

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS E CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA NO GÊNERO *CATTLEYA* (EPIDENDROIDEAE: ORCHIDACEAE)

João Victor da Silva Cremm (PIC-UEM), Neide da Silva (participante), Andréa
Beatriz Diverio Mendes (orientador) abdmendes@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas /Maringá, PR.

Ciências Biológicas Genética: Genética Vegetal

Palavras-chave: citogenética, orquídea, hibridação

Resumo:

O gênero *Cattleya* pertence a subtribo Laeliinea (Epidendroideae). A origem de *Cattleya fidelensis* é bastante controversa, mas existe uma hipótese que ela seja um híbrido natural, oriunda do cruzamento das espécies *C. perrinii* (Lindl.) e *C. bicalhoi* (Van den Berg). A análise cromossômica proporciona a compreensão de aspectos da filogenia e pode contribuir significativamente para a elucidação dos possíveis parentais desta espécie. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente na obtenção de cromossomos de *Cattleya fidelensis*, a fim de subsidiar estudos direcionados a determinação do número de cromossomos e do cariótipo desta espécie. Para a obtenção das raízes, sementes maduras de *Cattleya fidelensis* foram germinadas em meio de cultura. Em 3 meses, obteve-se raízes para tratamento. O antimitótico que produziu as melhores metáfases foi a 8-hidroxiquinoleína a 0,002M e o tempo de tratamento mais adequado foi o de 24 horas. As primeiras observações indicam que esta espécie possui em torno de 72 cromossomos, a na sua grande maioria metacêntricos.

Introdução

A família Orchidaceae é composta por cerca de 25.000 espécies e 700 gêneros (CHASE et al., 2015), e no Brasil ocorrem 2.473 espécies e 221 gêneros. As orquídeas são subdivididas em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (SHIRAKI E DIAZ, 2012). Dentre as subfamílias tem-se as tribos: Epidendreae, Vandae, Cymndieae, Malaxideae, Arethuseae, Nervillieae e Triphoreae, com mais de 10 mil espécies distribuídos em 34 subtribos (CHASE et al., 2015). O gênero *Cattleya* pertence a subtribo Laeliinea (Epidendroideae).

A primeira descrição feita de *Cattleya fidelensis* (Van den Berg), foi no ano de 1967 por Pabst que a nomeou *Laelia x fidelensis*. Depois de várias classificações botânicas diferentes, no ano de 2008, foi estabelecido o nome da planta como *Cattleya x fidelensis* (Pabst) por Van den Berg, sendo esta a nomenclatura aceita atualmente. A origem desta orquídea é bastante controversa, entretanto, a hipótese

mais aceita é que ela seja um híbrido natural oriunda do cruzamento entre duas espécies diferentes de orquídeas: *C. perrinii* (Lindl.) e *C. bicalhoi* (Van den Berg). Isto se deve ao fato destas espécies terem sido encontradas na mesma região e possuírem características morfológicas semelhantes.

A análise cromossômica proporciona a compreensão de aspectos da filogenia, taxonomia, evolução cromossômica e melhoramento genético. Dentro da família Orchidaceae, as contagens cromossômicas têm ajudado a compreender as relações filogenéticas. Apenas 2,51% da subtribo Laeliinae é conhecida citogeneticamente. Esta subtribo caracteriza-se por apresentar número básico de cromossomos $x = 20$ e ter evoluído principalmente por poliploidia (FELIX e GUERRA, 2010). O gênero *Cattleya* apresenta uma variação cromossômica entre $2n = 40$ e $2n = 80$ (TANAKA E KAMEMOTO, 1984). A falta de estudos citogenéticos constitui uma lacuna para os mecanismos de elucidação da evolução cariotípica e origem destas plantas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente na obtenção de cromossomos de *Cattleya fidelensis*, a fim de subsidiar estudos direcionados a determinação do número de cromossomos e do cariótipo desta espécie.

Materiais e métodos

Para a obtenção das raízes foram usados dois meios de cultura. As radículas com 0,5 a 1,0 cm de comprimento foram coletadas e tratadas com dois antimitóticos (colchicina 2%, 8-hidroxiquinoleína 0,002M) em diferentes tempos de exposição (12, 18 ou 24 horas) em temperatura ambiente. Após os tratamentos, as radículas foram lavadas em água destilada com três trocas de 5 min cada e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de álcool etílico P.A.: 1 parte de ácido acético glacial) com 3 trocas a intervalos de 15 min cada e armazenadas em geladeira por 24h. Após este período, radículas foram transferidas para etanol 70%, e estocadas em geladeira até o momento de utilização.

Para a determinação do tempo de hidrólise em HCl1N a 60°C foram testados tempos 15 e 20 minutos.

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento, com coloração em Fuelgen a 2% e orceína acética a 2%. As lâminas serão observadas em microscópio óptico e a captura das imagens mais representativas foi feita em microscópio óptico Olympus CX 31, câmera SC 30 pelo programa AnalySIS *getIT*.

Resultados e Discussão

Para a obtenção das raízes, sementes maduras de *Cattleya fidelensis* foram germinadas em meio de cultura. Inicialmente, o meio de cultura utilizado foi o KC (KNUDSON, 1946) suplementado com 10% de banana. O tempo descrito para obtenção de raízes de *Cattleya* em meio de cultura é de três a quatro meses (FRANCO, 1942). Passado este período, como não houve germinação das sementes, foi testado um segundo meio de cultura. Este novo meio de cultura consistiu em uma composição de água destilada (1L), açúcar comercial (20g),

carvão ativado (5g), mistura comercial de reagentes (4mL), 15% de banana e ágar (5g). Em 3 meses, obteve-se raízes para tratamento.

A técnica de semeadura utilizada foi por meio de seringas de 20 mL acopladas com agulhas veterinárias de grosso calibre. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial a 2% e em seguida lavadas 4x em água destilada e transferidas para seringas com soro fisiológico para serem distribuídas em frascos. Um total de 12 frascos, cada um contendo 50mL de meio de cultura e 3 a 5mg de sementes, foram mantidos em casa de vegetação em temperatura ambiente (25 a 30°C), sem luz artificial até o terceiro mês.

Após três meses, cada frasco gerou em torno de 20 a 25 raízes. As raízes com 0,5 a 1,0 centímetro foram tratadas com 8-hidroxiquinoleína a 0,002M ou colchicina a 2%, nos tempos de 12, 18 ou 24 horas. O antimitótico que produziu as melhores metáfases foi a 8-hidroxiquinoleína a 0,002M e o tempo de tratamento mais adequado foi o de 24 horas. Estas metáfases apresentaram os cromossomos mais condensados sendo possível identificar a sua morfologia o que permitirá uma melhor descrição do cariótipo desta espécie.

Entre os tempos de hidrólise em HCl 1N testados, o melhor tempo foi o de 15 minutos, uma vez que, no tempo de 20 minutos houve degradação completa do material. Apesar da hidrólise ter se mostrado eficiente sugere-se a utilização de tratamento enzimático para melhor degradação das raízes maiores (1,0 cm de comprimento).

Embora não tenha sido possível uma perfeita determinação do protocolo eficiente para obtenção de cromossomos mitóticos em *Cattleya fidelensis*, as primeiras observações indicam que esta espécie possui em torno de 72 cromossomos. De acordo com Tanaka e Kamemoto, 1984 o gênero *Cattleya* apresenta uma variação cromossômica entre $2n = 40$ e $2n = 80$. Outra observação preliminar é a presença de uma maioria de cromossomos metacêntricos.

Conclusões

Embora exista um protocolo para obtenção de cromossomos mitóticos considerado eficiente para diversas espécies, sempre há a necessidade de se fazer adaptações para a espécie em estudo. A obtenção de boas metáfases é essencial para o estudo cromossômico e cariotípico.

Referências

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; BERG, C.; SCHUITMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 151-174, 20 set. 2020.

FELIX, L. E.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendriodeae (Orchidaceae). **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 163, p. 234-278, 25 jun. 2010

FRANCO C. M. Propagação de Orquídeas por Sementes - Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas Instituto Agrônomo. **Bragantia**, Campinas, v. 2, n. 7, p. 249-257, 1942.

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

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, Palm Beach, v. 14, p. 214-217, 1946.

SHIRAKI, J. N.; DIAZ, E. M. Orquídeas. **Secretaria do Verde e do Meio Ambiente**. 2012. Disponível em: < <https://pt.slideshare.net/aderocruz/aprenda-nesse-curso-tudo-sobre-orquidea> >. Acesso em: 14 de fev. de 2019.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosome in orchids: counting and number. *In*: J. Ardini (eds). **Orchid Biology Reviews and Perspective III**. Ithaca: Cornell University Press, p. 324-410, 1984.