivíduos de *Cattleya guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*, com o intuito de encontrar variações no germoplasma, que possam contribuir para a elucidação de questões filogenéticas. Foram obtidos resultados utilizando 13 iniciadores em 10 indivíduos de cada espécie. As amplificações totalizaram 97 *loci* sendo 96,9% polimórficos para as três espécies estudadas. O protocolo utilizado se mostrou efetivo para a identificação de bandas em todas as espécies estudadas. A análise do padrão total de bandas demonstra que *C. guttata* e *C. leopoldii* são espécies relacionadas do ponto de vista molecular e mais distantes de *C. tigrina*.

Palavras-chave: ISSR, taxonomia, divergência genética, *Cattleya*.

Abstract

Orchids are known for the beauty of its flowers, the ability of genetic recombination and the not well defined taxonomic classification of the Orchidaceae family. Phylogenetic studies using molecular technics allow additional understanding of the taxonomy. ISSR markers can determine the phylogenetic relationships among species and individuals of the same species. In this study it was compared the patterns of polymorphism in subjects of *Cattleya guttata*, *C. tigrina* and *C. leopoldii* in order to find variations in the germplasm, that can contribute to the elucidation of phylogenetic issues. Results were obtained using 13 primers in 10 subjects of each species. Amplicons totaled 97 loci being 96.9% polymorphic for the three studied species. The protocol was effective for the identification of bands in all studied species. The analysis of total banding pattern suggests that *C. guttata* and *C. leopoldii* are species related to each other molecularly and more distant from *C. tigrina*.

Keywords: ISSR, taxonomy, genetic divergence, *Cattleya*.

1.2 Introdução

De grande valor comercial e apreço pela população em geral, as orquídeas são conhecidas pela beleza de suas flores e a capacidade de recombinação genética (Pasqual, 2011).

Todavia, a classificação taxonômica da família Orchidaceae não está bem definida (Oliveira, 2010). Nos últimos 200 anos os estudos filogenéticos das orquídeas têm sido baseados em caracteres morfológicos (Freudenstein & Chase, 2001), especialmente utilizando as características florais (Kores, 2001).

Por meio das ferramentas moleculares, a biotecnologia permite complementar o entendimento da filogenia baseada na morfologia floral e o discernimento de casos de classificação ou identificação duvidosa (Freudenstein & Chase, 2001). Uma das principais técnicas moleculares é o marcador ISSR (inter-simple sequence repeat) (Hossain *et al.*, 2013).

Tal técnica é de fácil interpretação, com similaridade apresentada por bandas em comum entre os genótipos e as dissimilaridades entre as bandas indicam diferenças nos genótipos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). É rápida, de baixo custo, alta reprodutibilidade e não necessita de informações prévias da sequência genômica (Reedy *et al.*, 2002; Martins, 2007).

Marcadores ISSR foram úteis em estudos para determinação de relações filogenéticas entre espécies e diversidade genética entre indivíduos da mesma espécie em orquídeas como *Dendrobium* (Wang *et al.*, 2009), *Piperia yadonii* (George *et al.*, 2009), *Cymbidium* spp (Sharma *et al.*, 2013), *Cattleya* spp e *Brassavola tuberculata* (Fajardo *et al.*, 2014), entre outras. Neste estudo foram utilizados marcadores do tipo ISSR com o propósito de comparar os padrões de

bandas polimórficas em plantas comercializadas das espécies *C. guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii* com o intuito de encontrar variações neste germoplasma.

1.3 Material e Métodos

Foram utilizados 10 acessos de cada espécie estudada. Estes foram adquiridos em orquidários comerciais e sua nomenclatura de origem foi preservada. As plantas foram identificadas com um código de acordo com a cidade de origem (Tabela 1) e numeradas sequencialmente.

O DNA total foi extraído de folhas frescas pelo método CTAB (2X), proposto por Doyle & Doyle (1987) e modificado por Novaes *et al.* (2009). Foram usados de 200 a 300 mg de fragmento foliar de matrizes adultas das espécies *C. guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii* e macerados em nitrogênio líquido. O total de 1,0 mL de tampão de extração CTAB 2X (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-Cl pH 8; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 2% PVP-40; 2% de β -mercaptoetanol) e 35 μ L de proteinase K (1 mg/mL), foram adicionados ao macerado no almofariz, sendo em seguida transferido para microtubo de 2 mL. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 60 min em banho-maria a 60°C. Após resfriamento em temperatura ambiente foram adicionados às amostras 600 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizando com inversões suaves por 5 min, seguido de centrifugação a 15.000 rpm por 15 min a 4°C.

Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para novos microtubos nos quais foram adicionados 140 μ L de 10% CTAB (w/v) e 280 μ L de 5 M NaCl e homogeneizados com suaves inversões. Novamente foram adicionados 600 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e foi repetida a centrifugação. Destes, os

sobrenadantes foram recuperados, transferidos para novos microtubos de 2 mL e adicionados igual volume de isopropanol gelado, sendo mantidos a -20°C por, no mínimo, 12 h. As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 10 min para formação do *pellet*. Após descarte dos sobrenadantes os *pellets* foram lavados três vezes com etanol 70%, seguido de secagem ao ar e ressuspensão em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA). As amostras foram armazenadas a -20°C e utilizadas posteriormente.

Todas as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e selecionadas aquelas com valores de relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0.

Para amplificação dos ISSR foram avaliados 13 iniciadores (Tabela 1), conforme descrito por Wolfe (2000). Estes marcadores mostraram resultados positivos na amplificação de espécies de *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae*, conforme indicado por Rodrigues (2010). Para cada iniciador a ser validado foram utilizados 10 indivíduos de cada espécie de forma a permitir a verificação da presença de polimorfismo. As reações de amplificação seguiram as condições descritas por Wolfe (2000), conforme o ciclo: 94°C/90 s; 35X 94°C/40 s, T_m/45 s, 72°C/90 s, 94°C/45 s, 44°C/45 s; 72°C/5 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (10 µg mL⁻¹), visualizados sob luz UV e registrados em sistema de fotodocumentação de gel (Modelo L PIX HE, Locus), sob luz UV. Somente bandas robustas e identificadas de forma consistente foram utilizadas nas análises estatísticas.

Matrizes binárias foram geradas quanto à presença de bandas (1) ou ausência (0). A similaridade genética entre os indivíduos foi realizada com auxílio do

software R na versão 3.0.3. Os respectivos dendrogramas foram gerados utilizando o coeficiente de Jaccard.

1.4 Resultados

Foram obtidos resultados com os 13 iniciadores testados em todas as 10 amostras de cada uma das três espécies. As análises revelaram a presença de 97 bandas (fragmentos), sendo 94 polimórficas (96,9%) e apenas três monomórficas.

Para a espécie *C. guttata* foi revelado um padrão total de 70 bandas das quais, 92,9% formam polimórficas. Em *C. leopoldii* 75 bandas se mostraram polimórficas (92,0%) e cinco monomórficas (8,0%). A espécie *C. tigrina* apresentou menor quantidade de bandas, totalizando 55 e dessas 92,7% são polimórficas.

O mínimo de fragmentos amplificados para os iniciadores testados foi de três para Terry e o máximo de 12 para 901, com média de 6,53 *loci*.

O tamanho dos fragmentos encontrados variou de 100 bp a 1000 bp. Os maiores fragmentos amplificados foram em *C. guttata* no iniciador 7 (1000 bp), *C. leopoldii* em Mao (930 bp) e *C. tigrina* em Omar (810 bp). Os menores fragmentos aparecem com o uso do iniciador Dat para as três espécies, estando próximos de 100 bp.

Foram gerados dendrogramas para as espécies estudadas a fim de identificar variações no germoplasma dos indivíduos ensaiados e com base nos dendrogramas foram avaliadas as respectivas distâncias genéticas (DG). Entre os acessos de *C. guttata* a DG variou de 0.439 a 0.778 (Figura 1). Em *C. leopoldii* a DG variou de 0.400 a 0.792 (Figura 2). Os valores da DG para *C. tigrina* (Figura 3) variaram de 0.407 a 0.806.

Um quarto dendrograma (Figura 4) foi plotado com o total de 30 indivíduos, sendo 10 de cada espécie, apresentando DG com mínimo de 0.334 e máximo de 0.837. Dois agrupamentos principais podem ser observados, sendo que um contém todos os acessos de *C. tigrina* e o outro contém os 10 indivíduos de *C. guttata* e nove de *C. leopoldii*. O acesso *C. leopoldii* D3 diferenciou-se dos demais, posicionando-se como o mais distante dos grupos principais no dendrograma.

1.5 Discussão

O uso de marcadores ISSR se mostra efetivo para a análise de diversidade genética no gênero *Cattleya*, como visto em *Dendrobium*, em especial pela escassez de informação sobre o genoma (Wang *et al.*, 2009). O protocolo utilizado no presente trabalho se mostrou bastante eficiente, com elevada taxa de polimorfismo (96,9%). Polimorfismo esse que se justifica pelo uso das três espécies e pelos diferentes acessos de cada uma delas. Altos níveis de polimorfismo foram encontrados em outros gêneros de orquídeas como *Dendrobium* (Wang, 2009), *Piperia* (George, 2009) e *Cymbidium* (Sharma, 2013).

Alguns fragmentos foram únicos para as espécies, sendo em *C. guttata* nos iniciadores 7, UBC843, Manny e AW3 (um fragmento em cada), Goofy e Dat (dois fragmentos em cada) e UBC844 (três fragmentos). Em *C. leopoldii* os fragmentos foram únicos em UBC814, UBC899, Omar, AW3 e Dat, dois em Manny e três em Mao. Nos iniciadores Dat e AW3 foi visto apenas um fragmento exclusivo em cada um e dois em UBC814, Mao e Goofy na espécie *C. tigrina*. Nenhum foi exclusivo o suficiente para identificar um iniciador espécie-específico.

Esperava-se que os acessos de *C. leopoldii* fossem mais próximos de *C. tigrina*, pois *C. leopoldii* é sinônimo heterotípico de *C. tigrina*, contudo a Figura 4 evidencia similaridade entre os acessos de *C. leopoldii* com *C. guttata*. Tal fato pode estar relacionado à possibilidade dos indivíduos avaliados e denominados de *C. leopoldii* corresponderem à forma ou variedade de *C. guttata* ou mesmo serem de uma espécie separada e mais próxima de *C. guttata*.

O acesso *C. leopoldii* D3 se mostrou bastante distante dos demais acessos de *C. leopoldii*. Uma explicação para esse comportamento seria que este acesso se originou de um cruzamento entre uma *C. leopoldii* doadora de pólen e uma *C. tigrina* usada como planta mãe.

Daviña (2009) ressalta que a complexidade de se estudar a filogenia da família Orchidaceae se encontra na ampla variedade morfológica, citológica e ecológica. Afirmar que as novas abordagens moleculares auxiliam no entendimento da mesma, entretanto podem apresentar contradições com as análises clássicas.

Sendo assim, conclui-se que o protocolo utilizado se mostrou efetivo para a identificação de bandas em todas as espécies estudadas. A análise do padrão total de bandas demonstra que os acessos estudados denominados de *C. guttata* e *C. leopoldii* são espécies relacionadas do ponto de vista molecular e mais distantes de *C. tigrina*.

1.6 Agradecimentos

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo Nº 2012/16563-1).

1.7 Referências

- Daviña JR, Grabiele M, Ceturtti JC, Hojsgaard DH, Almada RD, Insaurrealde IS, Honfi AI (2009) Chromosome studies in orchidaceae from Argentina. *Genet Mol Biol* 32:811-821.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh life tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Fajardo CG, Vieira FA, Molina WF (2014) Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. *Plant Systematic and Evolution*.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen, 220 p.
- Freudenstein JV, Chase MW (2001) Analysis of mitochondrial nad1b-c intron sequences in orchidaceae: Utility and coding of length-change characters. *Systematic Botany* 26:643-657.
- George S, Sharma J, Yadon VL (2009) Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany* 96:2022-2030.
- Hossain MM, Sharma M, Pathak P (2013) In vitro propagation of *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae) – Seed germination to flowering. *J Plant Biochem Biotechnol* 22:157-167.
- Kores PJ, Molvray M, Weston PH, Hopper SD, Brown AP, Cameron KM, Chase MW (2001) A phylogenetic analysis of *Diurideae* (Orchidaceae) bases on plastid DNA sequence data. *Am J Bot* 88:1903-1914
- Lu J, Hu X, Liu J, Wang H (2011) Genetic diversity and population structure of 151 *Cymbidium sinense* cultivars. *Journal of Horticulture and Forestry* 3:104-114.

- Martins FLC (2007) Análise molecular de espécies perenes e anuais do gênero *Dicerandra* (Lamiaceae) baseada em marcadores ISSR. Viçosa, MG, 60p.
- Novaes RM, Rodrigues JG, Lovato MB (2009) An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genet Mol Res* 8: 86-96.
- Oliveira, LVR (2010) Genetic analysis of species in the genus *Catasetum* (ORCHIDACEAE) using RAPD markers. *Braz Arch Biol Technol* 53:375-387.
- Pasqual M, Soares JDR, Rodrigues FA, Araujo AG, Santos RR (2011) Influência da qualidade de luz e silício no crescimento in vitro de orquídeas nativas e híbridas. *Hortic Bras* 29:324-329.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its applications plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Rodrigues JF (2010) Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. ESALQ, USP. Piracicaba, SP 81 p.
- Sharma SK, Kumaria S, Tandon P, Rao SR (2013) Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22:250-255.
- Wang HZ, Fenge SG, Lu JJ, Shi NN, Liu JJ (2009) Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci Hortic* 122:440-447.
- Wolfe, AD. (2000) ISSR protocols. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR/html> (August 10, 2012).

Tabela 1. Cidade de origem, código e quantidade de plantas adquiridas das espécies *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*.

Cidade e código	<i>C. guttata</i>	<i>C. tigrina</i>	<i>C. leopoldii</i>
Santa Bárbara D'oeste (A)	2	4	2
Bauru (B)	2	3	2
Assis (C)	3	-	3
Arealva (D)	3	3	3
Total de plantas	10	10	10

Tabela 2. Temperatura de anelamento otimizada e taxa de polimorfismo dos iniciadores utilizados para *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*.

Iniciador	Sequência	Tm otimizada	Total de bandas	Porcentagem de polimorfismo
7	(CT)8RG	40°C	8	100%
901	(GT)6YR	52°C	12	100%
AW3	(GT)6RG	42°C	8	100%
DAT	(GA)7RG	47°C	10	100%
GOOFY	(GT)7YG	45°C	8	100%
MANNY	(CAC)4RC	45°C	5	80%
MAO	(CTC)4RC	46°C	11	100%
OMAR	(GAG)4RC	44°C	7	100%
TERRY	(GTG)4RC	52°C	3	66,7%
UBC814	(CT)8TG	42°C	9	100%
UBC843	(CT)8RA	50°C	5	100%
UBC844	(CT)8RC	41°C	5	80%
UBC899	(CA)6RG	36°C	6	100%

Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os acessos de *C. guttata*.

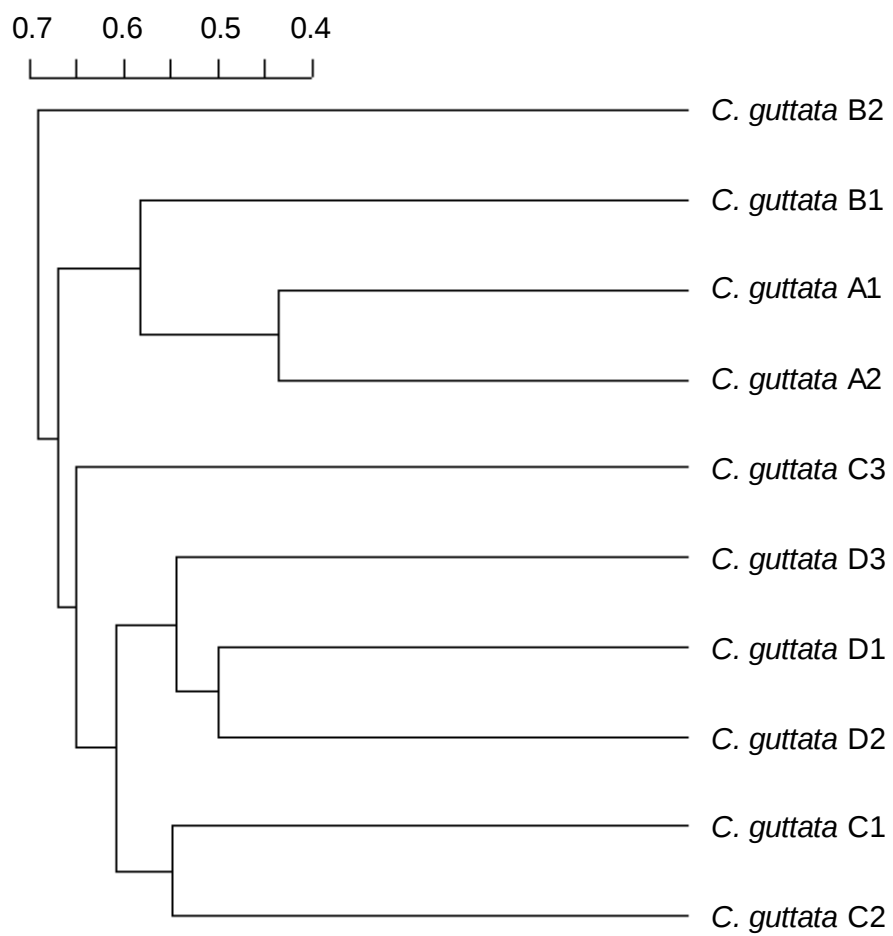


Figura 2. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os acessos de *C. leopoldii*.

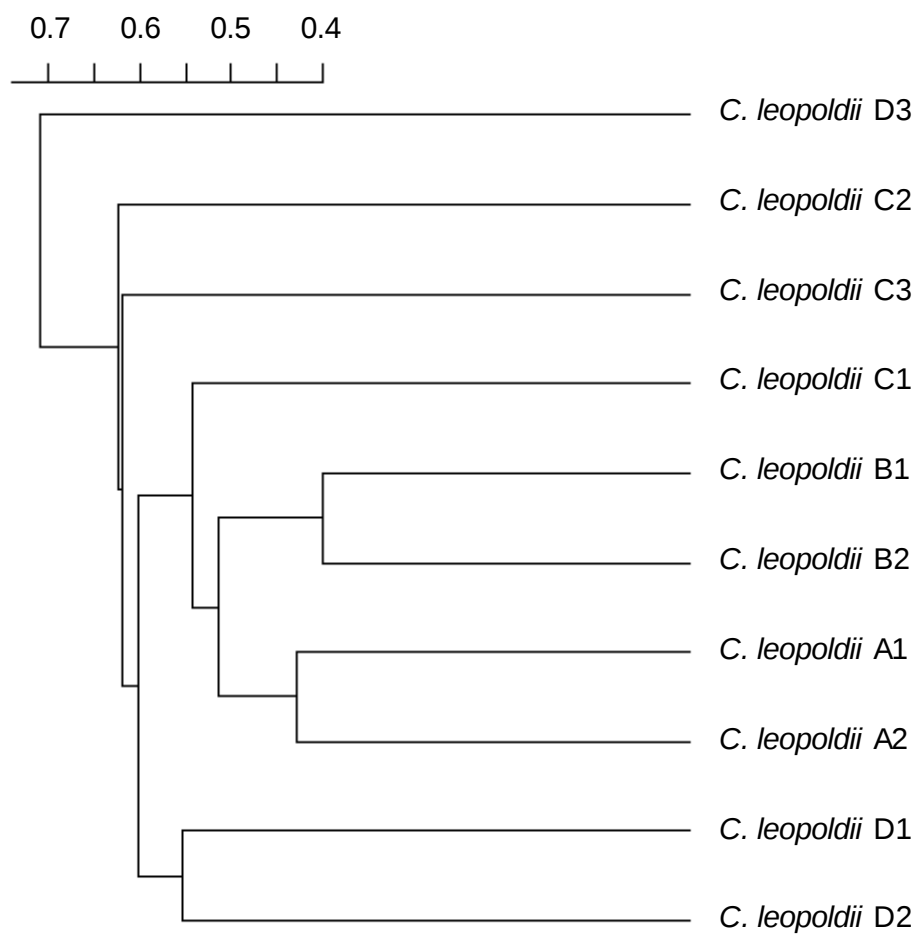


Figura 3. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os acessos de *C. tigrina*.

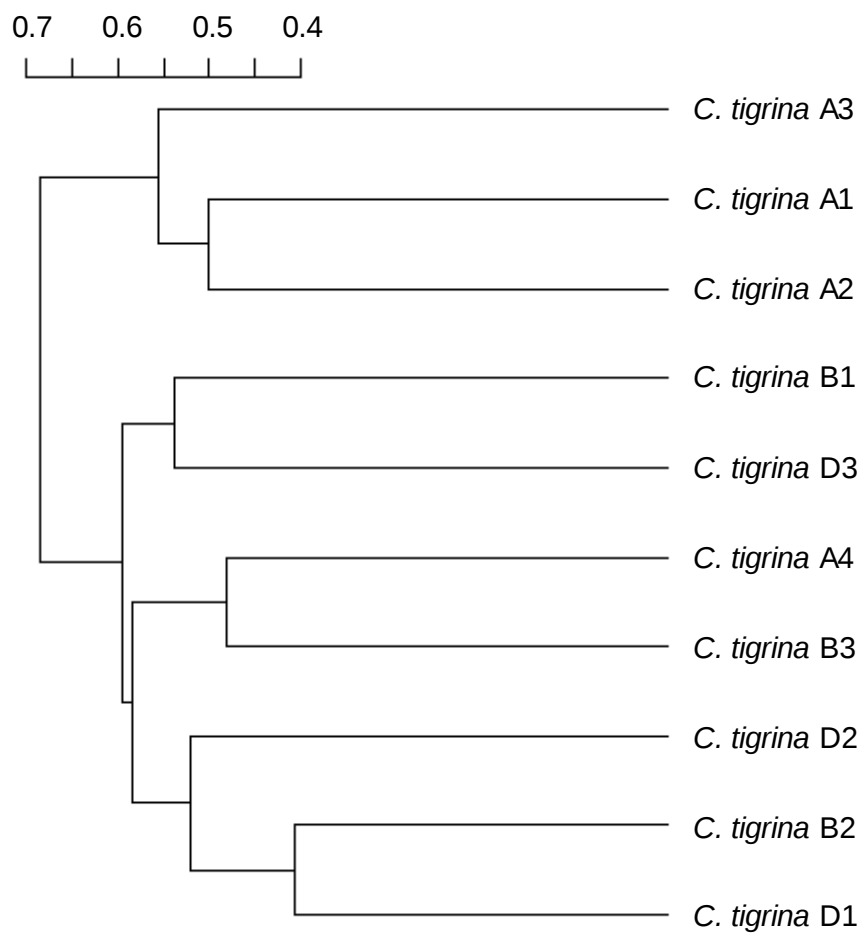
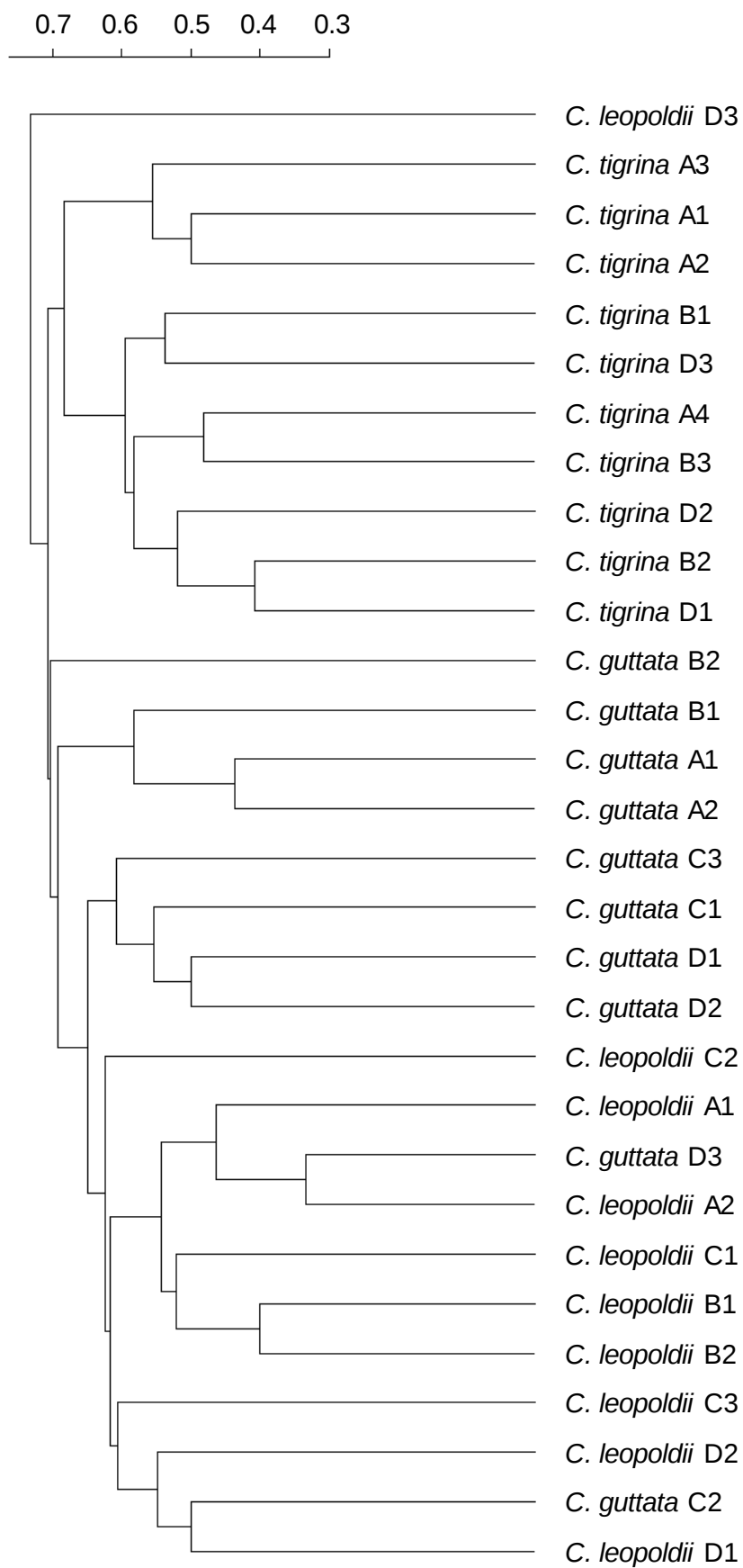


Figura 4. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para todos os acessos de *C.*

guttata, *C. leopoldii* e *C. tigrina*.



Capítulo 2. Aplicação de ferramentas citogenéticas em orquídeas endêmicas brasileiras

Application of cytogenetic technics on endemic Brazilian orchids

Milena Cristina Moraes, Darío Abel Palmieri, Priscila Ventura Loose, Fernanda Gomes Rodrigues, Mônica Rosa Bertão

Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, São Paulo, Brasil.

2.1 Resumo

O conhecimento acerca do número cromossômico de espécies vegetais tem contribuído expressivamente para o entendimento das relações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos em diferentes gêneros. A família Orchidaceae apresenta alta diversidade no nível de ploidia. Entre as *Cattleya*, estudos apontam indivíduos variantes entre 40 e 100 cromossomos, sendo que $n = 20$ é o número básico mais frequente. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar o número cromossômico das espécies *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*. Foi empregado o método de Feulgen em raízes pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina. As melhores preparações citológicas foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente. Constatou-se que os cromossomos não se apresentaram adequadamente condensados e devidamente espalhados. Apesar da dificuldade na análise da morfologia cromossômica observa-se nas figuras mitóticas a ocorrência de diferentes tipos cromossômicos, alguns metacêntricos, outros submetacêntricos e subtelocêntricos. O método empregado para a obtenção das preparações cromossômicas, utilizando-se do agente 8-hidroxiquinolina, não foi eficiente para a

obtenção de cromossomos morfológicamente nítidos e adequadamente espalhados, inviabilizando a determinação do real número cromossômico, bem como a análise da morfologia cromossômica nas espécies em questão.

Palavras-chave: *Cattleya*, orquídea, número de cromossomo.

Abstract

Knowing about the chromosome number of plant species has contributed significantly to the understanding the phylogenetic relationships at all taxonomic levels in different genera. The orchid family has a high diversity in ploidy level. Among the *Cattleya*, studies show individuals ranging between 40 and 100 chromosomes, where $n = 20$ is the most frequent basic number. The aim of this study was to detect the chromosome number of the species *Cattleya guttata*, *C. tigrina* and *C. leopoldii*. Feulgen's method was employed in roots pre-treated with 8-hidroxiquinolina. The best cytological preparations were evaluated qualitatively and quantitatively. It was found that the chromosomes are not properly condensed and spread. Despite the difficulty in the analysis of chromosome morphology is observed mitotic figures in the occurrence of different chromosome types, some metacentric, others submetacentric and subtelocentric. The method used for obtaining chromosome preparations using the 8-hydroxyquinoline agent was not effective for obtaining morphologically distinct and adequately spread chromosomes, avoiting the determination of the actual chromosome number as well as the analysis of chromosome morphology in the question species.

Keywords: *Cattleya*, orchid, chromosome number.

2.2 Introdução

O conhecimento sobre o número cromossômico de espécies vegetais tem contribuído para o entendimento das relações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos, fornecendo informações sobre descontinuidade genética dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes (BERNARDOS et al., 2006; LEE et al., 2011).

A família Orchidaceae apresenta, entre os gêneros e espécies que a constituem, alta diversidade nos níveis de ploidia. Entre as *Cattleyas*, estudos apontam indivíduos variantes entre 40 e 100 cromossomos (ARDITTI, 1992; SILVA et al. 2000). Dressler (1993) afirma ter encontrado entre a diversidade citológica $n = 20$ para a maioria dos grupos estudados.

As informações acerca do número de cromossomos e o cariótipo das espécies vegetais auxiliam no entendimento da estrutura, organização e evolução genômica dos gêneros (EHRENDORFER, 1980; SHARMA, 2010).

O estudo cariotípico é uma ferramenta importante para complementar os estudos taxonômicos e filogenéticos (FELIX & GUERRA, 2005), bem como os programas de melhoramento (DAVIÑA, 2007).

Foram escolhidas as espécies *C. guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina* para o presente estudo, com o objetivo de diagnosticar o número cromossômico das mesmas.

2.3 Material e Métodos

Raízes de plantas adultas das espécies *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina* foram coletadas, pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina (8-HQ) 0,002 M por 24 h sob refrigeração (4°C) e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol/ácido acético) por um período de 24 h e então armazenadas em etanol 70% a 4°C até o momento da preparação.

Para a obtenção de preparações citológicas contendo metáfases mitóticas adequadas à avaliação do número cromossômico foi empregado o método de Feulgen com modificações (AGUIAR-PERECIN & VOSA, 1985). As raízes pré-tratadas com 8-HQ e armazenadas em etanol 70% foram lavadas com água destilada por 5 min duas vezes, hidrolisadas em HCl 5N por 20 min em temperatura ambiente, lavadas novamente em água destilada e submetidas à coloração com Reativo de Schiff (fucsina leucobásica), por 1 h em câmara escura.

Foram aplicadas técnicas de maceração e esmagamento em solução de carmim acético a 1% às raízes já coradas. As melhores preparações citológicas foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente considerando-se o grau de espalhamento celular e cromossômico e a morfologia cromossômica sendo, portanto, selecionadas as que apresentaram cromossomos individuais espalhados e morfologia nítida.

Para a contagem cromossômica foram analisadas, no mínimo, 10 metáfases mitóticas contendo cromossomos nítidos e adequadamente espalhados que foram fotografadas empregando-se fotomicroscópio Nikon com sistema de captura de imagens Moticam, com auxílio do software Motic Images Plus 2.0.

2.4 Resultados e Discussão

As imagens citológicas foram analisadas e constatou-se que os cromossomos não se apresentaram adequadamente condensados e devidamente espalhados (Figura 1), o que inviabilizou a avaliação da morfologia cromossômica, bem como a determinação do número exato de cromossomos individuais para as espécies em estudo, impedindo assim a elaboração dos cariótipos.

Com base na análise do padrão de condensação dos cromossomos (Figura 1) foi possível inferir que o protocolo para a obtenção das metáfases mitóticas, utilizando o agente 8-hidroxiquinolina, não foi efetivo para as espécies em estudo.

Com bases nas análises preliminares, foi possível observar que a condensação cromossômica não foi uniforme entre as espécies ou mesmo dentro da mesma espécie, já que algumas células permaneceram na fase de prometáfase (Figura 1A, C e E), enquanto outras atingiram o estado muito condensado na metáfase, porém com extremidades ainda por condensarem (Figura 1B, D e F). Esta falta de sincronização na condensação cromossômica pode ser reflexo da dificuldade do tecido radicial em absorver o agente mitogênico e consequentemente finalizar o processo de divisão mitótica das células ativas concomitantemente.

Mesmo considerando a dificuldade na análise da morfologia cromossômica foi possível verificar a ocorrência de diferentes tipos cromossômicos, alguns metacêntricos, outros submetacêntricos e subtelocêntricos.

De um modo geral, o pequeno tamanho e o grande número de cromossomos dificultam a obtenção de preparações cromossômicas de qualidade para muitas espécies de orquídeas (MONDIN & DOCHA NETO, 2006). Penha et al. (2011) sugeriram, para esses casos, utilizar técnicas de bandamento ou hibridização *in situ*,

a fim de diferenciar minuciosamente os cromossomos e proceder a elaboração dos padrões cariótipos.

2.5 Conclusões

O método empregado para a obtenção das preparações cromossômicas, utilizando-se do agente 8-hidroxiquinolina, não foi eficiente para a obtenção de cromossomos morfológicamente nítidos e adequadamente espalhados, inviabilizando a determinação do real número cromossômico, bem como a análise da morfologia cromossômica nas espécies em questão.

2.6 Agradecimentos

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo Nº 2012/16563-1).

2.7 Referências

ARDITTI, J. **Fundamentals of Orchid Biology**. New York : John Wiley and Sons, 1992.

BERNARDOS, S. et al. A cytotaxonomic study of three endemic orchids of the Canary Islands. **Annales Botanici Fennici**, v. 43, p. 161–166, 2006. Disponível em: < <http://www.sekj.org/PDF/anbf43/anbf43-161.pdf> > Acesso em: 23 mar. 2014.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; VOSA, C.G. C-banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, v. 54, p. 37-42. 1985. Disponível em: <<http://www.nature.com/hdy/journal/v54/n1/abs/hdy19856a.html>> Acesso em: 10 mar. 2014.

DAVIÑA, J.R. et al. Chromosomic Studies of Argentinian Subtropical Orchids With Ornamental Value in Argentina. **Agro Sur**, v. 35, n. 2, p. 59–61, 2007. Disponível em: <<http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v35n2/art28.pdf>> Acesso em: 10 mar. 2014.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Portland : Dioscorides Press, 1993. 314 p.

EHRENDORFER, F. Polyploidy and distribution. In: Lewis, W.H. **Polyploidy, biological relevance**. New York : Plenum Press, 1980. p.45–60.

FELIX, L.P.; GUERRA, M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, v. 254, n. 3-4, p. 131–148, 15 jul. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00606-004-0200-9>>. Acesso em: 23 mar. 2014. doi: 10.1007/s00606-004-0200-9.

FELIX, L.P.; GUERRA, M. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressier: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. **Caryologia**, v. 52, n. 3-4, p. 165–168, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00087114.1998.10589169>>. Acesso em: 23 mar. 2014. doi: 10.1080/00087114.1998.10589169.

LEE, Y.I.; et al. Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). **Annals of Botany**, v. 108, n. 1, p. 113–21, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576078>>. Acesso em: 23 mar. 2014. doi: 10.1093/aob/mcr114.

MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética Vegetal Enfatizando a Família Orchidaceae. **Orchidstudium**, v. 4, p. 24–54, 2006. Disponível em:

<<http://orchidstudium.com/os/Orchidstudium%20vol.1%204%20Citogenetica.pdf>>

Acesso em: 15 mar. 2014.

PENHA, T.L.L. et al. Números cromossômicos em *Kleberella* V.P. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 466–475, 2011. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062011000200022)

33062011000200022> Acesso em: 15 ma. 2014. doi: 10.1590/S0102-33062011000200022.

SHARMA, S.K. et al. Karyo-morphological characterization of natural genetic variation in some threatened *Cymbidium* species of Northeast India. **Caryologia**, v.

63, n. 1, p. 99–105, 2010. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00087114.2010.10589713>> Acesso

em: 15 mar. 2014. doi: 10.1080/00087114.2010.10589713.

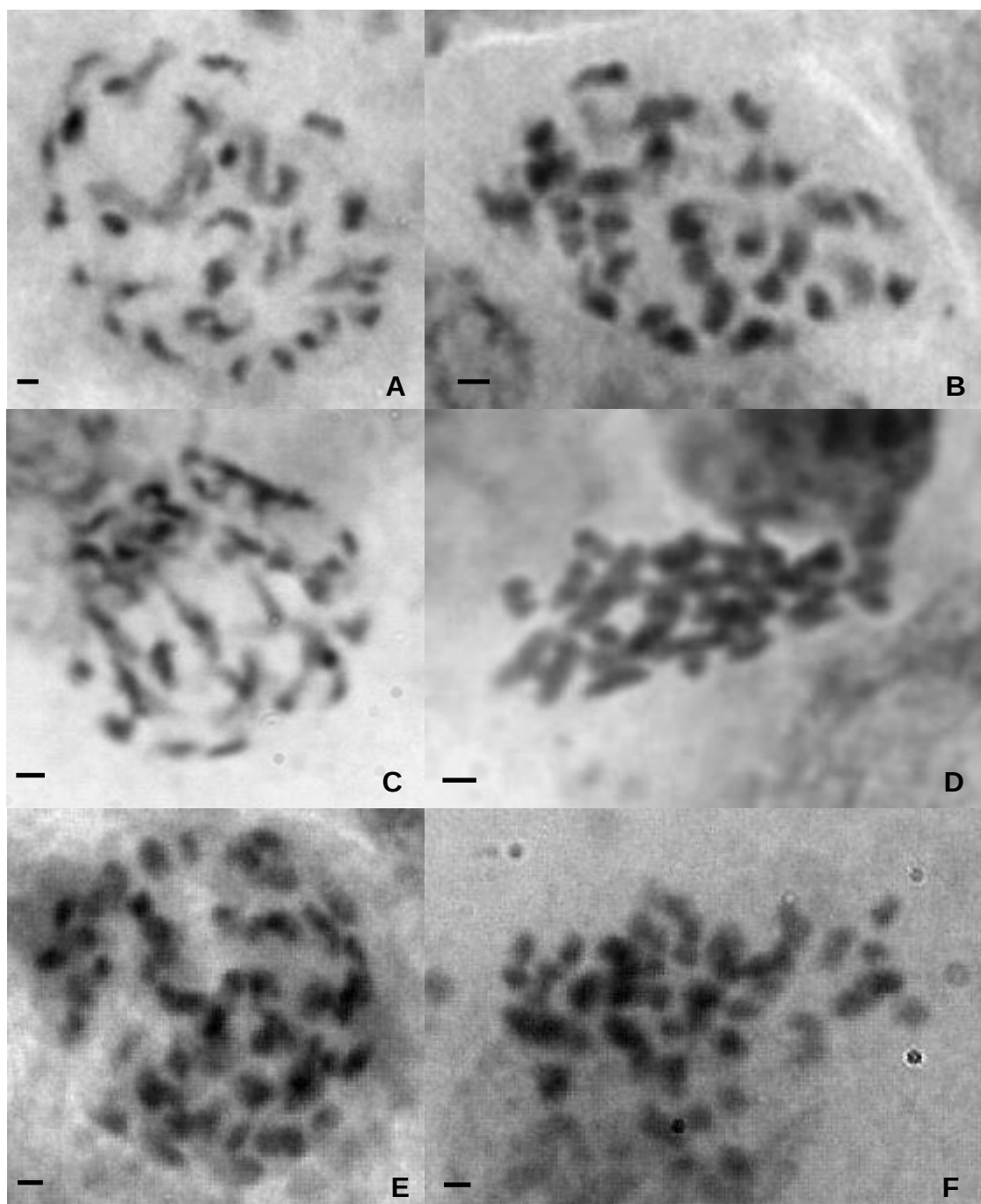
SILVA, P.A.K.X.M. et al. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by in vitro techniques. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p.

105-111 2000. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000100017&lng=en&nrm=iso)

84782000000100017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 jun. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782000000100017.

Figura 1. Complementos mitóticos de *C. guttata* (A e B), *C. leopoldii* (C e D) e *C. tigrina* (E e F). Barra = 1 μ m.



Capítulo 3. Comparação da germinação de sementes de espécies do gênero

***Cattleya* submetidas a diferentes meios de cultivo**

Seed germination comparison among different tissue culture media for species in genus *Cattleya*

Milena Cristina Moraes, Priscila Ventura Loose, Darío Abel Palmieri, Mônica Rosa Bertão

Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, São Paulo, Brasil.

3.1 Resumo

As orquídeas encontram-se distribuídas por todo o globo terrestre, das proximidades do Ártico passando pelos Trópicos até a região da Patagônia. São plantas ornamentais apreciadas e comercializadas em todo o mundo. Devido à polinização na natureza ser limitada e com baixa probabilidade de germinação, foi desenvolvida a técnica de germinação assimbiótica ou cultivo *in vitro*. Tal técnica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com condições naturais fazendo com que as sementes de orquídeas germinem com relativa facilidade em meio nutritivo adequado para um determinado gênero ou espécie. A propagação em larga escala, ainda, possui custos elevados e a simplificação dos meios de cultivo por uso de fertilizantes pode reduzir esses valores. O objetivo deste trabalho foi comparar a atuação de diferentes meios de cultivo na germinação e desenvolvimento de *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*. A avaliação preliminar dos tratamentos mostra que o tempo para a germinação e desenvolvimento dos protocormos foi reduzido, porém são necessários mais estudos sobre o crescimento

e desenvolvimento de plântulas de *C. guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*, para definir o meio de cultivo mais adequado para as espécies estudadas.

Palavras-chave: Orchidaceae; cultivo *in vitro*; fertilizante.

Abstract

Orchids are scattered around the globe, from near the Arctic past the Tropics to the Patagonia. This are ornamental plants are appreciated and commercialize on a worldwide level. Due to the limited pollination in nature and low germination probability, assymbiotic germination technique or *in vitro* culture, was developed. This technique results in higher germination percentages, compared with germination in natural conditions causing the orchid seeds germinate relatively easy in a suitable nutrient medium, particular to genus or species. The large-scale propagation still has high costs and simplifying the culture media by fertilizer use can reduce these values. The aim of this study was to compare the performance of different culture media on germination and development of *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* and *C. tigrina*. Preliminary assessment of the treatments shows that time for germination and protocorm development was reduced, although further studies on the growth and development of seedlings of *C. guttata*, *C. tigrina* and *C. leopoldii* are needed to define the culture media more suitable for the studied species.

Keywords: Orchidaceae; *in vitro* culture, fertilizer.

3.2 Introdução

As orquídeas encontram-se distribuídas por todo o globo terrestre, das proximidades do Ártico passando pelos Trópicos até a região da Patagônia. É nas regiões mais quentes, no entanto, que apresentam maior abundância e variedade de cores e formas. A família Orchidaceae é uma das maiores entre as angiospermas, constituída por mais de 26.000 espécies com a descoberta de 100 a 200 novas espécies por ano (KEW, 2014), além de centenas de híbridos. Em todo mundo, as orquídeas encontram-se entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de elevado valor comercial, participando efetivamente do mercado de plantas e flores ornamentais. Para o público em geral, *Cattleya* é sinônimo de orquídea (ARDITTI, 2008) devido à beleza de suas flores destacando-se entre as mais cultivadas para fins comerciais.

Contudo, a polinização na natureza é limitada pela ação dos polinizadores (IUCN/SSC, 1996) e, quando ocorre, a probabilidade de germinação se dá entre 3 e 5% (TOMBOLATO; COSTA, 1998), pois é necessária a associação da semente com fungos micorrízicos. Esse fator levou o norte-americano Lewis Knudson a desenvolver em 1922, uma técnica denominada germinação assimbiótica ou cultivo *in vitro* que produz em laboratório os mesmos efeitos que o fungo causa na semente, provocando sua germinação.

A germinação assimbiótica constitui uma técnica relevante do ponto de vista comercial e também ecológico (BILCE; KARSBURG, 2009). O cultivo assimbiótico resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais (MARTINI et al., 2001) devido ao fato de as sementes não possuírem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação (RAMOS,

1969). Por isso, em laboratório, as sementes de orquídeas germinam com relativa facilidade em meio nutritivo desde que adequado para o gênero ou a espécie. As plantas produzidas a partir de semeadura *in vitro* podem ser reintroduzidas no ambiente ou comercializadas.

A propagação em larga escala é uma área da biotecnologia vegetal com potencial multimilionário (WINKELMANN et al., 2006; USDA, 2009; LIAO et al., 2011), contudo; o custo da propagação é elevado devido ao emprego de meios de cultivo complexos. Diversos autores demonstraram que a diminuição de custos é possível pela simplificação dos meios de cultivo atuais, principalmente com o emprego de fertilizantes como base de meios de cultivo (STANCATO, BEMELMANS; VEGRO, 2001; UNEMOTO et al., 2007; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009b; GALDIANO JUNIOR et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi comparar a atuação de diferentes meios de cultivo na germinação e desenvolvimento de *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*.

3.3 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências e Letras da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Assis.

Plantas adultas das espécies *Cattleya guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina*, em idade de floração foram autopolinizadas a fim de se obter frutos (cápsulas) contendo sementes viáveis.

Para o desenvolvimento dos experimentos, cápsulas maduras pré-deiscentes foram coletadas das espécies, lavadas com água e detergente neutro, limpas com álcool 70% e desidratadas até a deiscência. No caso de coleta de cápsulas com deiscência iniciada, estas foram coletadas e suas sementes foram imediatamente isoladas. Todas as sementes isoladas permaneceram armazenadas em envelopes de papel Kraft (THOMPSON, 1980), mantidas em dessecadores contendo sílica gel para então serem armazenadas em ambiente refrigerado entre 5°C e -18°C (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA 2006).

Para o procedimento de semeadura, cerca de 40 mg de sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,4% durante 5 min em seringas estéreis descartáveis de 10 mL e lavadas três vezes com água destilada estéril (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006; B&G, 2012). As sementes foram mantidas em água até o momento da incubação nos meios. Essas foram distribuídas em cinco frascos para cada um dos seis tratamentos totalizando 30 frascos.

Foram ensaiados os seguintes meios de cultivo para a germinação: T0 – meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); T1 - meio MS com metade da concentração de macronutrientes; T2 - meio com adição de 2,0 g L⁻¹ de fertilizante comercial Kristalon™ laranja (6:12:36); T3 - meio com Suprimento B&G Orchidées®; T4 - meio com adição de 3,0 mL L⁻¹ de fertilizante comercial Biofert® Orquídeas Concentrado; T5 - meio com adição de 2,0 g L⁻¹ de fertilizante comercial Hyponex® (6,5:6:19). Todos os meios foram gelificados com 7,0 g L⁻¹ de ágar. Com exceção do meio B&G Orchidées®, aos demais foram adicionados 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado e todos tiveram pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121°C, 1 atm. Foram utilizados frascos de 500 mL com 60 mL de meio.

Os frascos semeados permaneceram incubados em sala de cultivo à temperatura de 25+/- 1°C, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de aproximadamente 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Foi observado o tempo para o início da germinação, sabendo-se que esse pode ocorrer entre 15 (SUZUKI, 2010) e 30 dias (SCHNEIDERS, 2012) no gênero *Cattleya* e qualificado por análise visual os meios que apresentaram melhor germinação.

A fim de avaliar o desenvolvimento vegetal *in vitro*, foi utilizado um sistema de pontuação para analisar o desenvolvimento das plântulas nos diferentes meios de cultivo baseado nos critérios: altura média da parte aérea, tamanho médio das raízes, porcentagem de raízes, porcentagem de sobrevivência e desenvolvimento e quantidade de frascos (repetições). Para a altura média da parte aérea e tamanho médio de raiz, empregou-se a pontuação: 0 (ausência), 1 (0,1 cm a 0,5 cm), 2 (0,6 cm a 1,0 cm), 3 (1,1 cm a 2,0 cm), 4 (2,1 cm a 3,0 cm) e 5 (3,1 cm ou mais). No quesito porcentagem de raízes a pontuação utilizada foi: 0 (ausência de raízes), 1 (1 a 25%), 2 (26 a 50%), 3 (51 a 75%), 4 (76 a 100%). Para a porcentagem de sobreviventes: 0 (necrose total do tratamento), 1 (1 a 20%), 2 (21 a 40%), 3 (41 a 60%), 4 (61 a 80%), 5 (81 a 100%). A quantidade de repetições variou entre 1 e 5.

3.4 Resultados e Discussão

O início do processo germinativo observado pela formação dos protocormos nos três lotes se deu após 30 dias da incubação das sementes em todos os tratamentos, sendo que somente aos 50 dias observou-se a formação completa dos protocormos. Esta fase é tida como a germinação propriamente dita (Schneiders

2012), devido ao fato de as orquídeas apresentarem padrão uniforme de germinação desde o intumescimento da semente até a liberação do embrião de seu tegumento (ARDITTI, 1992; KRAUS, 2006).

A avaliação dos tratamentos de *C. guttata* realizada aos 120 dias de incubação, apresentou como melhores tratamentos: T3 para crescimento de parte aérea (altura média de 1,5 cm); T4 para crescimento e quantidade de raízes (média de 1,8 cm e duas raízes por plântula em 85% delas); T3 e T5 para quantidade de plântulas (entre 90 e 100% de germinação); T2, T4 e T5 com a maior quantidade de repetições (4 frascos). Os tratamentos com resultados mais inferiores foram T0 para parte aérea, tamanho de raiz, quantidade de plântulas e repetições (um frasco com cerca de 15% de germinação, sendo as plântulas com média de 0,4 cm de parte aérea e ausência de raízes) e T0 e T1 para quantidade de raiz. O sistema de pontuação classificou como os tratamentos mais promissores para desenvolvimento de plântulas de *C. guttata* os tratamentos T4, T5, T3, T2, T1 e T0.

Para *C. leopoldii* a avaliação foi realizada com 210 dias após a semeadura. O melhor tratamento para parte aérea foi T5 (média de 2,5 cm de altura) e os demais tratamentos se comportaram de maneira semelhante com tamanho entre 1,1 e 2,0 cm, enquanto T2 apresentou maior quantidade de raízes (100% das plântulas com duas raízes em média). Quanto ao tamanho de raiz resultados semelhantes foram observados para os tratamentos T2, T4 e T5 (entre 0,6 e 1,0 cm) e para T0, T1 e T3 (entre 1,1 e 2,0 cm). A maior quantidade de repetições foi observada em T2 e T4 (cinco frascos), sendo que o primeiro mostrou maior quantidade de plântulas. Sendo assim, em escala decrescente, os melhores tratamentos para desenvolvimento de *C. leopoldii* foram T2, T4, T5, T1, T3, T0.

Após 90 dias da incubação das sementes foi realizada a primeira análise para *C. tigrina*. Foi observado que os tratamentos apresentaram resultados semelhantes para média de altura da parte aérea, exceto para T3. O único tratamento que apresentou desenvolvimento de raiz foi T5, sendo as raízes com tamanho médio de 0,3 cm e em pouca quantidade. O melhor tratamento com maior quantidade de plântulas foi T4. A quantidade de frascos em todos os tratamentos foi a mesma e os melhores resultados em ordem decrescente foram vistos em T4, T0, T5, T1, T2 e T3.

Considerando-se o tempo de desenvolvimento deste trabalho, não foi possível realizar uma análise definitiva. Com o desenrolar dos experimentos será possível uma análise que indique quais dos meios de cultivo empregados serão mais efetivos para cada uma das espécies em estudo. Este período de crescimento, além da especificidade dos meios de cultivo para cada espécie deve resultar em quantidade maior de plantas de qualidade, conforme evidenciado por Oliveira e Faria (2005) e Pedroso-de-Moraes (2009a).

Sendo assim, inferimos que o meio de cultivo preparado com adição de fertilizante KristalonTM laranja (T2) apresentou melhor potencial para desenvolvimento das plântulas das espécies denominadas *Cattleya guttata* e *C. leopoldii*, e o menos apropriado foi o meio MS (T0). Para a espécie *C. tigrina* os melhores resultados até o presente momento foram vistos com uso do meio de cultivo suplementado com o fertilizante comercial Biofert® Orquídeas Concentrado (T4) e os resultados menos promissores foram vistos no meio Suprimento B&G Orchidées® (T3).

Unemoto et al. (2007) e Pedroso-de-Moraes et al. (2009a, 2009b) também evidenciaram efeitos benéficos do uso de fertilizantes comerciais no crescimento *in vitro* de orquídeas em relação aos meios tradicionais.

Galdiano Junior et al. (2012) obtiveram resultados positivos com uso fertilizante comercial NPK 10:30:20 em relação ao meio MS reduzido, especialmente em relação ao número de raízes e altura da parte aérea, o que promoveria melhores condições para a fase de aclimatização *ex vitro*.

3.5 Conclusões

Considerando que as sementes selecionadas para o estabelecimento dos experimentos de germinação *in vitro* se apresentaram em níveis variáveis de viabilidade e que o tempo para a germinação e o desenvolvimento dos protocormos foi reduzido, os resultados obtidos foram preliminares e indicam que são necessários estudos futuros sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii* nos meios de cultivo a base de fertilizantes, para precisar o meio de cultivo mais adequado para as espécies estudadas.

3.6 Agradecimentos

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo Nº 2012/16563-1).

3.7 Referências

- ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 92-98, 2006.
- ARDITTI, J. **Micropropagation of orchid. Volume 1**. Oxford: Blackwell publishing. 2ª ed., 2008.

B&G, Flores – Fertilizantes e Nutrição Vegetal. **Germinação de sementes de orquídeas (método da seringa)**, 2012. Disponível em: <<http://www.begflores.com.br/home.php?area=artigo&idArtigo=6&m=3>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

BILCE, T.; KARSBURG, I. V. Germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya nobile* em meio de cultura alternativo. Universidade do Estado do Mato grosso, **2ª Jornada Científica da Unemat**, Barra do Bugres, MT, 2009.

BORBA, E. L.; SEMIR, J.; SHEPHERD, G. J. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. **Annals of Botany**, v. 88, p. 89-99, 2001.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. **Comunicata Scientiae**, v. 3, p. 210-214, 2012.

IUCN/SSC Orchid Specialist Group. **Orchids – Status Survey and Conservation Action Plan**. IUCN: Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1996, 161 p.

KEW, Royal Botanic Gardens. **Orchidaceae**, 2014. Disponível em: <<http://www.kew.org/plants-fungi/for-gardeners/orchids/>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

KNUDSON, C. L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v. 73, p. 1-25, 1922.

KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea** v. 33, p. 177-184, 2006.

LIAO, Y. J., TSAI, Y. C., SUN, Y. W., LIN, R. S., WU, F. S. In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 702–709, 2011.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1319-1324, out. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 5, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, R. L.; FARIA, R. T. In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, v. 27, p. 1-5, 2005.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; DIOGO, J. G.; PEDRO, N. P.; CANABRAVA, R. I.; MARTINI, G. A.; MARTELINE, M. A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, p. 67-69, 2009a.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; SANTOS, N. S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; LEAL, T. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência**, Campo Grande, v. 8, p. 57-65, 2009b.

RAMOS, M. S. S. **O uso do tomate nos meios de cultura**. In: A orquídea e a sua reprodução pela semente. São Paulo: Saraiva, 1969. p. 47-52

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, p. 185-191, mar/abr, 2012.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso.

Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v. 7, p. 25-33, 2001.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (orchidaceae). **Hoehnea** v. 4, p. 731-742, 2010.

THOMPSON, P. A. **Orchids from seed**: Royal Botanic Gardens Kew. London: Mc Corquodale Printers Ltd, 1980. 29p

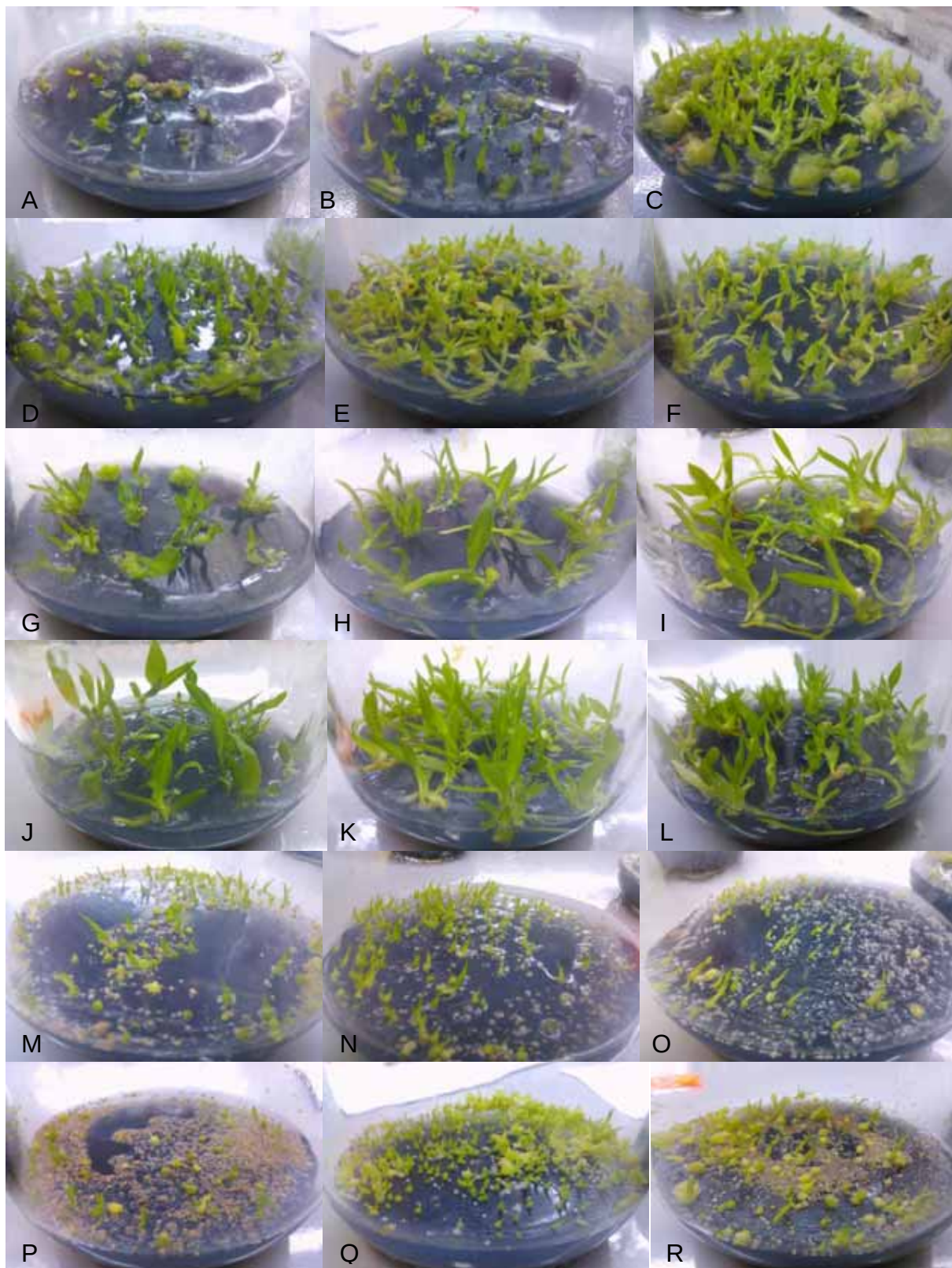
TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico (Boletim técnico, 174), 1998. 72p.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALI, R. J. D. *In vitro* propagation of Brazilian orchids on a simplified culture medium. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, p. 267-269, 2007.

USDA, United States Department of Agriculture. **Floriculture crops 2008 summary**. Washington, DC: National Agricultural Statistics Service, 2009.

WINKELMANN, T.; GEIER, T.; PREIL, W. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 319–327, 2006.

Figura 1. Desenvolvimento das espécies *C. guttata* aos 120 dias (A – T0; B – T1; C – T2; D – T3; E – T4; F – T5), *C. leopoldii* aos 210 dias (G – T0; H – T1; I – T2; J – T3; K – T4; L – T5) e *C. tigrina* aos 90 dias (M – T0; N – T1; O – T2; P – T3; Q – T4; R – T5).



CONCLUSÃO

1. As análises dos padrões moleculares refutam a hipótese inicial de que *Cattleya tigrina* e *C. leopoldii* seriam a mesma espécie e levam a crer que as plantas comercializadas das espécies *C. guttata* e *C. leopoldii* são bastante semelhantes, podendo ser da mesma espécie; enquanto que *C. tigrina* é uma espécie separada das demais.

2. Os estudos citogenéticos realizados não foram suficientemente adequados para afirmar que as espécies *C. guttata*, *C. leopoldii* e *C. tigrina* são semelhantes ou distintas entre si.

3. A procura por um meio de cultivo específico para cada espécie, visando crescimento rápido e em quantidade, necessita de continuidade para somente então afirmar com propriedade qual dos protocolos testados é mais adequado a cada espécie.