

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CITOGENÉTICA DA SUBTRIBO LAELIINAE (ORCHIDACEAE:
EPIDENDROIDEAE): REGIÕES HETEROCROMÁTICAS E
LOCALIZAÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL**

BRUNO CÉSAR QUERINO DE SOUZA

**AREIA – PARAÍBA
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CITOGENÉTICA DA SUBTRIBO LAELIINAE (ORCHIDACEAE:
EPIDENDROIDEAE): REGIÕES HETEROCROMÁTICAS E
LOCALIZAÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL**

BRUNO CÉSAR QUERINO DE SOUZA

AREIA – PARAÍBA

2011

BRUNO CÉSAR QUERINO DE SOUZA

**CITOGENÉTICA DA SUBTRIBO LAELIINAE (ORCHIDACEAE:
EPIDENDROIDEAE): REGIÕES HETEROCROMÁTICAS E
LOCALIZAÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Ecologia Vegetal e Meio Ambiente.

Orientador: Leonardo Pessoa Felix

AREIA – PARAÍBA

2011

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da Biblioteca
Setorial do CCA, UFPB, *Campus II*, Areia – PB.

Souza, Bruno César Querino de.

Citogenética da Subtribo Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroideae):
Regiões heterocromáticas e localização do DNA Ribossomal / Bruno César
Querino de Souza – Areia- PB: UFPB/CCA, 2011.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba
- Centro de Ciências Agrárias, Areia, 2011.

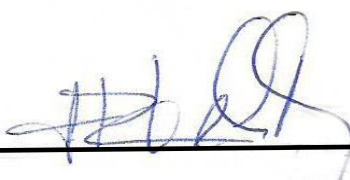
Bibliografia

Orientador: Leonardo Pessoa Felix

**CITOGENÉTICA DA SUBTRIBO LAELIINAE (ORCHIDACEAE:
EPIDENDROIDEAE): REGIÕES HETEROCROMÁTICAS E
LOCALIZAÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL**

BRUNO CÉSAR QUERINO DE SOUZA

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix
Orientador – CCA/UFPB



Profª Dra. Ana Emília Barros e Silva
Co-orientadora – CCA/UFPB



Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Examinador – UFRPE

*Aos meus pais, Lucia e Antonio e aos
meus grandes irmãos Djane e Geandson.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus, por poder completar mais uma etapa da minha vida;

Ao Prof. Leonardo por ter acreditado em mim e continuar acreditando e pela grande orientação, pois sem essa não teria chegado tão longe;

Aos meus familiares, Maria Neto (*In memoriam*), Tia Verônica e Tia Virgínia que sempre contribuíram com conforto e forças para concluir mais esse ciclo;

Aos amigos e amigas do laboratório de Citogenética, Achilles, Erton, Juliana Castro, Nice, Sarah, Saulo e Suelen que sempre e principalmente na etapa final, acreditaram em mim e tornaram o ambiente de trabalho muito mais agradável;

A Ana Emilia por contribuir para a realização desse trabalho, auxiliando com tanta paciência;

A Felipe e Lânia pela ajuda, pois foram à eles que recorri com dúvidas;

A Gustavo pela grande auxílio com a disponibilidade de seu tempo, além da grande ajuda na utilização dos protocolos e parte escrita;

Ao Prof. Reginaldo pelas correções e dicas, que desde já agradeço;

A Luana pelo apoio e companhia durante todas as etapas desse trabalho, pois sempre acreditava que daria tempo e que veio a somar forças para concluir mais esse ciclo;

A Dona Normanda, por abrir suas portas na hora que mais precisei;

A Emmanuely pelos momentos descontraídos e por sempre disposta a ajudar no que fosse possível.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra, ajudaram a chegar até aqui tornando tudo isso realidade e que por não lembrar nesse momento dessas pessoas não quer dizer que não sejam importantes, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | x |
| RESUMO..... | xi |
| 1. Introdução..... | 12 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 15 |
| 2.1 Aspectos gerais sobre a família Orchidaceae..... | 15 |
| 2.2 Distribuição da família Orchidaceae..... | 16 |
| 2.3 Taxonomia de Orchidaceae..... | 17 |
| 2.4 Citogenética da família Orchidaceae..... | 20 |
| 2.5 A subtribo Laeliinae..... | 21 |
| 2.6 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente..... | 22 |
| 2.7 Bandeamento com Fluorocromos CMA/DAPI..... | 25 |
| 2.8 Bandeamento com Fluorocromo CMA/DAPI em Orchidaceae..... | 26 |
| 3. Referências bibliográficas..... | 28 |
| 4. Manuscrito: Diversidade Heterocromática e Localização dos sítios de DNAr 45S e 5S em espécies de Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroidae)..... | 39 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Metáfases mitóticas de *Brassavola ceboletta* (A), *B. nodosa* (B), *B. tuberculata* (C), *Encyclia dichroma* (D), *E. oncidoides* (E), *E. sp* (F), *Isochilus linearis* (G), *Prosthechea faresiana* (H), *P. fragrans* (I), *Scaphyglottis fusiformis* (J) e *S. sickii* (K), mostrando bandas de CMA+ (amarelo) e DAPI+ (azul). Cabeças de setas em D indicam bandas DAPI⁺/CMA⁻ ocupando quase toda a extensão dos braços curtos. Destaque em J e K par cromossômico com bandas DAPI⁺/CMA⁻. Barra em K corresponde a 10 μ..... **60**
- Figura 2:** Metáfases mitóticas de *Laelia marginata* (A), *Cattleya grandis* (B), *C. granulosa* (C), *C. guttata* (D), *C. intermedia* (E), *C. labiata* (F), *C. nobillior* (G), *C. trianae* (H) *C. trianae* (I) *C. warneri* (J) e *C. walkeriana* (K), mostrando bandas CMA+ (amarelo) e DAPI+ (azul). Cabeças de setas indicam: Cromossomo B. (A), CMA+/DAPI⁰ (B) e pequenas bandas CMA+/DAPI⁻ pericentroméricas (C). Barra em K corresponde a 10 μ..... **61**
- Figura 3:** Metáfase mitóticas de *Cattleya labiata* (a), *C. intermedia* (b), *C. trianae* (C), *C. trianae* (D), *C. grandis* (E), *Encyclia oncidoides* (F), *Laelia marginata* (G) *Prosthechea fragrans* (H) e *Scaphyglottis sickii* (I), mostrando sítios de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho). Em destaque cromossomos de outras células, que foram mais bem visualizadas. Barra em A corresponde a 10 μ..... **62**
- Figura 4:** Distribuição cromossômica de bandas heterocromáticas no complemento cromossômico das espécies da subtribo Laeliinae. Posição do centrômero e tamanho do cromossomo não são indicados..... **63**
- Figura 5:** Evolução das bandas CMA (amarelo), sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) e relações filogenéticas nas espécies da subtribo Laeliinae. Árvore modifica de van der Berg (2000)..... **64**

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1. Lista de táxons analisados, números de coletor, locais de coleta, números cromossômicos e tipos de bandas fluorescentes mais evidentes e sítios de 45S e 5S. | 58 |
|--|-----------|

SOUZA, B. C. Q. **Citogenética da Subtribo Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroideae): Regiões Heterocromáticas e Localização do DNA Ribossomal.** Areia-PB. 2011. p. 64. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

A subtribo Laeliinae compreende cerca de 1.500 espécies em aproximadamente 50 gêneros. É um grupo estritamente neotropical, amplamente distribuído por regiões tropicais e subtropicais. O presente trabalho analisou a citotaxonomia de 20 espécies da subtribo Laeliinae e uma espécie de Poneriinae, utilizando as técnicas de bandeamento com CMA/DAPI e FISH com DNAr 5S e 45S. Em sua maioria, as espécies apresentaram $2n = 40$, exceto duas amostras de *Cattleya trianae*, *C. nobilior* e *Prosthechea faresiana*, ambas com $2n = 42$ e $2n = 80$, respectivamente. A análise do padrão de bandas de CMA/DAPI e localização dos sítios de DNAr 5S, foi bastante variável e informativa na diferenciação dos cariótipos da subtribo Laeliinae. Todas as espécies apresentaram blocos CMA⁺/DAPI⁻ terminais em apenas um par cromossômico, exceto *P. faresiana* que teve seis bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻. Esses blocos foram visivelmente heteromórficos em todas as espécies. Bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ foram observadas em todas as espécies brasileiras de *Cattleya* bifoliadas, além de *C. nobilior*, *C. walkeriana*, em um acesso de *C. trianae* e em *C. warneri*. Em todas as espécies os sítios de DNAr 45S foram co-localizados com as bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais heteromórficas em um dos pares cromossômicos do complemento. Nossos dados sugerem ainda que embora apresente uma aparente estabilidade de número cromossômico ($2n = 40$) a subtribo apresenta uma grande variabilidade cariotípica quando são utilizadas técnicas mais refinadas de bandeamento com fluorocromos e o uso de marcadores cito-moleculares. Esses marcadores cromossômicos foram úteis para corroborar agrupamentos filogenéticos, identificando sinapomorfias, ou mesmo para se investigar melhor as relações taxonômicas entre as espécies.

Palavras-chave: Laeliinae, Citotaxonomia, CMA/DAPI, FISH, DNAr 5S.

1. Introdução

A subtribo Laeliinae (Epidendroideae, Orchidaceae) compreende aproximadamente 1.500 espécies em cerca de 50 gêneros (Dressler, 1981; 1993), dos quais, 280 espécies e 29 gêneros para o Brasil (Pabst e Dungs, 1975). É considerada a terceira maior subtribo da família Orchidaceae, após apenas as subtribos Pleurothallidinae e Oncidiinae. É um grupo estritamente neotropical, amplamente distribuído pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas e do Caribe (Dressler, 1981; 1993). Alguns gêneros têm uma ampla distribuição pelo Brasil, como o gênero *Cattleya* (*sensu strictu*) que apresenta um total de 50 espécies, das quais aproximadamente 30 ocorrem no Brasil, 25 delas endêmicas (Pabst e Dungs, 1975).

A subtribo apresenta espécies epífitas, rupícolas ou terrestres. As flores são ressupinadas, mais raramente não ressupinadas, labelo livre ou aderido à coluna (Pridgeon *et al.*, 2005). Suas espécies possuem um número variável de polínias (dois, quatro, seis ou oito), em geral achatadas lateralmente (Dressler, 1993). Apresenta caules secundários delgados com folhas dísticas, ou formando pseudobulbos com folhas apicais, inflorescência terminal, simples ou ramificada, com uma a muitas flores de tamanhos variados. Estudos filogenéticos sugeriram importantes alterações taxonômicas nos últimos anos (van den Berg, 2000, 2008; van den Berg e Chase, 2000, 2001; van den Berg *et al.*, 2009ab). A primeira análise filogenética molecular para a subtribo Laeliinae baseada em seqüências ITS (van den Berg *et al.*, 2000), sugeriu que vários gêneros conforme delimitados por Dressler (1993) não eram monofiléticos e que os gêneros *Ponera*, *Isochilus* e *Helleriella* deveriam ser transferidos para a subtribo Ponerinae. Em seguida, foram sugeridas modificações nomenclaturais para os gêneros *Laelia*, *Cattleya* e *Sophronitis*. Inicialmente, van den Berg *et al.* (2000), sugeriu a inclusão de todas as espécies brasileiras de *Laelia* no gênero *Sophronitis* (ver também van den Berg e Chase, 2000). Posteriormente, Chiron e Castro (2002) optaram por subdividir as

antigas espécies brasileiras de *Laelia* em diversos gêneros menores, geralmente correspondentes aos antigos subgêneros ou secções de *Laelia*. Recentemente, van den Berg *et al.* (2009a), incluindo além das sequências ITS nove regiões plastidiais, sugeriram a inclusão de todas as antigas espécies brasileiras de *Laelia* + *Sophranitis* no gênero *Cattleya*, uma vez que nessa análise, esse conjunto de plantas foi totalmente incluído em *Cattleya*.

Citologicamente a subtribo apresenta elevada variação cromossômica numérica, desde $2n = 24$ em *Epidendrum fulgens* à $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* (a maior contagem para a família) (Conceição *et al.*, 2006; Felix e Guerra, 2010). Laeliinae é caracterizada por apresentar número básico $x = 20$ e evolução principalmente por poliploidia (Felix e Guerra, 2010). Os grupos mais estudados da subtribo são os gêneros *Laelia* (Yamagushi-Costa e Forni-Martins, 2009) e *Cattleya* (Tanaka e Kamemoto, 1984) que apresentam uma variação entre $2n = 40$ a $2n = 80$.

Vários gêneros da subtribo, como por exemplo, *Encyclia*, *Prosthechea* e *Scaphyglottis* são cariologicamente pouco estudados. Além disso, todos os trabalhos até agora publicados para a subtribo, envolveram apenas coloração convencional, não sendo conhecida qualquer referência abordando técnicas com coloração diferencial e FISH. Essas técnicas têm sido bastante úteis para a compreensão da evolução cromossômica em diversos grupos de plantas (Carvalho *et al.*, 2005; Barros e Silva *et al.*, 2010) e, em especial, na família Orchidaceae (Demerico *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2006; Moscone, *et al.*, 2007; Koehler *et al.*, 2008). Essa escassez de dados constitui uma lacuna importante para o entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica ocorrentes nesse grupo de plantas. Além disso, a subtribo apresenta alguns gêneros numericamente bastante estáveis (Felix e Guerra, 2010) e, nesse caso, a diferenciação longitudinal dos cromossomos, poderia ser um marcador citotaxonômico importante. No primitivo gênero *Paphiopedilum*, por exemplo, Lan e Albert (2011), observaram que as secções com número cromossômico constante, apresentavam uma grande

variação no número e posição dos sítios DNAr 5S e esse aumento na quantidade de sítios de DNAr não está relacionado ao aumento no número cromossômico. Além disso, os autores sugerem que os fenômenos de duplicação, translocação e inversão estão envolvidos na evolução desse grupo. O presente trabalho consiste na análise de 20 espécies da subtribo Laeliinae e uma espécie da subtribo Ponerrinae utilizando técnicas de bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI, além da hibridização *in situ* do DNAr 5S e 45S, visando obter marcadores citogenéticos que permitam esclarecer alguns aspectos das relações taxonômicas e mecanismos de evolução cromossômica ocorrentes neste grupo de orquídeas.

2. Revisão de literatura

2.1 Aspectos gerais sobre a família Orchidaceae

Orchidaceae pertence à ordem Asparagales, sendo considerada a maior e mais diversificada dentre das angiospermas por vários autores (Pridgeon *et al.*, 1999; Judd *et al.*, 2009; Souza e Lorenzi, 2005) abrange entre 8% e 10% de todas as plantas com flores (Roberts e Dixon, 2008). Nas monocotiledôneas, aproximadamente metade de todas as espécies são da família Orchidaceae (37,6%) e Poaceae (13,8%) (Judd *et al.*, 2009). Em relação ao número exato de espécies da família há uma grande discórdia entre os autores, porém o número mais aceito é cerca de 24.500 espécies (Dressler, 2005), distribuídas em 800 gêneros (Chase *et al.*, 2003).

A maioria das espécies das orquídeas (cerca de 70%) são epífita (Benzing, 1998), porém, existem espécies rupícolas, terrestres e saprofíticas. Por apresentar essa grande adaptação aos mais variados locais foi possível a ocupação de diferentes tipos de ambientes, pois os representantes de Orchidaceae podem ser encontrados nas mais variadas formações vegetais (Hoehne, 1949). Seus representantes apresentam caule simpodial ou monopodial, frequentemente rizomatoso, formando pseudobulbos e raízes geralmente com epiderme pluriestratificada (velame). Suas folhas são carnosas e a nervação é usualmente paralelinérvia. Apresenta inflorescência cymosa ou racemosa, às vezes reduzida a uma única flor. As flores são zigomorfas, geralmente ressupinadas; com cálice petalóide, corola trímera, uma pétala distinta das demais, o labelo, geralmente com um único estame fértil. O estilete encontra-se fundido aos filetes de um ou mais estames, formando a coluna ou ginostêmio. Seus grãos de pólen em geral são agrupados em polínias, e apresentam uma superfície pegajosa em sua base, sendo esta responsável por aderir ao corpo do polinizador. Fruto cápsula deiscente, abrindo

por 1, 3 ou 6 fendas longitudinais; sementes pequenas, com tegumento membranáceo; endosperma ausente (Dressler, 1993; 1981; Cribb, 2001; Souza e Lorenzi, 2005; Judd *et al.*, 2009).

Por proporcionar flores dos mais variados tamanhos, cores e odores, além de estruturas específicas de atração à polinização, as orquídeas, apresentam os mais variados tipos de polinizadores. Dressler, (1993), relata que os representantes da ordem Hymenoptera, como as abelhas e vespas, é o principal grupo. Na subtribo Oncidiinae, por exemplo, Singer e Cocucci, (1999) encontraram abelhas polinizando flores de *Oncidium paranaense*. A abelha *Tetrapedia sp.* também foi vista polinizando flores de *Oncidium pubes* (Singer, 2003). Polinização por abelhas também foi verificado na subtribo Laeliinae, onde a abelha *Eulaema mocsaryi* é o polinizador de *Cattleya eldorado* (Storti, 2010). Porém algumas espécies ainda são polinizadas por moscas, mosquitos, besouros, borboletas, mariposas e beija-flores (Dressler, 1993). Alguns gêneros, como *Cattleya* Lindl., *Laelia* Lindl., *Encyclia* Hook. e *Schomburgkia* Lindl., podem ser polinizadas tanto por abelhas e como por pássaros, já *Brassavola* R. Br. por mariposas, e *Epidendrum* L. por mariposas, borboletas e pássaros (van der Pijl e Dodson, 1966).

2.2 Distribuição da família Orchidaceae

Orchidaceae apresenta uma distribuição cosmopolita, somente a Groelândia e os pólos não apresentam representantes (Pabst e Dungs, 1975), mas ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Dressler, 1993). Apesar de observada uma distribuição por todo o mundo, para nível de subfamília, a distribuição obedece a limites definidos, e alguns gêneros estão limitados a locais específicos (Dressler 1981; Barros, 1990; Chiron, 2009).

Nas regiões tropicais as orquídeas adotam um hábito predominantemente epifítico (Hoehne, 1940). São registradas, para essa região, cerca de 10.850 espécies, sendo 8.260 espécies e 300 gêneros dos neotrópicos, com 13 desses gêneros de ocorrência exclusiva dessas regiões (Dressler 1981; 1993). Na América do sul, a maior riqueza de espécies de orquídeas está, na região próxima dos Andes, aonde o número de espécies chega a ser impressionante. Na Colômbia, existe o maior número de espécies registradas, chega a cerca de 4.010 espécies, no Equador foram registradas 3.549 (Cribb *et al.*, 2003; Sarmiento, 2007).

O Brasil é considerado o terceiro país mais rico em espécies, (Pabst e Dungs 1975; Dressler 1981), são relatados aproximadamente 2.500 espécies distribuídas em 191 gêneros (Souza e Lorenzi, 2005), dessas, 499 espécies e 106 gêneros ocorrem na Região Nordeste (Pabst e Dungs, 1975, 1977), porém a maior riqueza de espécies se concentra predominantemente na Mata Atlântica (>50%) (Souza e Lorenzi, 2005; van den Berg *et al.*, 2009).

Alguns fatores influenciam de maneira positiva a diversidade e a grande quantidade de espécies de orquídeas, entre eles podemos destacar: geografia (relevo), condições climáticas, existindo uma relação na diminuição no número de espécies à medida que se aproxima das regiões ao Sul do paralelo 30° (Waechter, 1996).

2.3 Taxonomia de Orchidaceae

Os sistemas de classificação de Orchidaceae mais conhecidos são os propostos Dressler (1993) e Szlachetko (1995), porém são baseados principalmente na morfologia. Dressler (1993) propôs que a família fosse dividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae e Spiranthoideae. Porém no sistema de

Szlachetko, (1995) as orquídeas formam a ordem Orchidales com três famílias distintas: Apostasiaceae, Cyripediaceae e Orchidaceae.

Dados moleculares têm desempenhando um papel importante na classificação das Angiospermas (Chase *et al.*, 1993; 2000; 2003; APG, 2009; Soltis *et al.*, 1999; 2000). Em Orchidaceae, estudos filogenéticos foram realizados, para a família, (Chase *et al.*, 1994;. Cameron *et al.*, 1999; 2006), como para as subfamílias (Cox *et al.*, 1997; Kores *et al.*, 1997), ou para as tribos (Goldman *et al.*, 2001), e subtribos (Pridgeon *et al.*, 1997; van den Berg *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001), tentando esclarecer as relações filogenéticas entre esses grupos.

A família Orchidaceae já foi alvo de vários estudos sobre filogenética do que qualquer outra família das Angiospermas, e estes estudos foram a base da obra *Genera Orchidacearum* (Pridgeon *et al.*, 1999;. 2001; 2003; 2005; 2009), que juntou todas as novas propostas feitas na última década sobre a família (Chase *et al.*, 2003). Nesta obra a família Orchidaceae foi subdividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae e Vanilloideae.

Formada predominantemente por plantas terrestres a subfamília Apostasioideae ocorre na Ásia e Oceania e tem somente dois gêneros: *Neuwiedia*, com oito espécies, e *Apostasia*, com sete espécies. Todos os dois gêneros são considerados monofiléticos (Kocyan *et al.*, 2004). Apresenta folhas dispostas em espiral, inflorescência terminal, labelo pouco diferenciado das sépalas e pétalas, dois ou três estames férteis, pólen em mônades e ovário trilocular (Cameron *et al.*, 1999; Pridgeon *et al.*, 1999).

A subfamília Cyripedioideae é comprovadamente monofilética, suas espécies são caracterizadas pela presença de labelo em forma de sapato (labelo saciforme) e pela ocorrência de dois estames férteis e ausência do estame dorsal mediana. As Cyripedioideae são orquídeas bem conhecidos do norte temperado e certas zonas tropicais (Dressler, 1993). É

constituída por plantas terrestres e apresenta uma ampla distribuição, com exceção à África (Freudenstein e Rasmussen, 1999). Esta subfamília compreende cinco gêneros com 158 espécies e tem flores que não oferecem uma recompensa para os polinizadores (Pridgeon *et al.*, 1999).

Epidendroideae é a maior subfamília com 650 gêneros e 18.000 espécies, abrangendo mais gêneros e espécies do que todas as outras subfamílias juntas (Pridgeon *et al.* 2005). Composta principalmente por plantas epífitas, mas também possui plantas terrestres e rupícolas. Morfologicamente é bastante diversificada, caracterizando-se por possuir, um único estame fértil, antera incumbente e duas, quatro, seis ou oito polínias, geralmente com apêndices e inflorescência lateral ou terminal (Pridgeon *et al.* 2005). Ocorre principalmente nos trópicos e subtropicais, mas também é encontrada em clima temperado até o Círculo Ártico (Cribb e Chase, 2005). Possui 16 tribos, onde a tribo Epidendreae é considerada a maior de todas elas (Pridgeon *et al.* 2005).

Com uma ampla distribuição a subfamília Orchidoideae apresenta 210 gêneros e cerca de 3650 espécies principalmente terrestres. Possui uma única antera fértil e ereta, e formação de polínias, com grãos de pólen com maior ou menor grau de união. (Cameron *et al.* 1999; Pridgeon *et al.* 2001; 2003). Evidências recentes indicam que Spiranthoideae *sensu* Dressler (1993) deve ser incluída dentro de Orchidoideae (Chase *et al.*, 2003).

Vanilloideae com 15 gêneros e 175 espécies terrestres ou hemiepífitas apresenta um padrão de distribuição amplo (Pridgeon *et al.* 1999, 2001). Caracterizando-se por apenas um estame fértil e antera incumbente, grãos de pólen soltos, não formando polínias, possui inflorescência terminal ou axilar. (Dressler, 1993; Cameron *et al.* 1999; Pridgeon *et al.* 1999, 2001).

2.4 Citogenética da família Orchidaceae

A importância da análise cromossômica se deve ao fato que este tipo de estudo proporciona a compreensão de muitos aspectos da filogenia, melhoramento genético, taxonomia e evolução cromossômica (Guerra, 2002). As análises citogenéticas têm sido uma importante ferramenta para esclarecer relações taxonômicas e evolutivas em Orchidaceae (Felix e Guerra, 2000; 2005), Cyperaceae (Vanzela, 2003) e Rutaceae (Guerra *et al.*, 2000). Diversos trabalhos foram realizados com contagens cromossômicas para a família Orchidaceae (ver Tanaka e Kamemoto, 1984; Aoyama *et al.*, 1992; Dawson *et al.*, 2007; Daviña *et al.*, 2009) e esses dados cromossômicos apóiam relações filogenéticas propostas por análises anteriores, além de inferir possíveis evoluções cromossômicas nesses grupos de plantas.

O número cromossômico na família é bastante variável de $2n = 12$ em *Erycina pusilla* (como *Psychmorchis pusilla*) (Felix e Guerra, 1999.) a $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* (Guerra, 2000a; Conceição *et al.*, 2006; Assis, 2009). Analisando variabilidade cromossômica numérica de Cymbidioide foi possível sugerir o número básico para o grupo, bem como para os representantes de orquídeas terrestres (Felix e Guerra, 2000, 2005), o que possibilitou o reconhecimento de várias linhagens monofiléticas nesses grupos.

Na subfamília Epidendroideae os números variam de $2n = 24$ em *Malaxis pubescens* a $2n = \text{ca. } 240$ em *Epidendrum cinnabarinum*, que também é a maior contagem para a família (Felix e Guerra, 2010). A subtribo Laeliinae é relativamente pouco conhecida em termos de números cromossômicos com aproximadamente 2,51% de espécies citologicamente conhecidas. Dentre os gêneros desta subtribo, alguns são poucos estudados cariologicamente, quando comparados com outros gêneros da própria subtribo. Um bom exemplo disso é o gênero *Cattleya* que apresenta quase metade de suas espécies estudadas, enquanto gêneros

como *Encyclia* que das 154 espécies pertencentes a este gênero, apenas sete apresenta registro cromossômico (Felix e Guerra, 2010). Apesar de apresentar uma variação cariológica significativa, $2n = 40$ é o número mais frequente na subtribo (Tanaka e Kamemoto, 1984) e $x = 20$ é seu número básico, sugerindo que evolução tenha sido por poliploidia e disploidia (Felix e Guerra, 2010). Entretanto, complexo *Epidendrum secundum* em diferentes populações, apresenta uma grande variação numérica com $2n = 40$ a $2n = 84$ (Assis, 2009).

2.5 A subtribo Laeliinae

Dressler (1993) propôs algumas modificações na tribo Epidendreae, dividindo-a em Epidendreae I, que incluía além Laeliinae, as subtribos Sobraliinae, Arpophyllinae, Meiracyliinae, Coeliinae, e Pleurothallidinae. Em Epidendreae II, estavam incluídas as orquídeas do velho mundo. Szlachetko (1995) dividiu a subtribo Laeliinae em três subtribos distintas: Laeliinae, Epidendrinae e Ponerinae. Porém dados moleculares recentes (van den Berg *et al.*, 2000; van den Berg *et al.*, 2002) corroboram com o sistema proposto por Dressler (1993).

Inicialmente a subtribo Laeliinae foi descrita por Bentham (1881), na ocasião muitas orquídeas pertencentes à subtribo foram incluídas em Stenoglossinae, que posteriormente foi reformulada por Pfitzer (1889), que uniu as duas subtribos mantendo o nome Laeliinae. van den Berg *et al.* (2000) consideraram a subtribo um grupo monofilético, reposicionando os gêneros *Ponera*, *Isochilus* e *Helleriella* que anteriormente eram incluídos em Laeliinae, para a subtribo Ponerinae. Os gêneros *Cattleya*, *Encyclia*, *Epidendrum* e *Laelia* são claramente polifiléticos (van den Berg *et al.*, 2000). Para melhor agrupar as espécies de *Laelia*, van den Berg *et al.*, (2000) transferiu os representantes brasileiros para o gênero *Sphronittis*, pois os

mesmos não pertenciam ao mesmo grupo *Laelia* mexicano. Entretanto, com base em análises filogenéticas moleculares mais recentes o gênero *Sophranitis* foi reposicionado para dentro de *Cattleya*, (van den Berg, 2008, 2009), e atualmente as *Laelias* brasileiras estão divididas em diferentes gêneros (Chiron e Castro 2002).

A subtribo Laeliinae é formada por orquídeas que ocorrem em todas as áreas tropicais e subtropicais das Américas e do Caribe. Possui aproximadamente 1.500 espécies em cerca de 50 gêneros (Dressler, 1981, 1993). Suas espécies são caracterizadas por apresentar polínias em número de dois, quatro, seis ou oito, em geral achatadas lateralmente. Podem ser epífitas, rupícolas ou terrestres (Dressler, 1993). Para o Brasil são reconhecidas 280 espécies e 29 gêneros, sem contar alguns híbridos naturais (Pabst e Dungs, 1975). São plantas epífitas, rupícolas, e raramente terrestres. Suas raízes são velamentosa, com hastes geralmente pseudobolbosos com folhas apicais, geralmente cobertas por bainha decídua ou delgada, caules alongado com folhas dísticas. Inflorescência solitária, fasciculadas, racemosas ou paniculadas, geralmente terminal nos pseudobulbos ou hastes, pseudobulbos desfolhados, dando a impressão de ser suportados a partir do rizoma. Flores ressupinadas, raramente não ressupinadas, variável em tamanho e cor, labelo livre ou ligado em vários graus para a coluna, a coluna sem pés ou com pé da coluna, às vezes alado, clinandrium às vezes com dentes desenvolvidos e outros apêndices; polínia 2, 4, 6, 8 ou 12, geralmente achatados, raramente clavado (Pridgeon *et al.*, 2005).

2.6 Hibridização *in situ* Fluorescente

A hibridização *in situ* tem contribuído enormemente para uma maior caracterização cariotípica de diferentes grupos de plantas (ver, por exemplo, Costa *et al.*, 2006; Feitoza *et al.*,

2010; Ying, *et al.*, 2011), além de ser utilizada na citotaxonomia, melhoramento genético e citogenética clínica. Esse método foi descrito pela primeira vez por Gall e Pardue (1969) e permite a localização de determinadas seqüências de DNA. A FISH tem ampliado e refinado consideravelmente o nível de análise e o campo de atuação da citogenética vegetal. A técnica consiste no isolamento de uma seqüência de DNA marcada com uma sonda (molécula fluorescente) e que irá hibridizar com um sítio da espécie-alvo, mostrando exatamente sua localização (GUERRA, 2004). As sondas mais utilizados são as que marcam as posição dos sítios de DNAr 45S e 5S (ver Heslop-Harrison, 1994).

A localização de sequencias de DNA específica, tem sido utilizada para acompanhar a evolução cariotípica em diferentes grupos de plantas, analisando a variabilidade dos sítios de DNAr 5S e 45S. Os dados de variação de número e posição dos sítios 5S e 45S DNAr em espécies de *Passiflora* por exemplo, foram consistentes para a hipótese de $x = 6$ como provável número básico ancestral para o gênero, enquanto os grupos de espécies com $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ são aparentemente de origem tetraplóide e dispóide (Melo e Guerra, 2003). A análise dos sítios DNAr 5S e 45S em 23 espécies *Eleocharis*, mostrou que os cariótipos dessas espécies são bastante conservados e que pequenas variações no tamanho e no número de sítios de DNAr 45S podem ser considerados os únicos elementos de diferenciação cariotípica (Da Silva *et al* 2010). Em 11 espécies investigadas de Cyperaceae, os sítios de DNAr 5S e 45S estão localizados nas regiões terminais dos cromossomos, exceto para espécies de *Rhynchospora*, que apresentou os sítios de DNAr 5S quase sempre na região intersticial, sugerindo que a variação no número e posição dos sítios de DNAr em espécies com cromossomos holocêntricos não é aleatória, sendo semelhante ao relatado para as espécies com cromossomos monocêntrica, além disso, estes dados forneceram marcadores interessante para distinguir vários cromossomos no cariótipo simétrico em Cyperaceae (Sousa *et al.*, 2011). A família leguminosae teve alguns de seus gêneros também analisados com

FISH. No gênero *Crotalaria*, a diferenciação da heterocromatina e a posição dos sítios de DNAr indicaram que ocorreram rearranjos cromossômicos durante a evolução desse gênero (Morales *et. al*, 2011). Para o gênero *Erythrina*, a análise dos cariótipos de três espécies, através da FISH, foi possível a visualiza algumas diferenças entre essas espécies, as quais mostraram cariótipos bastante conservados, com pequenas variações no tamanho e no número dos sítios de DNAr 45S, os quais podem ser considerados os únicos elementos de diferenciação cariotípica, independente do tamanho e do hábito dessas plantas (Nardy *et al.*, 2010).

Seqüências de DNA repetitivo podem ser muito úteis para compreender as mais diversas tendências evolutivas dentro de Orchidaceae (Demerico, *et al*, 2001), porém são pouco os trabalhos para a detecção dos sitio de DNAr 5S e 45S na família. Em algumas espécies do gênero *Cephalanthera* através de análises com hibridização *in situ*, e com espaçadores intergênicos (ITS) de DNAr, é possível verificar que os cariótipos atuais dessas espécies, são resultados de prováveis rearranjos cromossômicos complexos, possivelmente fusões e fissões Robertsoniana, perda de repetições teloméricas, ganho ou perda de sites de DNAr e outras seqüências heterocromáticos além de inversões (Moscone, *e. al*, 2007). Em *Maxillaria* foram analisados quatro espécies com hibridização *in situ* fluorescente e CMA/DAPI. Foi verificado que o número dos sítios de DNAr 45S e 5S variram e a maioria deles foi co-localizado com regiões heterocromaticas de CMA (Cabral *et al.*, 2006). Contudo na subtribo Laeliinae não são conhecidos dados relativos à localização dos sítios de DNAr 45S e 5S, principalmente para os gêneros de grande importância horticultural, por exemplo *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavola*.

2.7 Bandeamento com Fluorocromos CMA/DAPI

A partir da década de 70 foram desenvolvidas técnicas que permitiram uma diferenciação mais detalhada dos cromossomos através da identificação de regiões heterocromáticas (Schweizer, 1976). Utilizando essas técnicas foi possível visualizar regiões de coloração diferencial, geralmente como faixas transversais, sendo chamadas assim bandas, melhorando significativamente a caracterização cromossômica (Guerra, 2004).

Em vegetais, para a identificação dessas regiões é freqüente a utilização de bandeamento C e a coloração com os fluorocromos, cromomicina A₃ (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), (Friebe *et al.*, 1996). O Bandeamento C fundamenta-se na eliminação de frações eucromáticas e heterocromáticas, acarretando significativas perdas de DNA, sobretudo nas regiões eucromáticas, pois a heterocromatina é mais resistente, permanecendo durante o processo (Schwarzacher *et al.*, 1980). Na coloração com os fluorocromos, ocorre associação do CMA as regiões dos cromossomos ricas em pares de bases GC (guanina e citosina) e o DAPI as regiões dos cromossomos ricas em AT (adenina e timina) (Guerra, 2000b).

Comparado ao bandeamento C, a técnica de coloração com fluorocromo CMA/DAPI apresenta maiores vantagens, pois mais informativo, mostrando quais são as regiões repetitivas de DNA ricas em e GC e AT, além de aparentemente não alterar sua morfologia. Como essas técnicas coram regiões específicas dos cromossomos, é possível uma análise mais detalhada do cariótipo, facilitando assim as observações nas variações das estruturas cromossômicas, sendo evidenciada a distribuição e caracterização das regiões heterocromáticas (Vosa, 1985).

Técnicas de bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI vem sendo amplamente aplicadas em várias famílias botânicas, como por exemplo, no gênero *Citrus* (Rutaceae), com

seis espécies analisadas, a coloração CMA e DAPI revelou alguns marcadores cromossômicos para cada espécie (Guerra, 1993). A partir desta técnica foi possível observar uma grande quantidade de bandas heterocromáticas, e a variação do padrão bandas entre as espécies. Esses dados permitiram uma análise evolutiva (ver Guerra *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2000), onde foi verificada uma suposta origem híbrida de algumas espécies. Também foi possível a utilização desses dados em programas de melhoramento, sendo uma ferramenta poderosa para distinguir zigóticos de embriões nucleares (Guerra, 1993).

Em Rutaceae, as diferenças no padrão de bandas sugeriu a inclusão de *Murraya koenigii* no gênero *Bergera*, (*Bergera koenigii*) dentro da subtribo Clauseninae, enquanto que o gênero *Murraya*, como *M. paniculata* e *Merrillia*, deveriam ser incluídas dentro de Citreae (Guerra *et al.* 2000). No gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae) foi observado que não está presente nenhum padrão único de distribuição típico de segmento heterocromático (Vanzela e Guerra, 2000). Porém nas espécies de *Manihot* e cultivares de Mandioca (*Manihot esculenta*), Carvalho e Guerra (2002) constataram que todas as espécies apresentavam $2n = 36$ cromossomos e um cariótipo simétrico. No bandeamento com CMA/DAPI foi verificado padrões de bandas semelhantes entre cultivares e espécies de *Manihot*, o que sugere uma alta estabilidade cariotípica.

2.8 Bandeamento com Fluorocromo CMA/DAPI em Orchidaceae

A família Orchidaceae tem sido muito pouco estudada em relação à distribuição e localização da heterocromatina. Na subfamília Orchidoideae, por exemplo, D'Emérico *et al.* (2004) analisaram 17 espécies do gênero *Opophrys*, afim de tentar esclarecer relações taxonômicas e alguns aspectos evolutivos desse gênero. Alguns representantes da subfamília Epidendroideae também foram analisados, como o gênero *Phalaenopsis*, sendo verificado que

o tamanho do genoma e da quantidade de heterocromatina constitutiva varia amplamente (Yen-Yu, et al., 2001). Ainda nessa subfamília o estudo da heterocromatina na tribo Neottieae verificou algumas diferenças entre as espécies desse grupo e sugeriu, para algumas espécies que o processo de evolução poderia ser determinada por mutações translocação Robertsoniana (Giuseppina *et al.*, 2010). Cabral *et al.* (2006) analisaram quatro espécies do gênero *Maxillaria* e observou que todas apresentavam padrões diversificado de bandas heterocromáticas. Ainda na subtribo Maxillariinae o trabalho de Koehler *et al.* (2008) propôs uma classificação mais estável e revisou as delimitações das espécies para o gênero *Christensonella*. Os padrões de bandas e a contagem cromossômica sugeriram a ocorrência de fusão cêntrica e/ou fissão, especialmente para *Christensonella ferdinandiana*, porém estudos complementares ainda são necessários para um melhor entendimento desse gênero. Ainda foi sugerido, pelos autores, que as espécies com número cromossômico igual a $2n = 36$ evoluíram das espécies com $2n = 38$. Nesse caso, o padrão de distribuição da heterocromatina provou ser uma fonte valiosa de informação para entender os padrões evolutivos dentro desse grupo.

Contudo na subtribo Laeliinae não são conhecidos dados relativos à localização da heterocromatina. Essa escassez de dados constitui uma lacuna importante para o conhecimento da variação cromossômica nos representantes brasileiros dessa subtribo e a compreensão dos mecanismos de evolução cariotípica ocorrentes nesse grupo de plantas.

3. Referências

- Aoyama M, Chen S-C, Zhang D-M, Tanaka R, Nakata M **Chromosome numbers of some species of the Orchidaceae from China** (1). Journal of Japanese Botany 67: 330–334, 1992.
- APG - Angiosperm Phylogeny Group. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III**. Botanical Journal of the Linnean Society **161**: 105-121. 2009.
- ASSIS, F. N. M. **Variação numérica e evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba. Areia. 70p. 2009.
- Barros, F. **Diversidade Taxonômica e Distribuição Geográfica das Orchidaceae Brasileiras**. Acta bot. bras. 4(1): 1990.
- Bentham, G. **Notes on Orchideae**. Journal Linnean Society Botany 18: 281-360. 1881.
- Benzing, D. H. **Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes**. Climatic Change, p. 519-540. 1998.
- Cabral, J. S.; Felix, L. P.; Guerra, M. **Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae)**. Genetics and Molecular Biology, 29, 4, 659-664. 2006.
- Cameron, K. M.; Chase, M. W.; Whitten, W. M.; Kores, P. J.; Jarrell, D. C.; Albert, V. A.; Yukawa, T.; Hills, H. G.; Goldman, D. H. **Evidence from *rbcL* nucleotide sequences**. American Journal of Botany, New York, v. 86, p. 208-224, 1999.
- Cameron, K. **A comparison of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences for inferring phylogenetic relationships within Orchidaceae**. p. 447-464. In J. T. Columbus, E. A. Friar, J. M.; Porter, L. M. Prince, and M. G. Simpson [eds.]. Monocots: comparative

biology and evolution, vol. 2. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California, USA. 2006.

Carvalho, R. D. and Guerra, M. **Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species**. Hereditas, Lund, v. 36, p.159-163, 2002.

Chase, M. W. Soltis, D. E.; Olmstead, R. G.; Morgan, D.; Les, D. H.; Mishler, B. D.; Duvall, M. R.; Price, R. A.; hills, H. G.; Oui, Y. L.; Kron, K. A.; Rettig, J. H.; Conti, E.; palmer, J. D.; Manhart, J. R.; Sytsma, K. J.; Michael, H. J.; Kress, W. J.; Karol, K. G.; Clark, W. D.; Hedren, M.; Gaut, B. S.; Jansen, R. K.; Kim, K. J.; Wimpee, C. F.; Smith, J. F.; Furnier, G. R.; Strauss, S. H.; Xiang, Q. Y.; Plunkett, G. M.; Soltis, P.S.; Swensen, S. M.; Williams, S. E.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J.; Eguiarte, L. E.; Golenberg, E.; Learn, J. R.; G.H.; Swensen, S. M.; Barrett, S. C. H.; Dayandan, S. and Albert, V. A. **Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequence from the plastid gene *rbcL*** Annals of the Missouri Botanical Garden 80 : 528-580. 1993.

Chase, M. W.; Cameron, K. M.; Hills, H. G. and Jarrell, D. **Molecular systematics of the Orchidaceae and other lilioid monocots**. In Pridgeon, A. M. ed. Proceedings of the 14 th World Orchid Conference .pp. 61-73.HMSO, London. 1994.

Chase, M. W.; Fay, M. F. and Savolainen, V. **Higher-level classification in the angiosperms : new insights from the perspective of DNA sequence data**. Taxon 49 : 685-704. 2000.

Chase, M. W.; Barret, R. L.; Cameron, K. N.; Reudenstein, J. V. **DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification**. In: Dixon KM (ed). Orchid Conservation, Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, p.69-89. 2003.

Chiron, G. R. and V. P. Castro. **Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley**. Richardiana 2: 4-28. 2002.

- Chiron, G. R. **Riqueza e endemismo de espécies de *Baptistonia* (Orchidaceae), no Brasil.** Hoehnea 36(3): 459-477, 2009.
- Conceição, L. P. and Oliveira, A. L. P. C. **Characterization of the *Epidendrum cinnabarium* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) Occurring in Dunas Do Abaeté-Salvador, BA-Brasil.** Japão: Cytologia, **71**(2): 125-129. 2006.
- Costa, J. Y.; Forni-Martins, E. R. and Vanzela A. L. L. **Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismataceae) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH.** Plant Systematics and Evolution 257, 119-27, 2006.
- Cox, A. V.; Pridgeon, A. M.; Albert, V.A. and Chase, M. W. **Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences.** Plant Systematics and Evolution 208: 197-223. 1997.
- Cribb, P. **Morphology of Orchidaceae.** In: Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J. Chase, M. W.; and Rasmussen, F. N. *Genera Orchidacearum*, vol. 1. Oxford University Press, Oxford, UK ISBN 0-19-850513-2. 2001.
- Cribb, P. J.; Kell, S. P.; Dixon, K. W. and Barret, R. L. **Orchid conservation: a global perspective.** In: Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barret, R.L.; Cribb, P.J. (Eds.) *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications (Borneo), p. 1-24. 2003.
- Cribb, P. J. and Chase M. W. **Distribution.** In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase, MW, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum*. Oxford: Oxford University Press, 3. 2005.
- Da Silva, C. R. M.; Quintas, C. C. and Vanzela, A. L. L. **Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae).** Genetica 138, 951–957, 2010.
- Daviña, J. R.; Grabiele, M.; Cerutti, J. C.; Hojsgaard, D. H.; Almada, R. D.; Insaurralde, I. S. E. and Honfi, A. I. **Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina.** Genetics and Molecular Biology: ;32(4):811-821, 2009.

- Dawson, M. I.; Molloy, B. P. J. and E Beuzenberg, E. J. **Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora—39. Orchidaceae.** New Zealand Journal of Botany. Vol. 45: 611-684, 2007.
- Demerico, S. D.; Galasso, I.; Pignone, D. and Scrugli, A. **Localization of rDNA loci by fluorescent in situ hybridization in some wild orchids from Italy (Orchidaceae).** Caryologia 54: 31–36. 2001.
- D'emerico, S.; Pignone, D. Bartolo, G.; Pulvirenti, S.; Terrasi, C.; Stuto, S. and Scrugli, A. **Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society*, 148: 87–99. 2003.
- Dressler, R. L. **The Orchids:** natural history and classification. Harvard University, 1981.
- Dressler, R. L. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family.** Dioscorides Press, Portland, v. 314 p, 1993.
- Dressler, R. L. **How many orchid species?** Selbyana 26: 155-158. 2005.
- Feitoza, L.; Martins, M.; Castro, A.; Felix, L. and Carvalho. R. **Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites** *Plant Systematics and Evolution*, Vol. 286, No. 3, p. 199-208, 2010.
- Felix, L. P. and Guerra, M. **Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson e Dressler: the smallest chromosome number known in Orchidaceae.** Caryologia 52: 165–168. 1999.
- Felix, L. P. and Guerra, M. **Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids.** *Genetics and Molecular Biology*, 23: 957-978, 2000.
- Felix, L. P. and Guerra, M. **Basic chromosome number of terrestrial orchids.** *Plant Systematics and Evolution*, 254: 131-148. 2005.

- Felix, L. P. and Guerra, M. **Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae)**. Botanical Journal of the Linnean Society, 163, 234–278. 2010.
- Freudenstein, J. V. and Rasmussen, F. What does morphology tell us about orchid relationships?-a cladistic analysis . American journal of Botany 86: 225-248. 1999.
- Friebe, B.; Endo, T. R. and Gill, B. S. **Chromosome-banding methods**. In: Fukui K, Nakayama S. *Plant Chromosomes – Laboratory Methods*. CRC Press, Tokyo. p.123-154. 1996.
- Gall, J. G. and Pardue, M. L. **Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations**. Proceedings of the National Academy of Sciences 63, 378–383, 1969.
- Giuseppina, B. and Brullo, C. **Advances in chromosomal studies in Neottieae (Orchidaceae): constitutive heterochromatin, chromosomal rearrangements and speciation**. Caryologia. Vol. 63, no. 2: 184-191, 2010.
- Goldman, D. H.; Freudenstein, J. V.; Kores, P. J.; Molvray, M.; Jarrell, D. C.; Whitten, W. M.; Cameron, K. M.; Jansen, R. K. and Chase, M. W. **Phylogenetics of Arethuseae(Orchidaceae) based on plastid matK and rbcL sequences**. Systematic Botany 26: 670-695. 2001.
- Guerra, M. **Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining**. Heredity 71:234–241. 1993.
- Guerra, M. **Chromosome number variation and evolution in monocots**. In: WILSON KL, MORRISON DA, eds. *Monocots II: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 127–136, 2000a.
- Guerra, M. **Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes**. Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000b.

- Guerra, M. S.; Santos, K. G. B.; Silva, A. E. B. E. and Ehrendorfer, F. **Heterochromatin banding patterns in Rutaceae- Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution**. American Journal of Botany 87(5): 735–747. 2000.
- Guerra, M.; S. and Souza, M. J. **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Recife: Funcec, p. 131. 2002.
- Guerra, M. **FISH-Conceitos e aplicações na citogenética**. In: Pedrosa-Harand A., Guerra M. (eds.) *Contribuições da FISH para a citogenética de plantas*. SBG, Ribeirão Preto, p. 33-59, 2004.
- Heslop-Harrison, J. S. **Techniques et Utilisations des Marqueurs Moléculaires**. INRA, Paris, 1994.
- Hoehne, F. C. **Orchidaceae**. In: Flora brasílica. São Paulo: Instituto de Botânica, v.12, n.1, p.1-254. 1940.
- Hoehne, F. C. **Iconografia das Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, 302p. 1949.
- Judd, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F. and DONOGHUE, M. **J. Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. 3ed. Porto Alegre: Artemed, 612 p., 2009
- Kocyan, A.; Qiu, Y. L.; Endress, P. K. and Conti, E. **A phylogenetic analysis of apostasioideae (orchidaceae) based on ITS, trnL-f and matK sequences**. 247(3-4):203-213+, 2004.
- Koehler, S.; Cabral, J. S.; Whitten, W. M.; Williams, N. H.; Singer, R.B.; Neubig, K. M.; Guerra, M.; Souza, A. P. and Amaral, M. C. E. **Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): Species Delimitation and Insights into Chromosome Evolution**. Annals of Botany 102: 491–507, 2008.

- Kores, P. J.; Cameron, Movray, K. M.; M. and Chase, M. W. **The phylogenetic relationship of Orchidoideae and Spiranthoideae.** Lindleyana 12: 1-11. 1997.
- Melo, N. F.; Guerra, M. **Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers.** Annals of Botany. v.92, p. 309-316, 2003.
- Morales, A.; Aguiar-Perecin, M. and Mondin, M. **Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae.** Genetic Resources and Crop Evolution, p. 1-12. 2011.
- Moscone, E. A.; Rosabelle, S.; Trude, S.; Dieter, S. E. and Pedrosa-Harand, A. **Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution.** Chromosome Research 15:931Y943, 2007.
- Nardy, M.; Yuyama, P. M.; Rego, L. N. A. A. and Vanzela, A. L. L. **Chromosome banding patterns and localization of 5S and 45S rDNA sites in three shrub-tree species of *Erythrina* L. (Leguminosae: Papilionoideae) from Brazil.** R. bras. Bioci., Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 149-153, 2010.
- Pabst, G. F. J. and Dungs, F. **Orchidaceae Brasiliensis.** Band 1. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 408p. 1975.
- Pabst, G. F. J. and Dungs, F. **Orchidaceae Brasiliensis.** Band 2. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 418p. 1977.
- Pedrosa, A.; Schweizer, D. and Guerra, M. . **Cytological heterozigosity and the hybrid origin of sweet orange (*Citrus sinensis* (L) Osbeck).** Theoretical and Applied Genetics, Berlin, Alemanha, v. 100, p. 361-367, 2000.
- Pfitzer, E. **Orchidaceae.** p. 52-222 In: ENGLER, A. e PRANTL, K. (eds.) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien Ergänzungsheft.* 1889.

Pridgeon, A. M.; Bateman, R. M.; Cox, A. V.; Hapeman, J. R. and Chase, M. W.

Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae , Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. *Lindleyana* 12: 89-109. 1997.

Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum.** vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford University Press, New York, 197p. 1999.

Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum** vol. 2. Orchidoideae (Part one). Oxford University Press, New York, 416 p. 2001.

Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds.). **Genera orchidacearum.** vol. 3. Orchidoideae, Vanilloideae. (Part two). Oxford University Press, Oxford. 358 p. 2003.

Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum.** v 4. Epidendroideae (Part one). Oxford University Press, New York, 672p. 2005.

Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds.) **Genera Orchidacearum**, vol. 5. Epidendroideae (Part two). Oxford University Press, New York, 608p. 2009.

Roberts, D. L. and Dixon, K. W. **Orchids.** *Current Biology*, London, v. 18, n. 8, p. 325-329, 2008.

Sarmiento, J. **La Familia Orchidaceae en Colombia.** *Actual Biol* (Supl. 1): 84. 2007.

Schweizer, D. **Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI.** *Chromosoma*, Berlin, v. 58, n. 4, p. 307-324. 1976.

- Shewarzacher, T.; Ambros, P. and Schweizer, D. **Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis**. *Plant. Syst. Evol*, 134:293-297. 1980.
- Singer, R. B. and Cocucci, A. A. **Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids**. *Lindleyana* 14(1): 47-56. 1999.
- Singer, R. B. **Orchid pollination: recent developments from Brazil**. *Lankesteriana* 7: 111-114. 2003.
- Soltis, P. S.; Soltis, D. E. and Chase, M. W. **Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes: A research tool for comparative biology**. *Nature* 402: 402-404. 1999.
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Chase, M. W.; Mort, M. E.; Albach, D. C.; Zanis, M.; Savolainen, V.; Hahn, W. H.; Hoot, S. B.; Fay, M. F.; Axtell, M.; Swensen, S. M.; Nixon, K. C. and Farris, J. S. **Angiosperm phylogeny inferred from a combined data set of 18S r DNA, rbcL and atpB sequences**. *Botanical journal of the Linnean Society London* 133. 381-461. 2000.
- Sousa, A.; Barros e Silva, A. E.; Cuadrado, A.; Loarce, Y.; Alves, M. V. E. and Guerra, M. **Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the “chromosome field” hypothesis**. *Micron* 42 625–631, 2011.
- Souza, V. C. and Lorenzi, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 640p. 2005.
- Storti, E. F.; Braga, P. I. S. and Storti-Filho, A. **Biologia reprodutiva de *Cattleya eldorado*, uma espécie de Orchidaceae das campinas amazônicas**. *Acta Amazonica*. Manaus. vol. 41(3) 2011: 361 – 368. 2010.
- Szlachetko, D. L. **Systema Orchidarium**. — *Fragm. Flor. Geobot.*, Suppl. 3: 1–152. 1995.

- Tanaka R. and Kamemoto, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. *In*: J. Arditti, (eds.). **Orchid Biology Reviews and Perspective III**. Ithaca: Coenell University Press, p. 324-410. 1984.
- van den Berg, C. **New combinations in the genus *Cattleya* (Orchidaceae)**. Neodiversity, Feira de Santana, v. 3, p. 3-12, 2008.
- van den Berg, C. **Phylogeny and systematics of *Cattleya* and *Sophranitis***. Pages 31 9–323 In: R.P. Sauleda; L.A. Sandow. (Org.). The 19th World Orchid Conference. Miami: American Printing Arts. 2009.
- van den Berg, C.; Higgins, W. E.; Dressler, R. L.; Whitten, W. M.; Soto-Arenas, A.; Culham A. and Chase M. W. **A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of Nuclear Ribosomal DNA**. *Lindleyana*, 15: 96 – 114. 2000.
- van den Berg, C.; Higgins, W. E.; Dressler, R. L.; Whitten, M. W.; Culham, A. and Chase, M. W. **Molecular systematics of the Laeliinae**. p. 170-176 *In*: Clark, J.; Elliott, W. M.; Tingley, G.; Biro, J. *Proceedings of the 16th World Orchid Conference (Vancouver)*. Vancouver Orchid Society, Vancouver. 2002.
- van den Berg, C.; Higgins, W.E.; Dressler, R.L.; Whitten, W.M.; Sotoarenas, M. A. and Chase, M. W. **A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences**. *Annals of Botany*, Oxford, v. 104, p. 417-430. 2009.
- van der Pijl, L. and Dodson, C.H. **Orchid flowers: Their pollination and evolution**. University of Miami, Coral Gables. 1966.
- Vanzela, A. L. L. **Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae)**. *Genetic and Molecular Biologic*, 26:199-201. 2003.

- Vanzela, A. L. L. and Guerra, M. **Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae)**. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 2, 453-456. 2000.
- Vosa, C.G. **Chromosome banding in plants**. In: *Chromosome and Cell Genetics* (Sharma, A.K. and Sharma, A., eds.). Gordon and Breach Science Publishers, London, pp. 79-104. 1985.
- Waechter, J. L. **Epiphytic orchids in eastern subtropical South America**. In: 15th World Orchid Conference, 1998, Rio de Janeiro. *Proceedings*. Turriers: Naturalia. p. 332-341. 1996.
- Whitten, W. M.; Williams, N. H. and Chase, M. W. **Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence**. *American Journal of Botany*, New York, v. 87, n. 12, p. 1842-1856. 2000.
- Williams, N. H.; Chase, M. W.; Fulcher, T and Whitten, W. M. **Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from our DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtorchilus*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae)**. *Lindleyana* 16 : 113-139. 2001.
- Kao, Y.; Chang, S.; Lin, T.; Hsieh, C.; Chen, Y.; Chen, W. and Chen, C. **Differential Accumulation of Heterochromatin as a Cause for Karyotype Variation in *Phalaenopsis* Orchids** *Annals of Botany* **87**: 387-395, 2001.
- Ying, Diao; Qingfu, Chen; Xianming, Lin; Chaolin, Liao; Zhongli, Hu and Wang, Youwei. **Karyotype characterization of *Epimedium* species (Berberidaceae) by fluorescent banding and physical mapping of 45S and 5S rDNA**. *Caryologia* vol. 64, no. 1: 84-90, 2011.

4. Manuscritos: Diversidade da Heterocromatina e Localização dos sítios de DNAr 45S e 5S em espécies da subtribo Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroidae)

Bruno César Querino de Souza e Leonardo Pessoa Felix

Laboratório de Citogenética Vegetal, Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus III, 58.397.000, Areia, PB, Brasil. e-mail: brunocesares@yahoo.com.br

Resumo A subtribo Laeliinae compreende cerca de 1.500 espécies em aproximadamente 50 gêneros. É um grupo estritamente neotropical, amplamente distribuído por regiões tropicais e subtropicais. O presente trabalho analisou a citotaxonomia de 20 espécies da subtribo Laeliinae e uma espécie de Poneriinae, utilizando as técnicas de bandeamento com CMA/DAPI e FISH com DNAr 5S e 45S. Em sua maioria, as espécies apresentaram $2n = 40$, exceto duas amostras de *Cattleya trianae*, *C. nobilior* e *Prosthechea faresiana*, ambas com $2n = 42$ e $2n = 80$, respectivamente. A análise do padrão de bandas de CMA/DAPI e localização dos sítios de DNAr 5S, foi bastante variável e informativa na diferenciação dos cariótipos da subtribo Laeliinae. Todas as espécies apresentaram blocos $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ terminais em apenas um par cromossômico, exceto *P. faresiana* que teve seis bandas terminais $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$. Esses blocos foram visivelmente heteromórficos em todas as espécies. Bandas proximais $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ foram observadas em todas as espécies brasileiras de *Cattleya* bifoliadas, além de *C. nobilior*, *C. walkeriana*, em um acesso de *C. trianae* e em *C. warneri*. Em todas as espécies os sítios de DNAr 45S foram co-localizados com as bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ terminais heteromórficas em um dos pares cromossômicos do complemento. Nossos dados sugerem ainda que embora apresente uma aparente estabilidade de número cromossômico ($2n = 40$) a subtribo apresenta uma grande variabilidade cariotípica quando são utilizadas técnicas mais refinadas de bandeamento com fluorocromos e o uso de marcadores cito-moleculares. Esses marcadores cromossômicos foram úteis para corroborar agrupamentos filogenéticos, identificando sinapomorfias, ou mesmo para se investigar melhor as relações taxonômicas entre as espécies.

Palavras-chave: Laeliinae, Citotaxonomia, CMA/DAPI, FISH, DNAr 5S.

Diversity of the heterochromin and Location of the 45S and 5S rDNA sites in species of subtribe Laeliinae (Orchidaceae: Epidendroidae)

Abstract Subtribe Laeliinae comprises about 1500 species and 50 genera. It is a strictly Neotropical group, widely distributed in tropical and subtropical regions. This study examined the cytotaxonomy of 20 species of the subtribe Laeliinae and one species of the Poneriinae, using banding techniques with CMA / DAPI staining and FISH with 5S and 45S rDNA. Most of the species presented $2n = 40$, except two samples of *Cattleya trianae*, *C. nobilior* and *Prosthechea faresiana*, both with $2n = 42$ and $2n = 80$, respectively. The analysis of CMA / DAPI banding pattern and 5S rDNA location sites were quite variable and informative in karyotype differentiation of the subtribe Laeliinae. All species presented CMA+/DAPI- terminal bands in only one chromosome pair, except *P. faresiana* with six CMA+/DAPI- terminal bands. These bands were clearly heteromorphic in all species. CMA + / DAPI- Proximal bands were observed in all bifoliate Brazilian species of *Cattleya*, Besides *C. nobilior*, *C. walkeriana*, and one sample of *C. trianae* and *C. warneri*. In all species 45S rDNA sites were co-located with the CMA+/DAPI- terminal bands in a heteromorphic pair of chromosome complement. Our data suggests that the species karyotypes of the subtribe Laeliinae presents a great variability when using more refined techniques of fluorochrome banding and the use of molecular markers despite its apparent stability of chromosome number ($2n = 40$). These chromosomal markers were useful to corroborate phylogenetic groupings, identifying synapomorphies, or even to investigate the taxonomic relationships between species.

Key words: Laeliinae, Cytotaxonomy, CMA/DAPI, FISH, DNAr 5S.

Introdução

A subtribo Laeliinae (Epidendroideae, Orchidaceae) compreende aproximadamente 1.500 espécies em cerca de 50 gêneros (Dressler, 1981; 1993), dos quais, 280 espécies e 29 gêneros para o Brasil (Pabst e Dungs, 1975). É considerada a terceira maior subtribo da família Orchidaceae, após apenas as subtribos Pleurothallidinae e Oncidiinae. É um grupo estritamente neotropical, amplamente distribuído pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas e do Caribe (Dressler, 1981; 1993). Alguns gêneros têm uma ampla distribuição pelo Brasil, como o gênero *Cattleya* (*sensu strictu*) que apresenta um total de 50 espécies, das quais aproximadamente 30 ocorrem no Brasil, 25 delas endêmicas (Pabst e Dungs, 1975).

A subtribo apresenta espécies epífitas, rupícolas ou terrestres. As flores são ressupinadas, mais raramente não ressupinadas, labelo livre ou aderido à coluna (Pridgeon *et al.*, 2005). Suas espécies possuem um número variável de polínias (dois, quatro, seis ou oito), em geral achatadas lateralmente (Dressler, 1993). Apresenta caules secundários delgados com folhas dísticas, ou formando pseudobulbos com folhas apicais, inflorescência terminal, simples ou ramificada, com uma a muitas flores de tamanhos variados. Estudos filogenéticos sugeriram importantes alterações taxonômicas nos últimos anos (van den Berg, 2000, 2008; van den Berg e Chase, 2000, 2001; van den Berg *et al.*, 2009ab). A primeira análise filogenética molecular para a subtribo Laeliinae baseada em seqüências ITS (van den Berg *et al.*, 2000), sugeriu que vários gêneros conforme delimitados por Dressler (1993) não eram monofiléticos e que os gêneros *Ponera*, *Isochilus* e *Helleriella* deveriam ser transferidos para a subtribo Ponerinae. Em seguida, foram sugeridas modificações nomenclaturais para os gêneros *Laelia*, *Cattleya* e *Sophranitis*. Inicialmente, van den Berg *et al.* (2000), sugeriu a inclusão de todas as espécies brasileiras de *Laelia* no gênero *Sophranitis* (ver também van den Berg e Chase, 2000). Posteriormente, Chiron e Castro (2002) optaram por subdividir as antigas espécies brasileiras de *Laelia* em diversos gêneros menores, geralmente correspondentes aos antigos subgêneros ou secções de *Laelia*. Recentemente, van den Berg *et al.* (2009a), incluindo além das seqüências ITS nove regiões plastidiais, sugeriram a inclusão de todas as antigas espécies brasileiras de *Laelia* + *Sophranitis* no gênero *Cattleya*, uma vez que nessa análise, esse conjunto de plantas foi totalmente incluído em *Cattleya*.

Citologicamente a subtribo apresenta elevada variação cromossômica numérica, desde $2n = 24$ em *Epidendrum fulgens* à $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* (a maior contagem para a família) (Conceição *et al.*, 2006; Felix e Guerra, 2010). Laeliinae é caracterizada por

apresentar número básico $x = 20$ e evolução principalmente por poliploidia (Felix e Guerra, 2010). Os grupos mais estudados da subtribo são os gêneros *Laelia* (Yamagushi-Costa e Forni-Martins, 2009) e *Cattleya* (Tanaka e Kamemoto, 1984) que apresentam uma variação entre $2n = 40$ a $2n = 80$.

Vários gêneros da subtribo, como por exemplo, *Encyclia*, *Prosthechea* e *Scaphyglottis* são cariologicamente pouco estudados. Além disso, todos os trabalhos até agora publicados para a subtribo, envolveram apenas coloração convencional, não sendo conhecida qualquer referência abordando técnicas com coloração diferencial e FISH. Essas técnicas têm sido bastante úteis para a compreensão da evolução cromossômica em diversos grupos de plantas (Carvalho *et al.*, 2005; Barros e Silva *et al.*, 2010) e, em especial, na família Orchidaceae (Demerico *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2006; Moscone, *et al.*, 2007; Koehler *et al.*, 2008). Essa escassez de dados constitui uma lacuna importante para o entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica ocorrentes nesse grupo de plantas. Além disso, a subtribo apresenta alguns gêneros numericamente bastante estáveis (Felix e Guerra, 2010) e, nesse caso, a diferenciação longitudinal dos cromossomos, poderia ser um marcador citotaxonômico importante. No primitivo gênero *Paphiopedilum*, por exemplo, Lan e Albert (2011), observaram que as secções com número cromossômico constante, apresentavam uma grande variação no número e posição dos sítios DNAr 5S e esse aumento na quantidade de sítios de DNAr não está relacionado ao aumento no número cromossômico. Além disso, os autores sugerem que os fenômenos de duplicação, translocação e inversão estão envolvidos na evolução desse grupo. O presente trabalho consiste na análise de 20 espécies da subtribo Laeliinae e uma espécie da subtribo Ponerrinae utilizando técnicas de bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI, além da hibridização *in situ* do DNAr 5S e 45S, visando obter marcadores citogenéticos que permitam esclarecer alguns aspectos das relações taxonômicas e mecanismos de evolução cromossômica ocorrentes neste grupo de orquídeas.

Material e Métodos

Coleta e documentação botânica

Foi analisado um total de 20 espécies pertencentes à subtribo Laeliinae, além de *Isochilus linearis* da subtribo Poneriinae. Todo o material analisado foi proveniente da coleção do orquidário da Universidade Federal da Paraíba, além de coletas provenientes

diretamente do campo. Exsicatas de todo o material estudado encontram-se depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN).

Para a identificação dos materiais, foi utilizado essencialmente Pabst e Dungs (1975; 1977) ou consulta a especialistas, além de comparações com materiais previamente identificados. Todos os binômios foram atualizados de acordo com World Orchid Checklist - www.kew.org/data/monocotsRedirect.html (Govaert, 2009). As espécies estudadas, seus respectivos locais de coleta, coletor e número, número cromossômico, características heterocromáticas e sítios de DNAr 45S e 5S estão sumarizadas na Tabela 1.

Análises citológicas

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 5 h a 18°C, fixadas em Carnoy 3:1 etanol-ácido acético (v/v) por 2-24 h à temperatura ambiente e estocadas em *freezer* a -20°C. O material foi lavado em água destilada e digerido com uma solução enzimática contendo 2% celulase e 20% pectinase por 1 h a 37°C. Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em uma gota de ácido acético 45%, e as lamínulas retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para permitir a seleção das melhores lâminas. Subsequentemente as lâminas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 min à temperatura ambiente, e mantidas em etanol absoluto a 10°C por duas horas. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

Coloração com os Fluorocromos CMA₃ (cromomicina) e DAPI (4'-6, diamidino-2-phenilindole)

Foi seguido o protocolo descrito por Schweizer (1976). As lâminas foram coradas com 10µL de CMA (0,5 mg/ml) sobre as células e cobertas com uma lamínula. Em seguida as lâminas foram guardadas em câmara escura por uma hora, posteriormente foi retirado o excesso de corante com jato de água destilada, e em seguida as lâminas foram secas à temperatura ambiente. Subsequentemente foi adicionado 10µL de DAPI (2 µg/ml) e coberta com uma lamínula, e o conjunto armazenado em câmara escura por meia hora. O excesso de

corante foi retirado com um jato de água destilada e as lâminas montadas com meio tampão glicerol/McIlvaine. Em seguida foram envelhecidas por três dias no escuro para estabilização do fluorocromo. As melhores metáfases das análises a partir do bandeamento foram capturadas em microscópio Leica equipada com câmera de vídeo e programa específico para captura de imagens.

Hibridação in situ fluorescente (FISH) de sondas de DNA ribossomais de 45S e 5S

Algumas lâminas coradas com os fluorocromos CMA e DAPI foram descoradas em Carnoy e submetidas ao processo de FISH de acordo com Moscone *et al.* (1996), com algumas modificações. Foi preparada uma mistura de hibridização consistindo de 60% (v/v) de formamida, 5% (p/v) de dextran sulfato em 2XSSC, além do DNA marcado na concentração final de 1,2-3,0 µg/µl. Essa mistura de hibridização e as preparações citológicas foram desnaturadas a 70°C por 10 min e hibridizadas por 18-20 horas a 37°C em câmara úmida. As sondas de DNAr 5S e 45S foram marcadas com Cy3-dUTP e com digoxigenina 16-dUTP, respectivamente. A sonda de DNAr 45S foi detectada com anticorpo primário anti-digoxigenina produzido em ovelha conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína; Roche) e o sinal amplificado com anticorpo secundário contra anti-digoxigenina de ovelha produzido em coelho conjugado com FITC (Dako). As lâminas foram montadas em Vectashild contendo DAPI na concentração final de 2 µg/ml. As melhores células foram capturadas como descrito anteriormente.

Resultados

Números cromossômicos e bandeamento CMA/DAPI

Foi analisado um total de 20 espécies da subtribo Laeliinae pertencente a seis gêneros (*Brassavola*, *Cattleya*, *Encyclia*, *Laelia*, *Prosthechea* e *Scaphyglottis*), além de *Isochilus linearis* da subtribo Ponerinae (van den Berg *et al.*, 2000), que foi incluído para se ter uma idéia de suas relações citotaxonômicas com Laeliinae. Em sua maioria, as espécies apresentaram $2n = 40$, exceto duas amostras de *Cattleya trianae* ($2n = 42$), *C. nobilior* ($2n = 42$) e *Prosthechea faresiana* ($2n = 80$). A maioria das espécies apresentou cariótipo simétrico,

com núcleos interfásicos semi-reticulados e padrão de condensação profásico variando do tipo proximal ao uniforme.

Após a dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, foi observado que todas as espécies apresentaram blocos CMA⁺/DAPI⁻ terminais mais ou menos visíveis em pelo menos um par cromossômico (Figs. 1-2). Esses blocos foram localizados preferencialmente nos braços curtos dos pares cromossômicos menores e, em todas as espécies, foram visivelmente heteromórficos sendo um bloco maior e outro menor no par homólogo. Adicionalmente, blocos CMA⁺/DAPI⁻ e DAPI⁺/CMA⁻ foram observados na região terminal, proximal e intersticial em um número variável de cromossomos de várias espécies.

No gênero *Brassavola* ($2n = 40$) as três espécies apresentaram duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais heteromórficas e bandas terminais DAPI⁺/CMA⁻ na maioria dos cromossomos. Bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ foram observadas em um par cromossômico de *B. cebolleta* (Figs. 1a, 4) e na maioria dos cromossomos de *B. nodosa* e *B. tuberculata*, (Figs. 1b, c). Estas últimas também diferiram por apresentar cromossomos menores do que *B. cebolleta* e entre si, pelas bandas maiores e mais intensas em *B. tuberculata*.

Para o gênero *Encyclia* ($2n = 40$) todas as três espécies analisadas apresentaram duas bandas heteromórficas e CMA⁺/DAPI⁻ em um par cromossômico de tamanho pequeno ou médio (Figs. 1d, e, f, 4). Contudo, *E. dichroma* (Fig. 1d) diferiu por apresentar bandas DAPI⁺/CMA⁻ ocupando quase toda a extensão dos braços curtos de pelo menos um par cromossômico, além de bandas intersticiais em um ou em ambos braços de alguns outros cromossomos (Figs. 1d). Para o gênero *Prosthechea*, *P. faresiana* destacou-se por apresentar $2n = 80$ (Figs. 1h, 4), com bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais, distribuídas nos braços curtos de três pares cromossômicos de tamanhos distintos, enquanto em *P. fragrans* ($2n = 40$), foi observado dois blocos CMA⁺/DAPI⁻ fortemente heteromórficos, na região terminal de um par acrocêntrico (Figs. 1i, 4). Para o gênero *Scaphyglottis* ($2n = 40$), *S. fusiformis*, apresentaram dois grandes blocos heteromórficos CMA⁺/DAPI⁻ terminais, foram observados blocos DAPI⁺/CMA⁻ na região proximal de três pares cromossômicos e dois blocos terminais em par cromossômico pequeno, (Figs. 1j, 4). *S. sickii* se diferenciou por apresentar um par de cromossomos com duas pequenas bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻, ladeadas por dois grandes blocos DAPI⁺/CMA⁻ intersticiais. Nesta espécie outro par cromossômico exibiu um bloco proximal CMA⁺ no braço curto e outro bloco DAPI⁺ no braço longo. Outros blocos DAPI⁺ foram observados nos terminais dos braços curtos de quatro outros cromossomos (Figs. 1k, 4). *Laelia marginata* ($2n = 40 + 1B$) se destacou por apresentar bandas centroméricas

CMA⁺/DAPI⁻ observadas em todos menos seis cromossomos profásicos do complemento, sem nenhuma banda terminal visível. Além disso, esta espécie apresentou um cromossomo totalmente heterocromático CMA⁺, possivelmente um cromossomo B (Figs. 1a, 4).

No gênero *Cattleya*, foram observadas bandas proximais CMA⁺/DAPI⁻ em todas as espécies brasileiras bifoliadas estudadas, exceto em um acesso de *C. trianae* (Figs. 2h, 4), *C. labiata* (Figs. 2f, 4), *C. grandis* (Figs. 2b, 4) que exibiu apenas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais. Bandas DAPI⁺/CMA⁻ foram visualizadas nos terminais de alguns cromossomos, exceto em *C. labiata* (Figs. 1f, 4), nos dois acessos de *C. trianae* (Figs. 1h, i, 4) e em *C. warneri* (Figs. 1j, 4).

Distribuição dos sítios de DNAr

A FISH para o DNAr 5S e 45S em oito espécies da subtribo Laeliinae pertencente a cinco gêneros: *Cattleya*, *Encyclia*, *Laelia*, *Prosthechea* e *Scaphyglottis*, revelou uma grande variabilidade de número, localização e tamanho dos sítios ribossomais, especialmente do DNAr 5S. Em todas as espécies os sítios de DNAr 45S co-localizaram bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais heteromórficas no braço curto de um dos pares cromossômicos. Para *C. labiata* e *L. marginata* (Figs. 3a, g, 5), os sítios de DNAr 5S foram localizados na região intersticial de dois pares cromossômicos, enquanto em *C. intermedia* (Figs. 3b, 5) os sítios 5S foram visualizados em ambos os braços de um único par cromossômico. Em *C. trianae* (Figs. 3d, 5) foram observados seis sítios de DNAr 5S, sendo dois pares com sítios proximais menores e um par com sítios maiores nos terminais dos braços longos. Uma outra amostra de *C. trianae* (Figs. 3c, 5) também apresentou seis sítios de DNAr 5S, porém dois sítios ocorreram em ambos os braços de um único cromossomo, co-localizado com bandas CMA⁺ (Figs. 2h, 5). Em *C. grandis* (Figs. 3e, 5) também foram observados seis sítios de DNAr 5S proximais, sendo um par proximal menor, outro maior e um terceiro adjacente ao sítio 45S.

Prosthechea fragrans (Figs. 3h, 5) e *Scaphyglottis sickii* (Figs. 3i, 5) apresentaram dois sítios de DNAr 5S na região proximal de um par cromossômico, enquanto *Encyclia oncidiodes* (Figs. 3f, 5) apresentou quatro sítios de 5S, sendo dois pericentroméricos e dois intersticiais nos braços longos de um par cromossômico.

Discussão

Das 21 espécies analisadas, cinco delas (*B. ceboletta*, *C. grandis*, *E. dichroma*, *P. faresiana* e *S. sickii*, todas com $2n = 40$), não possuíam registro cromossômico prévio na literatura. As demais tiveram suas contagens prévias confirmadas, exceto *C. trianae* com $2n = 42$ na presente amostra e $2n = 40$ nos dados de literatura (Tanaka e Kamemoto, 1984; Moore, 1973). A família Orchidaceae é notavelmente pouco conhecida em termos de bandeamento com fluorocromos e localização dos sítios de DNAr, sem nenhum registro prévio para representantes da subtribo Laeliinae. Esse tipo de informação está restrito apenas à alguns representantes da subfamília Orchidoideae (Demerico *et al.*, 2001), da subtribo Maxillariinae (Cabral *et al.*, 2006, Koehler *et al.*, 2008) e em *Paphiopedilum* (Lan e Albert, 2011), e em alguns outros grupos. Apesar de raros, esses registros revelam uma surpreendente variabilidade cromossômica estrutural, o que foi comprovado no presente trabalho. A análise do padrão de bandas de CMA/DAPI e localização dos sítios de DNA ribossomal, especialmente o DNAr 5S, foi bastante informativo e útil na diferenciação dos cariótipos da subtribo Laeliinae. Muitas vezes, espécies próximas com mesmo número cromossômico apresentaram padrão de bandas e localização dos cistrons ribossomais claramente distintos. O padrão de bandas CMA/DAPI com uma abundante quantidade de blocos ricos em GC ou AT, foi uma característica frequente na maioria dos gêneros estudados. Contudo, em duas das espécies de *Encyclia*, no seu gênero relacionado *Prosthechea* (Pires *et al.*, 2003; van den Berg *et al.*, 2009a) e no gênero *Isochilus*, da tribo Poneriinae, predominou um padrão mais simples com apenas duas bandas CMA⁺ terminais, possivelmente a condição ancestral para a subtribo.

No gênero *Brassavola* as duas espécies brasileiras aqui estudadas, apresentaram um padrão de bandas CMA/DAPI claramente distintos, com ocorrência de bandas proximais CMA positivas na maioria dos cromossomos de *B. tuberculata* e em apenas um par cromossômico de *B. ceboletta*. Ambas as espécies possuem ampla distribuição, embora *B. ceboletta* ocorra preferencialmente em vegetação de cerrado. Por outro lado, *B. nodosa*, uma espécie extra-brasileira da América Central, apresentou padrão de bandas semelhante a *B. tuberculata*. Essas características sugerindo uma maior proximidade citotaxonômica entre essas duas espécies. A ocorrência paralela desses eventos de evolução cariotípica não pode ser descartada. Gêneros próximos como *Citrus* e *Murraya* da subfamília Aurantioideae das Rutaceae, possuem sítios de DNA repetitivo molecularmente distintos, provavelmente originados a partir de eventos evolutivos paralelos (Barros e Silva *et al.*, 2010). As espécies brasileiras de *Brassavola* são de difícil delimitação taxonômica, sendo em geral polimórficas para os caracteres florais e homomórficas quanto aos caracteres vegetativos (Chacur, 1973;

Pabst e Dungs, 1975). Por outro lado, uma análise do cladograma fornecido por van den Berg *et al.* (2009a), revelou que o gênero *Brassavola* é fortemente monofilético e que *B. tuberculata* forma um clado com razoável suporte filogenético com *B. nodosa* e *B. martiana*. Nesse sentido, a similaridade no padrão de bandas CMA/DAPI entre essas duas espécies suporta claramente esta hipótese de filogenia, apesar das espécies ocuparem províncias fitogeográficas distintas que provavelmente conectada através de corredores migratórios (ver, Pabst e Dungs, 1975; Braga, 1982)

As espécies analisadas de *Scaphyglottis* divergiram entre si e em relação aos demais membros da subtribo pela presença de blocos heterocromáticos ricos em AT na região proximal de um a vários pares de cromossomos. Esse padrão de distribuição da heterocromatina parece ser claramente derivado em relação ao padrão observado em *Isochilus* um gênero segregado da subtribo Laeliinae, supostamente mais basal (van den Berg *et al.*, 2009a). Provavelmente, sugerindo que a aquisição de um padrão de bandas mais complexo na subtribo Laeliinae surgiu após a divergência desta subtribo. Se uma análise de Ponerrinae confirmar esta hipótese, pelo menos em duas espécies *Cattleya* e em outras duas espécies de *Encyclia*, ocorreu uma reversão a um padrão de distribuição de heterocromatina mais simples, com um único par de bandas CMA terminais. Os dois acessos de *C. trianae* apresentaram diferentes padrões de bandas CMA+/DAPI-, com bandas CMA positivas pericentroméricas em um acesso e sem essas bandas em outro. Esta espécie possui distribuição exclusiva para os contrafortes andinos colombianos, sendo amplamente utilizada na formação de híbridos interespecíficos (Withner, 1988). Essa diferença cariológica poderia se relacionar ao isolamento geográfico de populações localizadas em diferentes regiões dos contrafortes andinos. Em uma análise de 10 acessos de *Crocus vernus* da família Iridaceae, observou-se uma significativa variação na localização de sítios de sequências repetitivas de DNA (Frello e Heslop-Harrison, 2000). Contudo, na presente amostra, esses acessos foram provenientes do cultivo *in vitro*, e é possível que essa diferença seja consequência de alterações cromossômicas ocasionadas pelo meio de cultura. Mutações cromossômicas e alterações no fenótipo são frequentemente observadas em materiais provenientes da multiplicação *in vitro* (Arditti, 1982). No entanto, outras duas espécies de *Cattleya* unifolioladas provenientes do campo, também apresentaram diferenças importantes no padrão de bandas CMA/DAPI: *C. labiata* (duas bandas CMA terminais) e *C. warneri* (bandas CMA terminais em um par cromossômico e proximais em outros três). As duas espécies são muito similares morfológica e filogeneticamente, sendo algumas vezes consideradas conspecíficas (Withner, 1988; van den Berg *et al.*, 2000). *Cattleya labiata* ocorre exclusivamente em

regiões serranas da Região Nordeste do Brasil conhecidas como “Brejos de Altitude” (Menezes, 1986), enquanto *C. warneri* é típica das regiões serranas do sul da Bahia ao Rio de Janeiro (Menezes, 1994).

No gênero *Cattleya*, todas as espécies do grupo de plantas bifoliadas do Brasil foram caracterizadas por apresentar bandas CMA⁺ proximais na maioria dos cromossomos, além de bandas terminais DAPI positivas. Esse grupo de *Cattleya* tem um padrão de distribuição predominantemente no atlântico brasileiro, sendo bem caracterizado em termos morfológicos (Withner, 1988; Fowlie, 1977) e formam um clado filogeneticamente muito bem suportado (van den Berg *et al.*, 2009a). Contudo, *C. walkeriana* e *C. nobilior* se destacaram por apresentar um padrão de bandas similar aquele observado no grupo das *Cattleya* bifoliadas. Essas espécies ocorrem no Brasil e em alguns países limítrofes exclusivamente na vegetação savanícola de cerrado e são relacionadas filogeneticamente, caracterizadas por apresentarem floração através de um pseudobulbo atrofiado, sem folhas (Pabst e Dungs, 1975). Estas duas espécies se distinguem cariologicamente por apresentar números cromossômicos distintos, $2n = 40$ em *C. walkeriana* e $2n = 42$ em *C. nobilior*, além de possuírem bandas CMA nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos.

Uma característica recorrente relativa distribuição da heterocromatina na subtribo Laeliinae, é a presença de blocos ricos em AT especialmente comum nos terminais cromossômicos de um número significativo de espécies. Foi característico, por exemplo, nas espécies brasileiras de *Cattleya* bifoliadas, na aliança da *C. walkeriana* e no gênero *Brassavola*. No gênero *Scaphyglottis*, entretanto, ocorreram blocos DAPI terminais em uma espécie e predominantemente proximais em outra. Esse tipo de heterocromatina também visualizado em grupos de orquídeas não relacionados, como nos gêneros *Cypripedium* (Kondo *et al.*, 1994), *Anacamptis* (Demerico *et al.*, 2001), em *Cephalanthera* (Moscone *et al.*, 2007) e *Maxillaria* (Cabral *et al.*, 2006), entre outros, sugerindo eventos independentes na aquisição desse tipo de heterocromatina.

Evolução do DNA ribossomal na subtribo Laeliinae

Todas as espécies analisadas com FISH no presente trabalho apresentaram um par heteromórfico de sítios de DNAr 45S co-localizados com bandas CMA⁺. Esse heteromorfismo pode ser consequência de deleções e/ou amplificação de DNA satélite das

RONs (Kovarík *et al.*, 2008). Esse padrão de bandas terminais heteromórficos também foi observado em espécies de Maxillariinae (Cabral *et al.*, 2006; Koehler *et al.*, 2008) e ocorreu em todas as espécies de Laeliinae, sendo provável que se trate de uma sinapomorfia dessa subtribo ou talvez para a subfamília Epidendoideae. Em nenhuma das espécies dessa subtribo foi observada variação no número de sítios de DNAr 45S, contrariando o observado em outros grupos de Orchidaceae (Cabral *et al.*, 2006; Moscone *et al.*, 2007; Begum *et al.*, 2009).

Foi observada uma grande variabilidade no número e posição de sítios de DNAr 5S nas espécies analisadas. Esses sítios foram localizados preferencialmente nas regiões proximal. Uma distribuição semelhante foi observada em *Maxillaria discolor* (Cabral *et al.*, 2006) e em *Dendrobium moscatum* (Begum *et al.*, 2009). Contudo nosso trabalho e nos trabalhos desses autores os sítios de DNAr 5S também ocorrem em outras regiões cromossômicas em Laeliinae e em grupos ao relacionados de orquídeas. A maioria das espécies de *Cattleya* apresentou quatro sítios de 5S proximais, com sítios extras deste cistron ribossomal em *C. grandis* e *C. trianae*, nesta última sempre na região terminal. A variabilidade na posição desses sítios observada em *C. trianae* e *C. intermedia* possivelmente ocorreu por eventos recorrentes de translocações e inversões, como observado em diversas secções de *Paphyopedium* (Lan e Albert, 2011). Do ponto de vista estritamente da variação observada nos sítios de DNAr 5S, observa-se uma relação bastante próxima os dois acessos de *C. trianae* analisadas no presente trabalho. Esse tipo de variação, também observadas com bandas ricas em GC, provavelmente represente linhagens divergentes resultantes do isolamento geográfico nos contrafortes andinos.

Os sítios de DNAr 5S observados nos dois acessos de *C. trianae*, foi co-localizado com bandas CMA positivas. Em nossa análise a associação de sítios de DNAr 5S com heterocromatina rica em GC ocorreu apenas em quatro dos seis sítios de um acesso de *C. trianae*. Sítios 5S DNAr associados a heterocromatina CMA⁺ ou a banda C têm sido reportado em outros grupos de plantas como em *Hypochaeris* (Roa *et al.*, 2005), *Quercus* (Zoldos *et al.*, 1999) e *Lilium* (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2003). Em orquídeas esse tipo de associação foi claramente observado em *Maxillaria notylioglossa* (Cabral *et al.*, 2006).

O DNAr 5S é constituído de repeats contendo aproximadamente 120 pares de base separados por um espaçadores não transcrito de tamanho muito variável, normalmente centenas de pares de bases (Gottlob-McHugh *et al.*, 1990). Muito embora esses tipo de DNA possa sofrer mutações, na maioria dos vegetais não se tem observado nenhuma correlação entre

os loci 5S e bandas heterocromáticas. A razão dessa aparente homogeneidade não é bem conhecida, embora em alguns casos a evolução em concerto parece explicar a aparente falta de correlação dos sítos 5S com heterocromatina (ver por exemplo, Cronn, 1996). Contudo, na presente amostra não apenas a composição em pares de base, mas também a localização dos sítos de 5S foi variável. Embora não sendo acompanhada de uma análise de bandas heterocromáticas, a única explicação para a impressionante variação no número, tamanho e localização do DNAr 5S no primitivo gênero *Paphiopedilum*, foi a ampliação desse tipo de sequência, possivelmente mediada por retrotransposons (Lan e Albert, 2011). O isolamento desta sequência e a posterior hibridização *in situ* em uma amostragem mais ampla poderá confirmar em definitivo esta hipótese.

O padrão de quatro sítos de DNAr 5S nas regiões proximais parece ser comum para as espécies do gênero *Cattleya*, porém não foi verificado em outros gênero analisados na presente amostra. Esse padrão parece agrupar *Cattleya* em um clado, o que torna aceitável a inclusão de *C. grandis*, que antes pertencia ao gênero *Laelia*. Porém, ressaltamos a necessidade de aumentar o número de amostra para um melhor esclarecimento das relações entre esses grupos de plantas.

No clado formado por *E. oncidoides*, *P. fragrans* e *S. sickii* o padrão mais freqüente foi a presença de um par de cromossomos com sítos de DNAr 5S proximais. Contudo *E. oncidoides* apresentou dois sítos extra localizados nas regiões paracentroméricas dos braços longos de um par cromossômico. A presença de apenas um par de sítos de DNAr 5S centroméricas parece ser uma característica comum para as espécies desse clado. O surgimento desse par de sítos pode ser uma característica bem ancestral que foi conservada na evolução cromossômica dessas espécies.

Considerações Finais

Nossos dados sugerem que embora a subtribo Laeliinae apresente uma aparente estabilidade de número cromossômico ($2n = 40$), o grupo apresenta uma grande variabilidade

cariotípica quando essa análise é refinada com a utilização de técnicas de bandeamento com fluorocromos e o uso de marcadores cito-moleculares. Esses marcadores cromossômicos são úteis na delimitação de agrupamentos filogenéticos, identificando sinapomorfias, ou mesmo para se investigar melhor as relações taxonômicas (Souza *et al.*, 2010).

Aparentemente, não há relação entre o aumento no número de sítios de DNAr 5S e o aumento do número de cromossomos ou o tamanho do genoma (Lan e Albert, 2011). Para as espécies aqui analisadas é possível verificar isso, pois as espécies que apresentam o mesmo número cromossômico possuem uma variação no número de sítios. Essa condição também tem sido observada para outros grupos de plantas, por exemplo, em espécies de Brassicaceae (Hasterok *et al.*, 2006) e Cyperaceae (Sousa *et al.*, 2011). Esse mesmo padrão de localização de sítios 5S tem sido observado em outros grupos de orquídeas como na subtribo Maxillariinae (Cabral, em preparação) e no gênero *Habenaria* (Felix, 2001). Esse apreciável polimorfismo para sítios de DNA ribossomal (e também para o padrão de bandas CMA/DAPI) poderão constituir ferramentas importantes para entendimento de relações filogenéticas e cariotípicas em orquídeas. No entanto para confirmar presença se faz necessário a análise de uma maior amostra neste e em outros grupos de orquídeas.

Referências Bibliográficas

- Arditti, J.; Clements, G.; Fast, G.; Hadley, G.; Nishimura, G. and Ernst, R. 1982. **Orchid seed germination and seedling culture – A manual**. Pp. 244-370. In: Arditti, J. (ed.) *Orchid biology: reviews and perspectives II*. New York, Cornell University Press.
- Barros e Silva, A. E.; Marques, A. Santos, Karla G. B. and Guerra, M. 2010. **The evolution of CMA bands in Citrus and related genera**. *Chromosome Research*, 18:503–514.
- Begum, R.; Alam, S. S.; Menzel, G.; and Schmidt, T. 2009. **Comparative molecular cytogenetics of major repetitive sequence families of three *Dendrobium* species (Orchidaceae) from Bangladesh**. *Annals of Botany*, p. 1 of 10.

Braga, P. I. S. 1982. **Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina da Amazônia Central**. Acta Amazonica, p. 7.

Cabral, J. S.; Felix, L. P. and Guerra, M. 2006. **Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae)**. Genetics and Molecular Biology, 29, 4, 659-664.

Carvalho, R.; Soares Filho, W.S.; Brasileiro-Vidala, A.C and Guerra, M. 2005. **The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison**. Cytogenet Genome Res 109:276–282.

Conceição, L. P. and Oliveira, A. L. P. C. 2006. **Characterization of the *Epidendrum cinnabarium* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) Occurring in Dunas Do Abaeté-Salvador, BA-Brasil**. Japão: Cytologia, 71(2): 125-129.

Demerico, S. D.; Galasso, I.; Pignone, D. and Scrugli, A. 2001. **Localization of rDNA loci by fluorescent in situ hybridization in some wild orchids from Italy (Orchidaceae)**. Caryologia 54: 31–36.

Chiron, G. R. and Castro Neto, V. P. 2002. **Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley**. Richardiana 2:4-28.

Cronn, R. C.; Zhao, X.; Paterson, A. H. and Wendel, J. F. 1996. **Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeat gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons**. J Mol Evol 42:685-705.

Dressler, R. L. 1981. **The Orchids: natural history and classification**. Harvard University.

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

Felix, L. P. and Guerra, M. 2010. **Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae)**. Botanical Journal of the Linnean Society, 163, 234–278.

Fowlie, J. A. 1977. **The Brazilian bifoliate *Cattleya* and their color varieties**. Azul Quinta Press, Pomona, California. 132p.

Frello, S. and Heslop-Harrison, S. 2000. **Chromosomal Variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) Investigated by *in situ* Hybridization of rDNA and a Tandemly Repeated Sequence**. Annals of Botany 86: 317-322.

Govaerts, R.; Campacci, M. A.; Holland, B. D.; Cribb, P.; George, A.; Kreuz, K. and Wood, J. J. 2009. **World checklist of Orchidaceae**. Kew, UK: Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens. Available at: <http://www.kew.org/wcsp/monocots/> (acessado em 10 de Agosto de 2011).

Hasterok, R.; Wolny, E.; Hosiawa, M.; Kowalczyk, M.; Kulak-Ksiazczyk, S.; Ksiazczyk, T.; Heneen, W. K. and Maluszynska, J. 2006. **Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae**. Annals of Botany 97: 205–216.

Lan and Albert. 2011. **Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in Paphiopedilum, a lady's slipper orchid**. BMC Plant Biology 2011, 11: 126

Koehler, S.; Cabral, J. S.; Whitten, W. M.; Williams, N. H.; Singer, R. B.; Neubig, K. M.; Guerra, M.; Souza, A. P. and Amaral, M. C. 2008. **Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): Species Delimitation and Insights into Chromosome Evolution**. Annals of Botany 102: 491–507.

Kondo, K.; Hoshi, Y. and Tanaka, R. 1994. **Somatic Chromosome Differentiation in *Cypripedium segawai* Masamune and *C. japonicum* Thunberg**. Cytologia 59: 115-120.

Kovarík, A.; Dadejova, M.; Lim, Y. K.; Chase, M. W.; Clarkson, J. J.; Knapp, S. and Leitch, A. R. 2008. **Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics.** *Annals of Botany* 101: 815–823.

Menezes, L. C. 1986. *Cattleya labiata* Lindl. Expressão e Cultura: Rio de Janeiro.

Menezes, L. C. 1994. *Cattleya waneri*. Naturalia Publications: Turriers.

Moore, R. J. ed. 1973. **Index to plant chromosome numbers 1967–1971.** *Regnum Vegetabile* 90: 1–539.

Moscone, E. A.; Matzke, M.A. and Matzke, A. J. M. 1996. **The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco.** *Chromosoma* 105: 231- 236.

Moscone, E. A.; Samuel, R.; Schwarzacher, T.; Schweizer, D. and Pedrosa-Harand, A. 2007. **Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution.** *Chromosome Research* 15: 931-943.

Pabst, G. F. J. and Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis.** Band 1. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 408p.

Pabst, G. F. J. and Dungs, F. 1977. **Orchidaceae Brasiliensis.** Band 2. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 418p.

Pridgeon, A. M, Cribb, P.J., Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds). 2005. **Genera Orchidacearum.** v. 4. Epidendroideae (Part one). Oxford University Press, New York, 672p.

Pires, M. F. O.; Semir, J.; Pinna, G. F. A. M. and Felix, L. P. 2003. **Taxonomic separation of the genera *Prostachea* and *Encyclia* (Laeliinae: Orchidaceae) using leaf and root anatomical features.** *Bot. Journal of Linnean Society* (3): 293-303.

Schweizer, D. 1976. **Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI.** *Chromosoma*, Berlin, v. 58, n. 4, p. 307-324.

Siljak-Yakovlev, S.; Peccenini, S.; Muratovic, E.; Zoldos, V.; Robin, O. and Vallès J. 2003. **Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species**. Plant Syst Evol 236:165-173.

Sousa, A. S.; Barros e Silva, A. E.; Cuadrado, A.; Loarce, Y.; Alves, M. V. and Guerra, M. 2011. **Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the chromosome field hypothesis**. Micron (Oxford. 1993), v. 42, p. 625-631.

SOUZA, L. G. R.; CROSA, O. and GUERRA, M. 2010. **Karyological circumscription of *Ipheion Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae)**. Plant Systematics and Evolution, v. 287, p. 119-127.

Tanaka R. and Kamemoto, H. 1984. **Chromosomes in orchids: counting and numbers**. In: J. Arditti, (eds.). Orchid Biology Reviews and Perspective III. Ithaca: Coenell University Press, p. 324-410.

van den Berg, C. 2008. **New combinations in the genus *Cattleya* (Orchidaceae)**. Neodiversity, Feira de Santana, v. 3, p. 3-12.

van den Berg, C. and Chase, M. W. 2000. **NOMENCLATURAL NOTES ON LAELIINAE—II**. Lindleyana 15(2): 115–119.

van den Berg, C. and Chase, M. W. 2001. **NOMENCLATURAL NOTES ON LAELIINAE—II ADDITIONAL COMBINATIONS AND NOTES**. Lindleyana 16(2): 109–112.

van den Berg C, Higgins W. E., Dressler R. L., Whitten W. M., Soto Arenas A., Culham A., and Chase M. W. 2000. **A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of Nuclear Ribosomal DNA**. Lindleyana, 15: 96 – 114.

van den Berg, C.; Higgins, W.E.; Dressler, R.L.; Whitten, W.M.; Sotoarenas, M. A. and Chase, M. W. 2009a. **A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences**. Annals of Botany, Oxford, v. 104, p. 417-430.

van den Berg, C. 2009b. **Phylogeny and systematics of *Cattleya* and *Sophranitis***. Pages 319–323 In: R.P. Saulea; L.A. Sandow. (Org.). The 19th World Orchid Conference. Miami: American Printing Arts.

Zoldos, V.; Papes, D.; Cerbah, M.; Panaud, O.; Besenborfer, V. and Siljak-Yakovlev. 1999. **Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species**. Theor Appl Genet 99:969-977.

Withner, C. L. 1988. **The *Cattleya* and their relatives. I. The *Cattleyas***. Timber Press, Portland, Oregon. 147p.

Withner, C. L. 1990. **The *Cattleyas* and their relatives. The *Cattleyas***. vol. 1 Timber Press: Portland.

Yamagishi-Costa, J. and Forni-Martins, E. R. 2009. **Hybridization and polyploidy: cytogenetic indications for *Hoffmannseggella* (Orchidaceae) species evolution**. International Journal of Botany, v. 5, p. 93-99.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao Dr. Marcelo Guerra da Universidade Federal de Pernambuco e ao Dr. Reginaldo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por disponibilizar seus laboratórios e ao CNPq pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa.

Tabela 1. Lista de táxons analisados, números de coletor, locais de coleta, números cromossômicos e tipos de bandas fluorescentes mais evidentes e sítios de 45S e 5S.

| Táxon | Coletor | Local | 2n | Bandas mais evidentes | Fig. | 45S | 5S |
|--|------------------------|-------------------------|----|--|-------|----------------|------------------|
| <i>Brassavola</i> R. Br. | | | | | | | |
| <i>B. ceboletta</i> Rchb. | L. P. Felix, 13.253 | | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 2 DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais, 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 1A, 4 | | |
| <i>B. nodosa</i> (L.) Lindl | L. P. Felix, 12725 | Cultivada | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, várias CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentromérica e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 1B, 4 | | |
| <i>B. tuberculata</i> Hook. | L. P. Felix, 12728 | Puxinanã, PB | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, várias CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentromérica e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 1C, 4 | | |
| <i>Cattleya</i> Lindl. | | | 40 | | | | |
| <i>C. grandis</i> (Lindl.) A.A.Chadwick | L. P. Felix, S/N | Milagres, BA | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 2B, 4 | Dois sítios | |
| <i>C. granulosa</i> Lindl. | L. P. Felix, 11963 | Alcaçuz, RN | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 34 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 2C, 4 | | |
| <i>C. guttata</i> Lindl. | L. P. Felix, S/N | Cultivada | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 36 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 2D, 4 | | |
| <i>C. intermedia</i> Graham ex Hook. | L. P. Felix, N/S | Cultivada | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais e várias CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas | 2E, 4 | Dois sítios | Quatro sítios |
| <i>C. labiata</i> Lindl. | L. P. Felix, S/N | Brejo da M. Deus, PE | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 2F, 4 | Dois sítios | Quatro sítios |
| <i>C. nobilior</i> Rchb.f. | L. P. Felix, S/N | Brasília, DF | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 38 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 2G, 4 | | - |
| <i>C. trianae</i> Linden e Rchb.f. | AWZ, 269 | Cultivada | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ centroméricas e 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentromérica | 2H, 4 | Dois sítios | Seis sítios |
| <i>C. trianae</i> Linden e Rchb.f. | L. P. Felix, S/N | Cultivada | 42 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 2I, 4 | Dois sítios | Seis sítios |
| <i>C. walkeriana</i> Gardner | L. P. Felix, S/N | Piracajuba, GO | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 34 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais | 2K, 4 | | |
| <i>C. warneri</i> T.Moore ex R.Warner | L. P. Felix, S/N | Cultivada | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 6 bandas CMA ⁺ /DAPI ⁻ proximais | 2J, 4 | | |
| <i>Encyclia</i> Hook. | | | | | | | |
| <i>E. dichroma</i> (Lindl.) Schltr. | L. P. Felix, 13.298 | | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 2 DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais e várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ intersticiais | 1D, 4 | | |
| <i>E. oncidoides</i> (Lindl.) Schltr. | L. P. Felix, S/N | Triunfo, PE | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 1E, 4 | Dois sítios | Quatro sítios |
| <i>Encyclia</i> sp. | L. P. Felix, | Belém, PA | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 1F, 4 | | |

| | | | | | | | |
|--|------------------------|------------------------------|----|--|--------------------|----------------|-------------|
| | 12658 | | | | | | |
| <i>Isochilus</i> R.Br. | | | | | | | |
| <i>I. linearis</i> (Jacq.) R.Br. | L. P. Felix, N/S | Taquaritinga do Norte, PE | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 1G, 4 | | |
| <i>Laelia</i> Lindl. | | | | | | | |
| <i>Laelia marginata</i> (Lindl.) L.O.Williams | L. P. Felix, S/N | Viçosa, CE | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 32 CMA ⁺ /DAPI ⁻ proximais, várias DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais e cromossomo B | 2 ^a , 4 | Dois sítios | |
| <i>Prosthechea</i> Knowles e Westc. | | | | | | | Seis sítios |
| <i>P. faresiana</i> (Bicalho) W.E.Higgins, | J. P. Castro, 127 | Morro do Chapéu, BA | 80 | 6 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 1H, 4 | | |
| <i>P. fragrans</i> (Sw.) W.E.Higgins | L. P. Felix, 13.390 | Alcaçuz, RN | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais | 1I, 4 | Dois sítios | |
| <i>Scaphyglottis</i> Poepp. e Endl. | | | | | | | |
| <i>S. fusiformis</i> (Griseb.) R.E.Schult. | L. P. Felix, S/N | Bezerros, PE | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 2 DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais e 6 DAPI ⁺ /CMA ⁻ pericentroméricas | 1J, 4 | | Dois sítios |
| <i>S. sickii</i> Pabst. | | Taquaritinga do Norte, PE | 40 | 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ terminais, 4 DAPI ⁺ /CMA ⁻ terminais, 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻ pericentroméricas e 4 DAPI ⁺ /CMA ⁻ proximais | 1K, 4 | Dois sítios | Dois sítios |

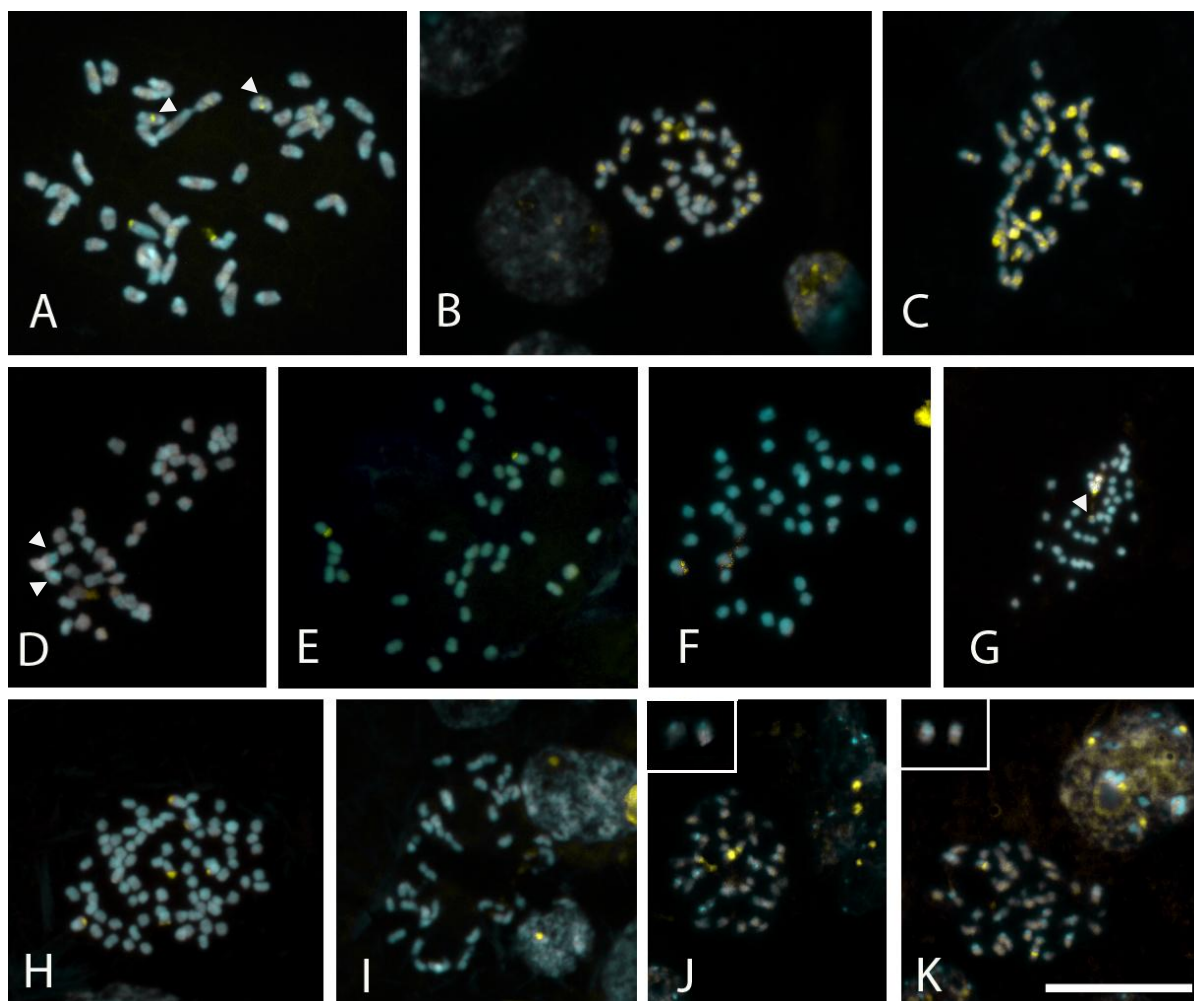


Figura 1: Metáfases mitóticas de *Brassavola ceboletta* (A), *B. nodosa* (B), *B. tuberculata* (C), *Encyclia dichroma* (D), *E. oncidioides* (E), *E. sp* (F), *Isochilus linearis* (G), *Prosthechea faresiana* (H), *P. fragrans* (I), *Scaphyglottis fusiformis* (J) e *S. sickii* (K), mostrando bandas de CMA+ (amarelo) e DAPI+ (azul). Cabeças de setas em D indicam bandas DAPI⁺/CMA⁻ ocupando quase toda a extensão dos braços curtos. Destaque em J e K par cromossômico com bandas DAPI+/CMA⁻. Barra em K corresponde a 10 μ .

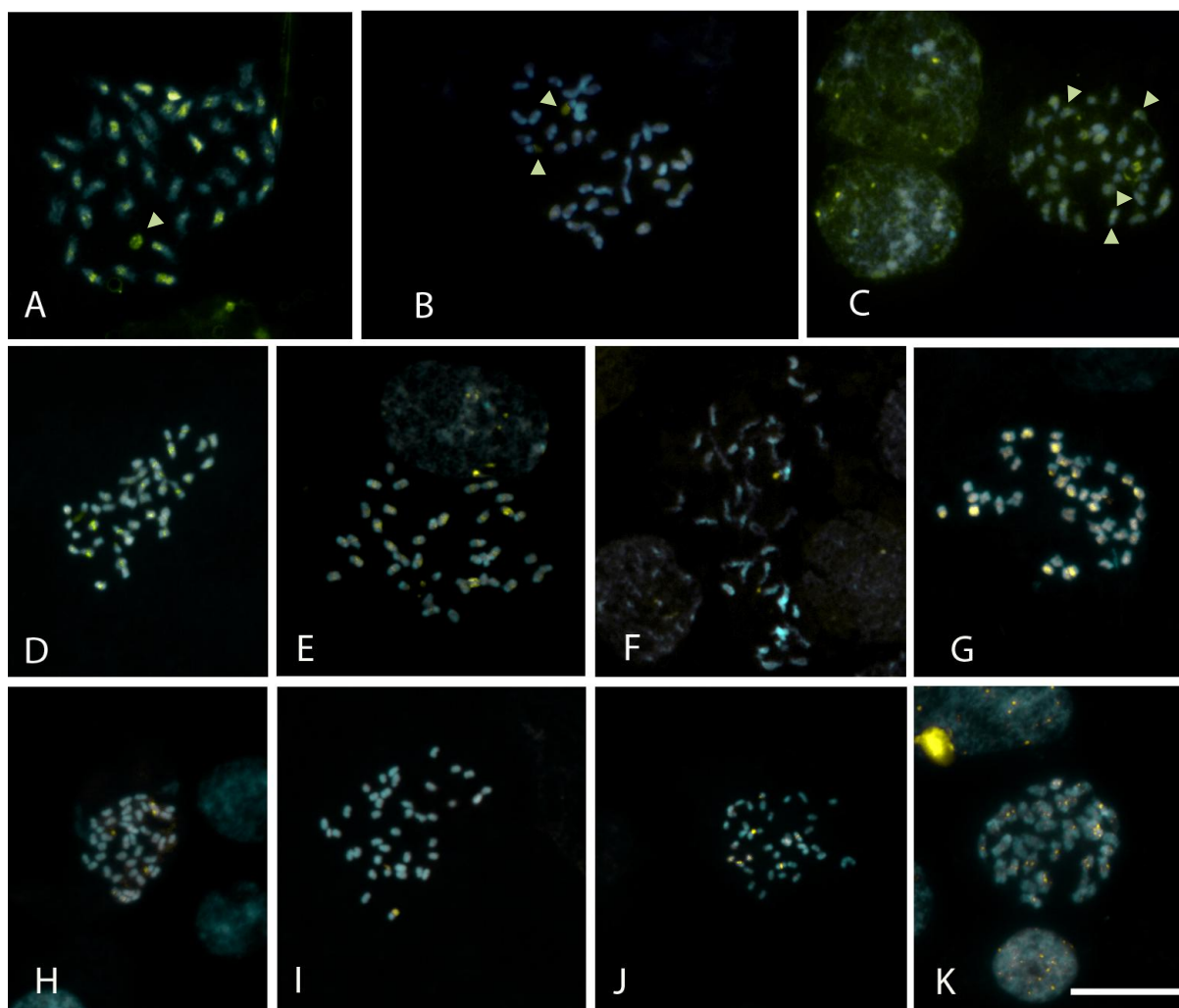


Figura 2: Metáfases mitóticas de *Laelia marginata* (A), *Cattleya grandis* (B), *C. granulosa* (C), *C. guttata* (D), *C. intermedia* (E), *C. labiata* (F), *C. nobillior* (G), *C. trianae* (H) *C. trianae* (I) *C. warneri* (J) e *C. walkeriana* (K), mostrando bandas CMA+ (amarelo) e DAPI+ (azul). Cabeças de setas indicam: Cromossomo B. (A), CMA+/DAPI⁰ (B) e pequenas bandas CMA+/DAPI- pericentroméricas (C). Barra em K corresponde a 10 μ .

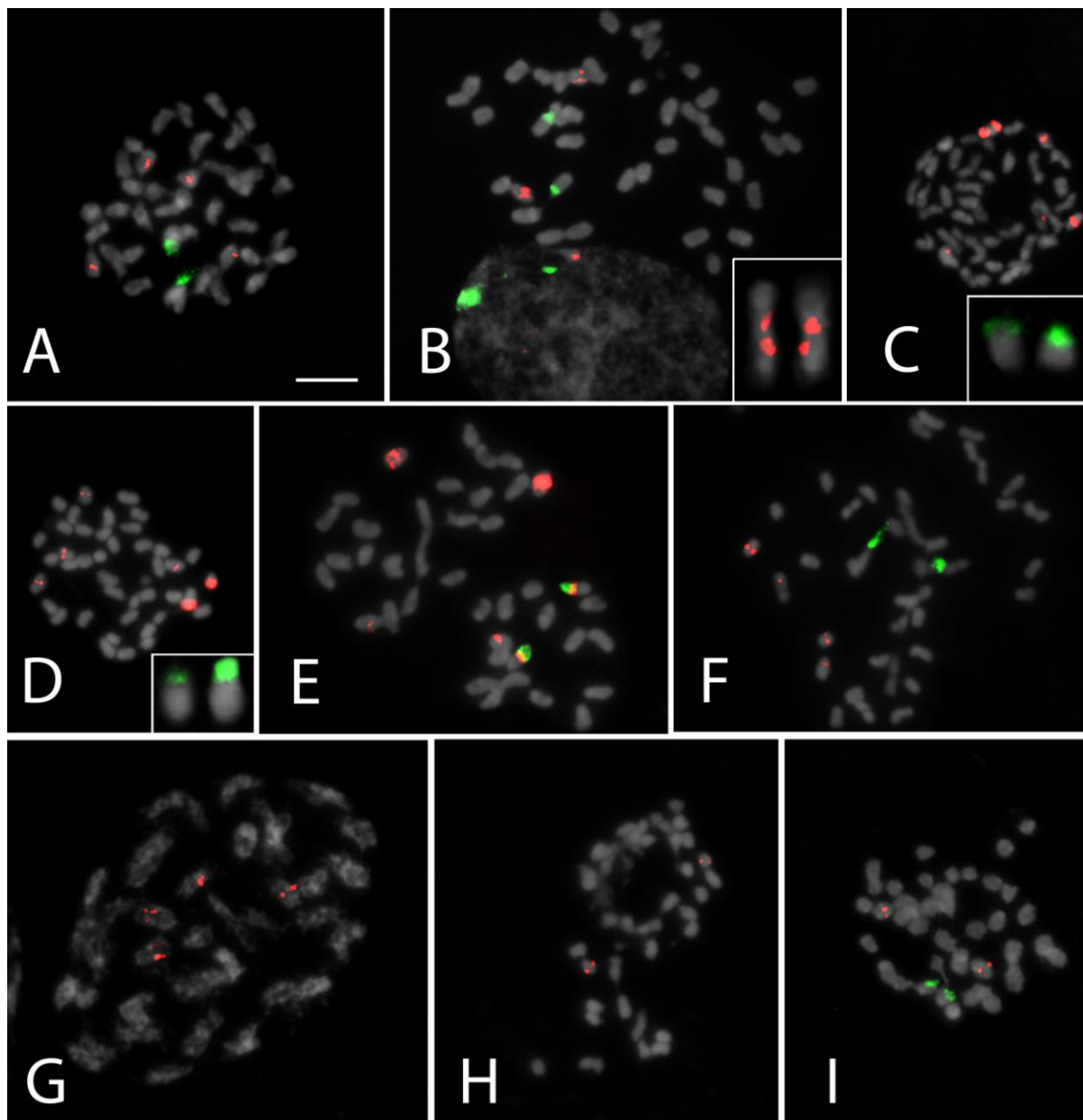
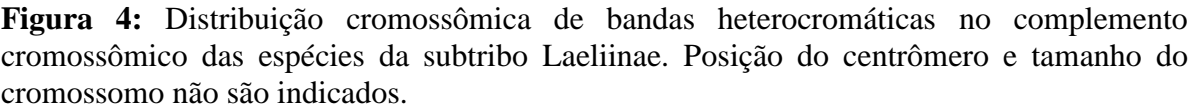


Figura 3: Metáfase mitóticas de *Cattleya labiata* (a), *C. intermedia* (b), *C. trianae* (C), *C. trianae* (D), *C. grandis* (E), *Encyclia oncidioides* (F), *Laelia marginata* (G) *Prosthechea fragrans* (H) e *Scaphyglottis sickii* (I), mostrando sítios de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho). Em destaque cromossomos de outras células, que foram mais bem visualizadas. Barra em A corresponde a 10 μ .



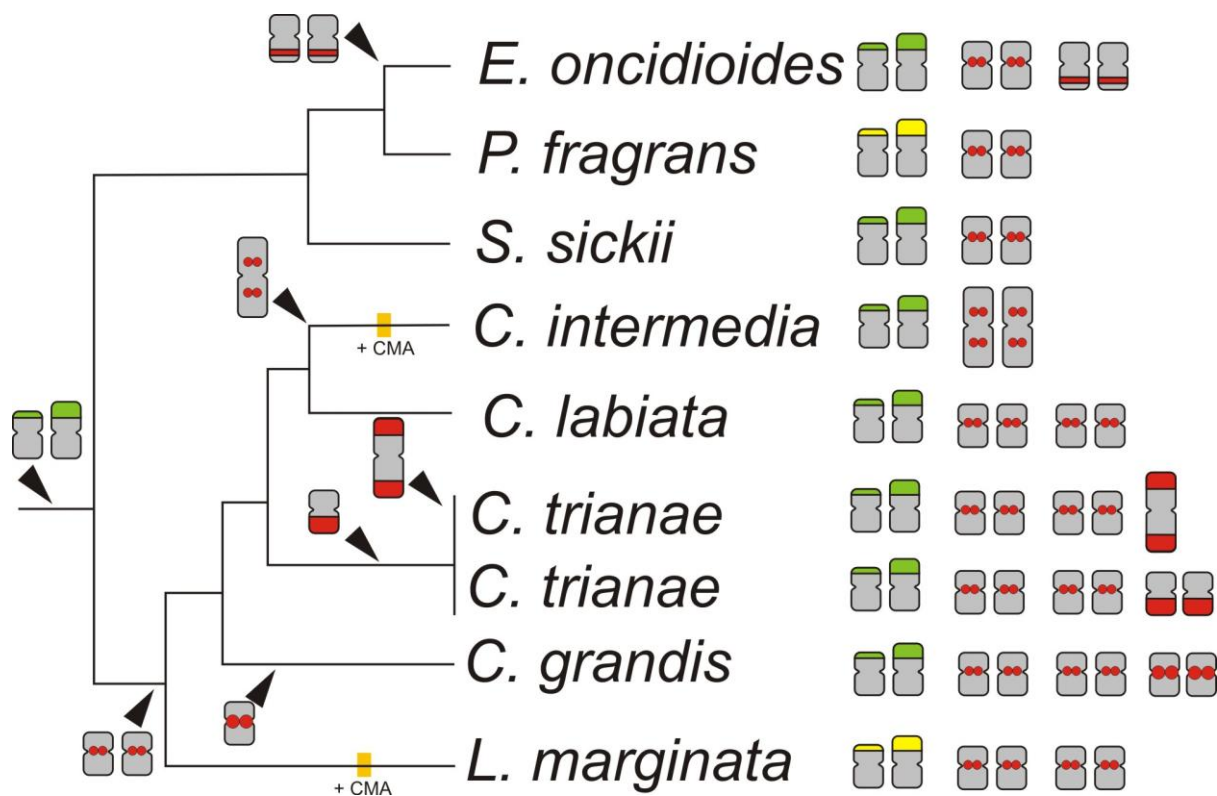


Figura 5: Evolução das bandas CMA (amarelo), sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) e relações filogenéticas nas espécies da subtribo Laeliinae. Árvore modifica de van der Berg (2000).