

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

LETICIA OLIVEIRA CLAUDINO

**Estudo da diversidade genética em *Cattleya forbesii* Lindl.
(Orchidaceae), propagadas *in vitro*, utilizando isoenzimas**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO de 2011

LETICIA OLIVEIRA CLAUDINO

**Estudo da diversidade genética em *Cattleya forbesii* Lindl.
(Orchidaceae), propagadas *in vitro*, utilizando isoenzimas**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolin.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO de 2011

Aos meus pais, Ernesto Morbi Claudino e Fátima Aparecida Oliveira Claudino, por tanto amor e proteção.

A todos os meus verdadeiros amigos.

Ao meu companheiro, Adriano, por sempre guiar meus passos e por permitir que pessoas tão especiais fizessem parte dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu imenso amor e fidelidade em minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM) pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida e apoio financeiro.

À minha orientadora, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela Orientação segura e competente deste trabalho, por sua dedicação incansável, pelo seu apoio, incentivo e sua amizade.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela atenção dedicada na análise detalhada deste trabalho, pelas valiosas sugestões e amizade.

Às professoras doutoras Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, Sandra Aparecida de Oliveira Collet, Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre, e ao professor doutor Erasmo Renesto, por compartilharem seus conhecimentos, contribuindo, assim, para a realização desta pesquisa.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela companhia e dedicação nas disciplinas cursadas, em especial, à Betty Cristiane Khun, pelo apoio, ajuda e paciência.

Aos meus amigos dos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese e Genética de Animais, pelos mais variados motivos possíveis, tanto pela ajuda em momentos de estudo, quanto pela alegria proporcionada nos momentos de descontração.

Às minhas amigas de infância, por todo carinho, apoio, incentivo e tantos momentos compartilhados.

Especialmente, à minha família, papai ernesto, mamãe Fátima, minhas irmãs Juliana e Lílian, aos meus queridos sobrinhos Raphael e Gabriel, por todo carinho e por tantos momentos maravilhosos que compartilhamos.

A todos, muito obrigada.

BIOGRAFIA

Letícia Oliveira Claudino, filha de Ernesto Morbi Claudino e de Fátima Aparecida Oliveira Claudino, nasceu em Santa Cruz do Rio Pardo, estado de São Paulo, aos vinte e um dias do mês de janeiro de 1985.

Cursou o Ensino Fundamental, de 1992 a 1999, na Escola Estadual Sinharinha Camarinha, na cidade de Santa Cruz do Rio Pardo, estado de São Paulo.

No ano de 2000, na Organização Aparecido Pimentel de Educação e Cultura (OAPEC), também na cidade Santa Cruz do Rio Pardo, estado de São Paulo, iniciou o Ensino Médio, concluindo-o no ano de 2002.

Graduou-se em Ciências Biológicas – Licenciatura, em fevereiro de 2007, na Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), em Ourinhos, estado de São Paulo.

Concluiu, em fevereiro de 2008, o Curso de Especialização em Biotecnologia Aplicada à Agroindústria, na Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, na Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, realizando estudos na área de Análise Genética Vegetal.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais da família Orchidaceae.....	3
2.1.1. Aspectos morfológicos das orquídeas.....	4
2.1.2. Sementes.....	7
2.2. Aspectos gerais das espécies do gênero <i>Cattleya</i> Lindl.....	8
2.2.1. <i>Cattleya forbesii</i> Lindl.....	11
2.3. Comportamento populacional em orquídeas.....	12
2.4. Isoenzimas para estimar diversidade genética em orquídeas.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Material vegetal.....	18
3.2. Extração das isoenzimas.....	19
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sistema PAGE: <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>).....	20
3.4. Eletroforese das isoenzimas Malato Desidrogenase e Isocitrato Desidrogenase.....	22
3.5. Análise da variabilidade genética.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Meio básico – formulação “C” de Knudson (Knudson, 1946).....	18
Quadro 2 -	Solução utilizada para extração das isoenzimas, de plântulas de <i>C. forbesii</i>	20
Quadro 3 -	Volumes das soluções estoque utilizadas para o preparo dos géis de separação para as isoesterases de <i>C. forbesii</i>	21
Quadro 4 -	Volumes das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis de empilhamento para as isoesterases de <i>C. forbesii</i>	22
Quadro 5 -	Sistemas tampões empregados para eletroforese em gel de amido de <i>C. forbesii</i>	23
Quadro 6 -	Número de alelos por <i>locus</i> (n_a^*), número de alelos por <i>loci</i> polimórficos (n_e^*), Heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) em plântulas, germinadas <i>in vitro</i> de <i>C. forbesii</i>	33
Quadro 7 -	Distribuição dos alelos para os diferentes <i>loci</i> de isoesterases e a indicação dos <i>loci</i> que estão ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg para as plântulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>C. forbesii</i>	34
Quadro 8 -	Parâmetros de diversidade genética para as plântulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>C. forbesii</i>	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Detalhes da flor de orquídea do gênero <i>Cattleya</i> (Medeiros, 2011).....	5
Figura 2 -	Flores <i>Cattleya forbesii</i>	11
Figura 3 -	Plântulas de <i>C. forbesii</i> após seis meses de manutenção em meio de cultura Knudson.....	19
Figura 4 -	Em A (1 a 5) gel de poliacrilamida 13 % utilizado para separar as isoesterases em <i>C. forbesii</i> , em B (6 a 13) gel de poliacrilamida 12 %. Todas essas amostras foram extraídas com a solução de extração contendo 5 % de PVP-40	26
Figura 5 -	Gel de Poliacrilamida a 12 % utilizado para separar as isoesterases de plântulas (produzidas de sementes) de <i>C. forbesii</i> . O fracionamento foi realizado por 6 h e 30 min com 200 Volts na fonte de eletroforese. Foram evidenciados 7 <i>loci</i> para as isozimas esterases.....	27
Figura 6 -	Diferentes alelos e fenótipos observados para os <i>loci Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, e Est-6</i> , separados em gel de poliacrilamida 12 % para <i>C. forbesii</i>	28
Figura 7 -	alato Desidrogenase de <i>C. forbesii</i> . A. Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas utilizando a condição 2, TRIS/Histidina pH 7,0. B. Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas com a condição 1, Tris-Citrato pH 7,0 e 50 Volts no gel por 14 horas de migração. C. Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas com a condição 1, Tris-Citrato pH 7,0 e 70 Volts no gel e 14 horas de migração. D. Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas com a condição 3, Citrato de Morfolina, pH 7,5 e 60 Volts no gel com 14 horas de migração	29
Figura 8 -	Isoenzimas Isocitrato Desidrogenase de <i>C. forbesii</i> fracionadas utilizando a condição 3, Citrato Morfolina, pH 7,5 e 60 volts no gel e 14 horas de migração.....	30
Figura 9 -	Esquema dos três diferentes alelos e os diferentes fenótipos observados para o <i>loci Idh</i> , para <i>C. forbesii</i>	30

Figura 10 - Diferentes alelos e fenótipos observados para os *loci* s-MDH e *mt*-MDH, para *C. forbesii*. Para *mt*-MDH o genótipo AB pode conferir o fenótipo de duas ou de três bandas31

RESUMO

CLAUDINO, Letícia Oliveira, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2011. **Estudo da diversidade genética em *Cattleya forbesii* Lindl. (orchidaceae), propagadas *in vitro*, utilizando isoenzimas.** Professora orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Professores Conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado, Maria Cláudia Ruvolo Takasusuki e Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

A proposta no presente estudo foi estabelecer a metodologia para estudo de Esterase (EST; EC 3.1.1.1), utilizando o sistema PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis), Malato Desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) e Isocitrato Desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.42), com o objetivo de investigar a diversidade genética em plântulas de *Cattleya forbesii* formadas a partir de sementes germinadas *in vitro*, sobre meio nutritivo Knudson (1946). Diferentes condições de extração e de fracionamento para os três sistemas isoenzimáticos foram testadas. Para a extração, a condição mais adequada foi a maceração das amostras de plântulas inteiras e com a solução de extração preparada com 5 % de PVP-40. A condição mais adequada para o estudo de α - e β -esterases em *C. forbesii* foi com o fracionamento realizado em géis de poliacrilamida 12 % por 6 horas e 30 minutos. Para as isoenzimas MDH e IDH, o melhor fracionamento foi em gel de amido 16 %, preparado com tampão contendo ácido cítrico 0,04 M, titulado com morfolina [N-(3-AMINOPROPYL)-MORFOLINE], para pH 7,5 com voltagem de 60 V, nas extremidades dos géis, por 14 horas. Para as condições padronizadas, foram revelados 10 *loci* (sete para EST, dois para MDH e um para IDH), conferindo um polimorfismo de 80 % para a população de *C. forbesii* estudada. O número médio de alelos por *locus* e por *locus* polimórfico para *C. forbesii* foi de 3,1250 e de 2,5788 respectivamente. Os alelos de sete dos oito *loci* analisados não se apresentaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e somente o *locus Mdh-1* manteve-se em equilíbrio. O valor médio de Fis para os oito *loci* analisados foi de 0,2870, indicando que existe uma deficiência de heterozigotos para a população analisada. Um excesso de heterozigotos foi observado para os *loci s-MDH* e *mt-MDH*, sugerindo um significado fisiológico para esta condição. A base genética das plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*, usando o meio KC foi ampla (80 % de polimorfismo) indicando que o cultivo *in vitro* produz mudas de

orquídeas com uma ampla variabilidade genética. O sistema de germinação e cultivo *in vitro* das sementes de *C. forbesii* não estabeleceu uma pressão de seleção capaz de indicar uma redução na diversidade genética da espécie, podendo ser considerado adequado para produzir mudas para reposição de estoques a serem cultivados na natureza, ou com a perspectiva de realizar cruzamentos preferenciais para estimular a produção de híbridos em programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Cattleya forbesii*, isoenzimas, diversidade genética, germinação *in vitro*.

ABSTRACT

CLAUDINO, Letícia Oliveira, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, March de 2011. **Genetic diversity in *Cattleya forbesii* Lindl. (orchidaceae), disseminated *in vitro*, by isozymes.** Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado, Maria Cláudia Ruvolo Takasusuki and Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

Current analysis establishes a methodology for the study of Esterase (EST; EC 3.1.1.1), Malato Dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) and Isocitrate Dehydrogenase (IDH; EC 1.1.1.42) by PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) system to investigate the genetic diversity in *C. forbesii* shoots formed from *in vitro* germinated seeds. Different extraction and fractioning conditions were tested for the three isoenzyme systems. In the case of extraction, the most adequate condition occurred when plant samples were macerated whole and extraction solution prepared with 5 % PVP-40. The most adequate condition for studying α - and β -esterases in *C. forbesii* occurred by fractioning in polyacrylamide gel 12 % during 6 h and 30 minut. The best fractioning in the case of isoenzymes MDH and IDH, occurred in starch gel 16 % prepared with a buffer with citric acid 0.04M titred with morpholine [N-(3-AMINOPROPYL)-MORPHOLINE] for pH 7.5 at a 60 V voltage at the gel extremities during 14 h. Ten *loci* (seven for EST, two for MDH and one for IDH) were identified within the context of standardized conditions. This provided an 80 % polymorphism for the *C. forbesii* population under analysis. Mean number of alleles per *locus* and per polymorphic *locus* for *C. forbesii* were respectively 3.1250 and 2.5788. Alleles of seven of the eight loci analyzed were not distributed according to Hardy-Weinberg equilibrium. Only locus *Mdh-1* maintained the equilibrium. Mean Fis value for the eight loci analyzed was 0.2870 and indicated heterozygote deficit in the population. Since excess of heterozygotes has been reported for loci *s-Mdh* and *mt-MDH*, this fact suggested a physiological significance for such a condition. The genetic basis of the plants grown from seeds germinated *in vitro* with KC medium was broad (80 % polymorphism) and indicated that *in vitro* culture may produce orchids with an extensive genetic variety. Germination system and *in vitro* culture of *C. forbesii* seeds failed to establish selection pressure that may indicate a decrease in the species's genetic diversity. The system may be adequate to

produce shoots for stock reposition to be cultivated in nature or for preferential crossings to stimulate the production of hybrids in improvement programs.

Key words: *Cattleya forbesii*, isoenzymes, genetic diversity, *in vitro* germination.

1. INTRODUÇÃO

A Família Orchidaceae é uma das maiores entre as angiospermas, sendo constituída por cerca de 800 gêneros e 35.000 espécies, as quais estão distribuídas em quase todo o mundo (Dressler, 1993). No Brasil, onde são encontrados cerca de 200 gêneros, com cerca de 3.500 espécies, as orquídeas são encontradas em todos os estados, e estão presentes em maior frequência na Mata Atlântica, que se estende de Pernambuco ao Rio Grande do Sul. (Souza e Lorenzi, 2005).

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e com grande valor comercial. Esta família é uma das maiores representantes das plantas que possuem flores, englobando quase um sétimo deste grupo (Suttlewort, 1997). De acordo com Zanenga-Godoy e Costa (2003), as orquídeas do gênero *Cattleya*, em razão da estrutura de suas flores, estão associadas a muitos outros gêneros e híbridos de flores exuberantes e, portanto, são as orquídeas mais comercializadas na atualidade, o que lhes confere uma considerável importância econômica.

Os dados disponíveis na literatura especializada, no que se refere a exportações de mudas de orquídeas brasileiras, são do ano de 2004 (Junqueira e Peetz, 2004). Acumulando vendas superiores a US\$ 122 mil, as maiores ocorrem para os Estados Unidos (24,3%), Japão (21,0%), Alemanha (20,3%), Reino Unido (12,7%) e Hong Kong (11,9%), além de outros onze países. As mudas de orquídeas exportadas foram procedentes principalmente do Mato Grosso do Sul (50,2%), de Santa Catarina (37,0%), Rio Grande do Sul (7,9%) e Rio de Janeiro (4,9%).

A propagação das orquídeas em condições naturais é baixa ou nula, pois a germinação de suas sementes depende da associação com micorrizas, mas a demanda de mudas é alta. Para solucionar este problema e oferecer mudas em larga escala e com alta qualidade fitossanitária, independentemente da época do ano (Soares et al., 2009), foi desenvolvida a micropropagação *in vitro* (Larkin e Scowcroft, 1981). Esta metodologia trouxe a possibilidade de reprodução dessas plantas para fins de conservação e comercialização (Braga, 1987). A micropropagação ou a propagação *in vitro* é uma forma de aumentar a produção de mudas com qualidade genética e conservar espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (Stancato et al., 2001; Martini et al., 2001). A micropropagação vem sendo utilizada com sucesso desde 1922, quando o pesquisador Lewis Knudson obteve a

germinação assimbiótica de sementes de orquídeas (Faria e Stancato, 1998) e o meio KC, formulado por Knudson (1946), vem sendo o mais recomendado, até o presente, para a germinação das sementes da maioria das espécies epífitas de orquídeas tropicais.

O cultivo *in vitro* de espécies vegetais pode gerar alteração na taxa de diversidade, fator que pode ser constatado com a análise molecular das plantas. Uma forma de acompanhar e monitorar a cultura de tecido pode ser a avaliação do produto de seus genes, no caso isoenzimas. Na literatura especializada, não existem ainda registros de estudos da diversidade genética em populações de *Cattleya forbesii*. Por isso, a proposta do presente estudo foi padronizar o emprego de isoenzimas para analisar a diversidade genética em suas plântulas provenientes de sementes, germinadas *in vitro*, sobre meio nutritivo KC, sem a adição de reguladores de crescimento vegetal.

A estimativa da diversidade genética nas plântulas de *C. forbesii* cultivadas *in vitro* foi feita utilizando as isoenzimas Esterases, as quais compreendem um conjunto de enzimas geneticamente distintas e amplamente distribuídas entre os seres vivos, podendo desempenhar funções diferentes em um organismo e possuindo em comum a propriedade de catalisar a hidrólise de ésteres. Além de peptídeos, amidas e haletos (Walker e Mackness, 1983), as enzimas Malato Desidrogenase encontra-se em todas as células eucarióticas como duas isoenzimas: mitocondrial (mt-MDH) e citoplasmática (solúvel, s-MDH) (Rocha e Ting, 1970 e 1971) e Isocitrato Desidrogenase importante no metabolismo de carboidratos, e catalisa a descarboxilação oxidativa de isocitrato em α -cetoglutarato. A expectativa deste estudo foi mostrar o nível de polimorfismo para as isoenzimas estudadas, verificando se este é alto e mostrar que o sistema de alta qualidade fitossanitária, independentemente da época do ano (Soares et al., 2009) não estabelece pressão de seleção com redução da diversidade genética da espécie *C. forbesii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da família Orchidaceae

A família Orchidaceae pertence ao grupo das fanerógamas, contando com 12 a 35 mil espécies (Fiveash, 1974; Sanford, 1974; Alphonso, 1975; Hunt, 1984; Heywood, 1985; Dressler, 1993), contribuindo com cerca de 10% de todas as espécies de plantas com flores do planeta (Dressler, 1981). As orquídeas podem ser classificadas conforme seus habitats vegetativos como: epífitas, saprófitas, terrestres e rupícolas ou rupestres, dentre outros (Silva e Milaneze, 2004).

O recente reconhecimento do ambiente da copa das árvores das florestas tropicais como um dos celeiros da biodiversidade do planeta tem incentivado estudos que procuram o entendimento de processos ligados à comunidade epifítica, destacando o seu papel na funcionalidade dos ecossistemas (Oliveira, 2004). O epifitismo é responsável por parte significativa da diversidade que faz das florestas tropicais úmidas um dos mais complexos ecossistemas da biosfera, constituindo até 50% do total de espécies vasculares. A capacidade destas florestas em sustentar grande número de animais pode ser atribuída ao substrato e sustento provido pelas epífitas, e por sua respectiva capacidade de retenção de nutrientes de chuva, neblina e partículas em suspensão (Nadkarni, 1986). As plantas epífitas ocupam troncos e ramos de árvores, onde a escassez de água e de nutrientes é frequente, e para isso as espécies de orquídeas epífitas possuem adaptações morfoanatômicas singulares, sendo comuns os tecidos especializados para a reserva de água, tanto nas folhas quanto nas raízes e nos pseudobulbos (Silva e Milaneze, 2004).

As orquídeas estão presentes em todas as áreas com vegetação no planeta e sua maior diversidade é observada nas regiões tropicais (Berg, 1998). De acordo com Rego e Faria (2002), no Brasil, as orquídeas estão distribuídas em todos os estados, mas em maior quantidade na Mata Atlântica, que vai de Pernambuco até o Rio Grande do Sul.

Segundo Moraes et al. (2002), uma característica marcante da família Orchidaceae é a apresentação de um desenvolvimento vegetativo muito lento e na natureza a multiplicação por sementes também é muito demorada e pouco eficaz. Com isso, o cultivo de sementes em meio de cultura *in vitro* permite acelerar o

processo e elevar as taxas de germinação, tornando-se possível sua propagação em larga escala, favorecendo a comercialização das mesmas.

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. São plantas herbáceas perenes, bastante diversificadas quanto ao tamanho, forma e cor das flores (Singh, 1992). Os gêneros *Cattleya* e *Laelia* apresentam elevado valor econômico e são apreciados nos mercados brasileiros e internacionais, destacando o potencial do Brasil no cultivo de orquídeas (Silva, 1986).

As espécies do gênero *Cattleya* são de ocorrência natural no Brasil e muito procuradas no mundo inteiro como plantas ornamentais, criando a necessidade de se desenvolverem técnicas de propagação para atender ao mercado e contribuir com a reposição de espécies ameaçadas de extinção (Silva et al., 2005).

Quando Kersten e Silva (2001) analisaram as epífitas vasculares em floresta da planície litorânea da Ilha do Mel, Paraná, Brasil, descreveram que as plantas com maior valor de importância epifítica para o estudo foram as orquídeas (41%), seguidas por espécies das famílias Polypodiaceae (18,12%) e Bromeliaceae (15,71%). Estes autores também constataram que, na região, a espécie *C.forbesii* mostrou preferência pelo estrato de 2 a 4 metros da floresta analisada, sendo considerada uma holoepífita.

2.1.1. Aspectos morfológicos das orquídeas

A família Orchidaceae apresenta características muito especializadas, que lhe conferem um alto poder de adaptação a diferentes ambientes (Benzing et al., 1982). Suas flores exibem particularidades marcantes e estas particularidades desempenham importante papel na atração do agente polinizador, o que, conseqüentemente, favorece a polinização cruzada (Dressler, 1993). Três aspectos primários, em combinação, distinguem as flores de orquídeas das flores de outras famílias: possuem a coluna, fusão dos órgãos femininos (pistilos) e masculinos (estames), dentro de uma só estrutura localizada no centro da flor; possuem políneas, massas de grão de pólen, altamente compactadas encontradas na maioria das espécies e transportadas inteiras pelos polinizadores (Pacini e Hesse, 2002); e as flores das orquídeas possuem três sépalas, uma dorsal e duas laterais, três pétalas, duas laterais e uma modificada, chamadas labelo (Figura 1). Portanto, estas

plantas possuem zigomorfia e o labelo apresenta diferentes funções (Van Der Pijl e Dodson, 1966). Logo abaixo da antera única, na maioria das espécies, está a cavidade estigmática, o órgão receptivo feminino, o qual apresenta superfície viscosa, onde são depositadas as políneas no momento da polinização. Na porção distal da coluna, encontra-se o ovário, que, após a fecundação, desenvolve-se numa cápsula carnosa, com dezenas de milhares de minúsculas sementes (Campos, 1996; Paula e Silva, 2002). A maioria das espécies de orquídeas produz flores hermafroditas.



Figura 1 - Detalhes da flor de orquídea do gênero *Cattleya* (Medeiros, 2011).

Segundo Olatunji e Nengim (1980), as orquídeas epífitas representam o grupo de plantas mais especializado sob o ponto de vista ecológico, visto que possuem adaptações morfológicas e funcionais que lhes permitem sobreviver em ambientes xerofíticos, garantindo a absorção e a conservação eficientes de nutrientes e de água. Os pseudobulbos, o velame das raízes, a ocorrência de células com barras de espessamento no mesofilo e o metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassulaceas) são adaptações estruturais e fisiológicas

altamente eficientes na biologia destas plantas (Scatena e Nunes, 1996; Oliveira e Sajo, 1999). Além do velame, córtex parenquimatoso com exoderme e endoderme, com variados graus de espessamentos nas paredes celulares das raízes, compõe o padrão anatômico básico das raízes das orquídeas (Morales et al., 2002).

Na maioria das orquídeas, as folhas se dispõem disticamente no caule e apresentam venação paralela. Em muitas espécies, a única folha é sustentada pelo caule aéreo ou pseudobulbo (Dressler, 1981), os quais auxiliam na manutenção do balanço hídrico da planta em situações de escassez de água. As folhas apresentam diferentes formas, podendo ser membranosas, coriáceas ou carnosas (Braga, 1987).

As orquídeas são adaptadas para a polinização cruzada (Dressler, 1981). O grupo de animais que poliniza as orquídeas inclui pássaros, mariposas, borboletas, uma grande variedade de moscas, numerosas abelhas e em menor número ocorre a polinização por vespas. Os Hymenopteras dão conta de polinizar 60% da família (Van Der Pijl e Dodson, 1966). Desde a época de Darwin, a polinização das orquídeas tem intrigado os biólogos, devido a sua diversidade e complexidade. Existe uma ampla extensão de especificidades de interação planta-polinizador para esta família (Tremblay, 1992). Na Europa, a orquídea *Herminium monorchis* foi visitada e polinizada por 69 espécies de insetos, incluindo membros de 4 diferentes ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera (Nilsson, 1979). Por outro lado, a alta especificidade de polinizador em espécies de orquídeas é muito mais comum e cerca de 60% das espécies de orquídeas apresentam o registro de um único polinizador (Tremblay, 1992).

Mais do que qualquer outro grupo de plantas, as orquídeas evoluíram sistemas elaborados para atrair os polinizadores. Existem pelo menos três tipos de recompensas florais entre as orquídeas. O tipo mais comum é a nutricional, consumida pelo polinizador ou por sua larva. Estas espécies são quase todas nectaríferas, apesar de algumas produzirem óleo (Steiner, 1989) e muitas oferecem pólen (Kocyan e Endress, 2001) ou pseudopólen (Davies et al., 2000). O segundo grupo é específico para orquídeas polinizadas por machos das abelhas euglossine. Estas abelhas são atraídas pela fragrância floral que elas coletam e de forma desconhecida atraem a fêmea (Eltz et al., 1999). O terceiro tipo não tem sido bem documentado, no qual espécies de *Maxillaria* produzem ceras e resinas (Dondon et al., 2002) que são coletadas por vespas e abelhas (Braga, 1977) e usadas para a construção de ninhos.

Apesar da maioria das orquídeas oferecer algum tipo de recompensa para o polinizador, muitas orquídeas não oferecem qualquer recompensa. Cerca de um terço de todas as Orchidaceae são deceptivas (Van Der Pijl e Dodson, 1966; Nilsson, 1992). A decepção pode ser em função do aspecto da flor ser semelhante ao alimento para as larvas do polinizador ou a flor possuir semelhança de nectários de flores de outras famílias, ou ser igual à fêmea do inseto polinizador (Nilsson, 1992). Portanto, as estratégias para a polinização compreendem os mais complexos sistemas de artifício conhecido no grupo das plantas com flores (Tremblay et al., 2005; Jersáková et al., 2006). Assim, os sistemas de polinização podem desempenhar um importante papel na manutenção de orquídeas terrestres raras. Apesar da reprodução vegetativa ser bem conhecida em orquídeas e ser uma importante estratégia para superar os déficits de produção de sementes (Dixon, 1985), a reprodução sexuada é o principal meio pelo qual os organismos mantêm a diversidade genética em sua progênie (Sipes e Tepedino, 1995).

Dentre as orquídeas, existem também espécies que se autopolinizam espontaneamente (autógamas). Em geral, espécies autógamas apresentam flores de cores pálidas e estruturas secretoras (nectários) reduzidas ou até ausentes. Com frequência, modificações morfológicas da coluna facilitam a autopolinização (Cozzolino e Widmer, 2005; Jersáková et al., 2006).

Alguns outros aspectos distinguem a biologia reprodutiva das orquídeas de outras espécies, incluindo o atraso no desenvolvimento do óvulo (Wirth e Withner, 1959), o grande número (de 4 a 20 milhões) de pequenas sementes semelhantes a pó, contidas em uma só cápsula (Arditti e Ghani, 2000), e sua dependência de associação com fungo para a germinação e o estabelecimento das plântulas (Rasmussen e Whigham, 2002; Selosse et al., 2002).

2.1.2. Sementes

A estrutura e o tamanho das sementes estão entre as características mais impressionantes das orquídeas. Cada cápsula contém milhares de sementes (Arditti, 1967), aproximadamente 0,4 milímetros de comprimento, são polinizadas por um único doador de pólen e se apresentam como progênies de irmãos completos. Estas sementes possuem pouca reserva nutricional (Pierik, 1990) a qual é baseada em lipídeos (Milaneze, 1997).

As sementes não possuem endosperma, possuem embrião e uma testa translúcida, apresentam grandes espaços internos cheios de ar que lhes permitem flutuar (Arditti e Ghani, 2000). Como elas são pequenas e leves e apresentam esta especialização, é bem aceito que o vento é o principal dispersor, levando-as por longas distâncias (Ackerman e Ward, 1999). As sementes de orquídeas também podem ser levadas nas penas das aves e no pêlo dos animais (Arditti e Ghani, 2000). Esta característica poderia produzir altas taxas de fluxo gênico, fator importante para altos níveis de variação genética dentro das populações e baixo grau de diferenciação entre as populações (Cozzolino e Widmer, 2005). Entretanto, em estudos recentes de estrutura genética espacial para 10 espécies de orquídeas terrestres, foi sugerido que existe um fluxo gênico limitado, apesar das sementes serem pequenas como pó, com alto potencial de dispersão. Os estudos de estrutura genética de populações para estas 10 espécies sugerem que as sementes caem ao redor da planta mãe, embora mais estudos se façam necessários para que uma conclusão definitiva seja estabelecida (Peakall e Beattie, 1996; Chung et al., 1998, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b; Machon et al., 2003; Jacquemyn et al., 2006; Wallace, 2006; Chung e Chung, 2007; Chung e Nason, 2007).

As sementes de orquídeas são pequenas e não contêm endosperma, por isso a germinação destas e o estabelecimento das plântulas na natureza são impossíveis sem as relações simbióticas com os fungos endomicorrizicos (Dressler, 1981; Warcup, 1981). Mesmo com a dispersão das sementes para longas distâncias, existe uma limitação, pois estas não poderiam colonizar estas áreas sem a presença dos fungos. Após as sementes terem sido liberadas e germinarem, mas antes de formar qualquer órgão, é formado o protocormo que funciona como um órgão que armazena os produtos da micofagia que são translocados (Rasmussen, 1995). O nome de protocormo foi dado pelo botânico francês Bernard, pois esta estrutura apresenta na fase inicial de desenvolvimento o formato cônico ou oval, pode ou não apresentar clorofila e pêlos (Milaneze, 1997).

2.2. Aspectos gerais das espécies do gênero *Cattleya* Lindl

Cattleya Lindl. é o gênero de Orchidaceae exclusivamente neotropical mais amplamente cultivado. Ele abrange aproximadamente 120 espécies, principalmente epífitas e, mais raramente, rupícolas e terrícolas (Pabst e Dungs, 1975; Chase et al.,

2003; Van Den Berg, 2008). Do ponto de vista sistemático, o gênero se insere na subfamília Epidendroideae Lindl., tribo Epidendreae Kunth, subtribo Laeliinae Benth (Chase et al., 2003; Van Den Berg, 2008; Van Den Berg et al., 2009). A delimitação atual de *Cattleya* é um pouco diferente da tradicional (Cogniaux, 1898; Hoehne, 1942; Rambo, 1965; Pabst e Dungs, 1975), mas encontra forte suporte em estudos filogenéticos baseados em dados moleculares (Van Den Berg, 2008; Van Den Berg, et al., 2009). Hoje, o gênero *Cattleya* incorpora espécies antes pertencentes aos gêneros *Sophronitis* Lindl., *Laelia* Lindl. e *Eumannos* P. Campos Porto e A.C. Brade, bem como todas as espécies de gêneros recentemente segregados, tais como *Hadrolaelia* (Schltr) Chiron e V.P. Castro, *Dungsia* Chiron e V.P. Castro, *Hoffmannseggella* H.G. Jones, *Chironiella* Braem, *Microlaelia* Chiron e V.P. Castro e *Schluckebieria* Braem (Van Den Berg, 2008; Van Den Berg et al., 2009). A separação entre os dois grupos era feita com base no número de políneas (8 em *Laelia* e quatro em *Cattleya*) (Van Den Berg e Chase, 2004), o que, segundo Dressler (1993), resultou em uma classificação artificial. Dressler (1993) sugeriu que as lelias da seção *Cattleyodes* estavam na verdade mais aparentadas com *Cattleya* e que deveriam ser inseridas neste último gênero, mas estava ciente de que tal decisão taxonômica poderia gerar grande rejeição por parte dos cultivadores.

Mas os primeiros resultados de estudos filogenéticos, incluindo orquídeas Laeliinae brasileiras, foram realizados com estudos baseados em sequências ITS (Van Den Berg et al., 2000). As orquídeas antes incluídas no gênero *Laelia* apresentaram grande similaridade com o gênero *Sophronitis* (Van Den Berg et al., 2000; Van Den Berg e Chase, 2000), sendo incluídas nele. Os estudos realizados por Van Den Berg (2008) e Van Den Berg et al. (2009), utilizando marcadores moleculares, tanto nucleares quanto de cloroplasto, demonstraram que o gênero *Sophronitis* está inserido dentro de *Cattleya*. Estes autores relatam que um grande número de espécies de orquídeas brasileiras antes designadas como *Laelia* ou *Sophronitis* agora são designadas de *Cattleya*, algumas espécies inclusive foram originalmente descritas como *Cattleya*.

Para o Brasil, são citadas de 64 a 77 espécies de *Cattleya* (Pabst e Dungs, 1975; Van Den Berg, 2008). Estas plantas apresentam características muito especializadas, que lhes conferem elevado poder de adaptação a diferentes ambientes (Benzing et al., 1982). Outro fator que garante o sucesso deste gênero é a presença de particularidades marcantes em suas flores, as quais desempenham

importante papel na atração do agente polinizador, o que conseqüentemente favorece a polinização cruzada (Dressler, 1993).

Estudos da biologia floral e da polinização em populações naturais de espécies de *Cattleya* apontam que abelhas da subtribo Meliponine e Euglossine são responsáveis pela polinização da espécie. Sabe-se também que a autocompatibilidade e compatibilidade interespecífica são encontradas em várias espécies de *Cattleya* (Stort, 1983; 1986).

Segundo Benzing et al. (1982), a baixa frequência de polinização e os grãos de pólen reunidos em polineas podem limitar a produção de sementes em orquídeas. Em plantas autocompatíveis resultantes de autopolinização pode também reduzir a produção de sementes, mas nem sempre isto é refletido no conjunto de frutos. Estudos realizados com autopolinização e com polinização cruzada para 69 espécies descrevem que, para 29% destas espécies, o conjunto de frutos foi o mesmo, não havendo diferenças para o tipo de polinização. Para o conjunto restante, a polinização cruzada foi melhor. Em geral, parece que autopolinização não tem grande efeito no conjunto de frutos produzidos por orquídeas que não possuem um mecanismo de autoincompatibilidade.

Por outro lado, a autopolinização parece reduzir a produção de sementes em orquídeas. A maioria dos dados disponíveis descreve a porcentagem de embriões de sementes maduras nos frutos em plantas que foram cruzadas artificialmente e que foram autopolinizadas. Stort e Martins (1980) avaliaram a formação de embrião em 14 espécies de *Cattleya* não autógamas do Brasil. Para a comparação de frutos produzidos entre as plantas autopolinizadas e as de polinização cruzada, foi observada uma média de 15,3% de sementes com embriões no primeiro caso e 47,5% para a polinização cruzada. Apesar do conjunto de sementes obtidas por polinização natural ser muitas vezes melhor do que o de polinização manual, raramente alcança 100% (Camargo e Stort, 1973; Stort e Pavanelli, 1986; Pintaúdi et al., 1990). Estudos feitos por Stort e Martins (1980) com a espécie *C. aurantiaca* (Bateman), que é uma autógama, mostraram que o número de embriões formados para autopolinização foi maior que quando a polinização cruzada foi realizada. No primeiro caso foram formados 79,5% em comparação com 62,8% para a fecundação cruzada.

O gênero *Cattleya* é o de maior importância da família, pois apresenta um elevado valor ornamental. Em função disto, todas as espécies têm sido coletadas

intensamente na natureza para suprir a demanda do mercado. A alta frequência com a qual vem ocorrendo essa procura tem levado esta espécie a uma redução e consequente desaparecimento de várias populações e assim várias espécies apresentam-se ameaçadas de extinção (Cruz et al., 2003). Segundo Suzuki 2011, as orquídeas são plantas exigentes e especializadas e por isso sofrem com as interferências nas florestas primitivas. Na maioria dos casos, não conseguem se manter numa mata secundária. Isso pode ser constatado em muitos fragmentos florestais do estado de São Paulo, ricos em árvores, mas sem diversos gêneros de epífitas (plantas que usam árvores como suporte, sem serem parasitas). Um dos indicadores de saúde de uma mata, hoje, é a presença de orquídeas e outras epífitas.

2.2.1. *Cattleya forbesii* Lindl

Cattleya forbesii é uma espécie epífita, encontradas em árvores, pedras e arbustos, próximos a córregos e na beira-mar, apresentando em média 2-5 flores por inflorescência, com 10-12,5 centímetros, sépalas e pétalas verde pálido e lábio castanho rosado com amarelo no centro (Figura 02) (Groves, 2009) em razão de seu sistema vegetativo. O gênero *Cattleya* é dividido em duas categorias: plantas monofoliadas e plantas bifoliadas, sendo a *C. forbesii* um exemplo de planta bifoliada (Araújo, 2009).



Figura 2 - Flores *Cattleya forbesii*.

2.3. Comportamento populacional em orquídeas

O sistema de cruzamento é considerado um dos fatores mais importante na determinação da variabilidade genética em espécies vegetais (Hamrick et al., 1979; Hamrick, 1982; 1989; Hamrick e Godt, 1989) e na sobrevivência de uma espécie a longo prazo (Falk e Holsinger, 1991). A perda de variação genética pode reduzir a capacidade de uma população em se adaptar a mudanças ambientais (Hamilton, 1982), podendo levá-la à extinção.

A diversidade genética é a matéria-prima para a evolução adaptativa das espécies. A perda de variação genética está associada à dispersão genética limitada, com depressão por endogamia e com perturbações mediadas pelo homem. Como consequência da perda desta variabilidade genética, é observada a diminuição da capacidade das populações para adaptar-se às mudanças ambientais tanto de caráter abiótico como biótico, bem como é observada a redução da sua flexibilidade em resposta a patógenos e herbívoros (Barrett e Kohn, 1991; Rajora et al., 2000; Lowe et al., 2005; Degen et al., 2006).

As orquídeas são geralmente autocompatíveis e as barreiras para a autogamia ocorrem geralmente antes da polinização (Van Der Pijl e Dodson, 1966; Dressler, 1981; 1993; Borba e Semir, 1999). No entanto, as barreiras genéticas (ou seja autoincompatibilidade) têm sido encontradas em algumas espécies de orquídeas. Barreiras genéticas estão geralmente associadas com espécies polinizadas por insetos que permanecem nas flores ou inflorescência por longo tempo, comportamento que promove geitonogamia (Christensen, 1992; Pedersen, 1995). As barreiras para a hibridização entre espécies de orquídeas geralmente são mecânicas (ou seja, de prepolinização) e espécies relacionadas são potencialmente interférteis (Dodson, 1962; Van Der Pijl e Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993; Borba e Semir, 1998, 1999; Borba et al., 1999). Assim, a família das orquídeas apresenta uma grande diversidade genética, a qual é atribuída, em parte, pela polinização cruzada (Darwin, 1885; Catling, 1990). Porém, muitas espécies de orquídeas, cerca de 5 a 20%, realizam autofecundação (Catling, 1990).

As orquídeas exibem uma grande variedade de atributos biológicos e ecológicos, tais como estratégias reprodutivas, tamanho de população, especificidades de habitats, grau de isolamento de população, padrão de distribuição e extensão geográfica (Arditti, 1992; Dressler, 1993; Forrest et al., 2004). Entretanto,

muito pouco é conhecido sobre os níveis e padrões de variação genética nas espécies da família Orchidaceae.

De acordo com a literatura, tem sido documentada a falta total ou níveis extremamente baixos de variação genética para as orquídeas terrestres (Scacchi et al., 1991; Bornbusch et al., 1994; Case, 1994; Sun, 1997; Ramsey e Stewart, 1998; Chung et al., 2007). Dependendo da localização, os níveis de diversidade genética em uma espécie de orquídea variam substancialmente (Bornbusch et al., 1994; Case et al., 1998; Wong e Sun, 1999; Gustafsson, 2000). Alguns autores têm atribuído a falta de variação genética a diversos fatores: populações pequenas e isoladas, natureza dispersa de muitas populações e endocruzamentos, associado com fluxo gênico limitado (Chung e Chung, 2007).

Muitas orquídeas terrestres são historicamente raras e ocorrem em pequenas populações, isoladas espacialmente (Tremblay et al., 2005), isto é resultado de fatores que incluem o estreitamento de exigências ecológicas, necessidade de fungos associados à germinação, e acontecimentos históricos (Case, 1994; Aagaard et al., 1999; Kennedy e Walker, 2007). Esse isolamento tende a limitar o fluxo de genes, o que aumenta a força de deriva genética, resultando em perda da diversidade genética dentro das populações e originando um elevado grau de diferenciação entre as populações (Sun e Wong, 2001; Trapnell et al., 2004; Chung e Chung, 2007).

Por outro lado, Cozzolino e Widmer (2005) têm descrito que as orquídeas de regiões temperadas mantêm uma substancial variação genética, provavelmente como resultado do alto potencial do fluxo gênico, pois tais populações, muitas vezes, são grandes. Em paralelo com estas evidências, os níveis de diferenciação genética em populações variam substancialmente entre espécies e também em populações da mesma espécie (Scacchi et al., 1991; Bornbusch et al., 1994; Hollingsworth e Dickson, 1997; Case et al., 1998; Wong e Sun, 1999; Gustafsson, 2000; Squirrell et al., 2001; Brzosko e Wroblewska, 2003; Forrest et al., 2004; Tremblay et al., 2005). Como as orquídeas produzem sementes muito pequenas, elas são facilmente transportadas a longas distâncias pelo vento (Arditti e Ghani, 2000). Esta característica produz alta taxa de fluxo gênico, um fator importante para manter altos níveis de variação genética dentro das populações e baixos graus de diferenciação genética entre populações.

Um dos fatores que pode explicar a ampla extensão de diferenciação entre as populações de orquídea é a variância, causada pela escala espacial de esquema de amostragem entre os estudos (Forrest et al., 2004). A escala espacial de muitos estudos da estrutura genética de populações de orquídea é da ordem de centenas de quilômetros (grandes escalas geográficas). Neste caso, processos evolutivos que ocorrem entre/dentro de populações locais vizinhas pode ter desaparecido, por exemplo, interação entre deriva genética local e fluxo gênico, padrão e extensão de dispersão de sementes e pólen e inferência do fluxo gênico e colonização (Trapnell e Hamrick, 2004); e variação espacial em estrutura genética de populações (Saenz-Romero et al., 2001; Chung et al., 2002; Dutech et al., 2005; Hardy et al., 2006).

Assim, o fracasso para detectar estrutura genética das populações não demonstra necessariamente sua ausência, pois a estruturação pode ocorrer em escala espacial que são menores ou maiores do que aquelas estudadas. Para se obter um melhor entendimento da dinâmica evolutiva de populações de plantas, é razoável investigar a estrutura genética de populações em termos de escala espacial, ou em uma grande escala geográfica (Trapnell et al., 2004). As evidências são de que muitas orquídeas terrestres são relativamente raras e ocorrem em pequenas e isoladas populações. Tal isolamento contribui para a interrupção de fluxo gênico, o qual aumenta a eficácia da deriva genética, resultando em baixos níveis de diversidade dentro de populações e um alto grau de diferenciação entre populações (Forrest et al., 2004; Tremblay et al., 2005).

2.4. Isoenzimas para estimar diversidade genética em orquídeas

As bases para estudar isoenzimas utilizando eletroforese já estão estabelecidas desde 1957 (Mcmillin, 1983; Stebbins, 1989), quando Hunter Mohler descobriu estas proteínas. Em 1959, Markert e Moller introduziram o conceito de isoenzimas e as definiu como sendo as múltiplas formas moleculares de uma determinada proteína que mantém a mesma especificidade enzimática (Buth, 1984). Isto significa que as formas variantes da enzima que está presente no mesmo indivíduo têm funções idênticas ou semelhantes. Este marcador possibilitou o estudo de genética de populações, permitindo estimativas quantitativas precisas da variabilidade genética. Estas estimativas são baseadas em parâmetros da estrutura molecular dos produtos primários dos genes.

Um novo conceito foi elaborado por Prakash (Buth, 1984), que denominou as formas alélicas de um mesmo *locus* e passou a chamá-los de alozimas, para diferenciar do termo isoenzimas, os polímeros produzidos a partir de monômeros codificados por diferentes *loci*. O desenvolvimento das formas para quantificar distância genética ou coeficientes de similaridade (Lukasová, 1985) permitiu as comparações dos dados de isoenzimas e estes parâmetros foram utilizados para os estudos comparativos de diferentes táxons.

O uso das isoenzimas como marcador baseia-se na premissa de que diferenças na sua mobilidade em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas sequências de DNA que codificam sua sequência de aminoácidos. Em adição, estas diferenças são geneticamente herdáveis. Como este marcador é codominante e possui penetrância completa, é utilizado com grande êxito para estimar os níveis e entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais. Também tem sido útil no estudo do fluxo gênico entre populações e processos de hibridização natural, bem como na dispersão de espécies e filogenias. E, ainda, na análise da ligação gênica com caracteres mono e poligênicos e na identificação de variedades e avaliação de germoplasma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

As evidências de múltiplas formas de uma enzima, em vegetal, já datam desde os anos 50 (Mcmillin, 1983). Entretanto, o número de estudos do controle gênico de isoenzimas em plantas ainda é muito pequeno em comparação ao de animais (Werth, 1985). Isto se deve, provavelmente, ao fato de que, em plantas, são comuns problemas relacionados à extração de proteínas, uma vez que elas podem ser inativadas e, desta forma, não serem visualizadas no gel, ou o seu padrão de atividade pode estar alterado apresentando baixa atividade. Estes problemas ocorrem em razão da liberação de substâncias como fenóis e a produção de quinonas, capazes de inativar as proteínas em solução (Loomis, 1974). Deste modo, durante o isolamento das isoenzimas de plantas, há a necessidade de remover os compostos fenólicos e outros produtos secundários tão rápido quanto possível. Isto é contornado pela adição de agentes absorventes ou protetores, que podem competir com as proteínas da planta em reação aos fenóis e às quinonas e, simultaneamente, prevenir a oxidação realizada pelos fenóis (Loomis, 1974; Wendel e Weeden, 1989; Kephart, 1990).

Embora haja dificuldades para extração de isoenzimas em vegetais, a técnica tem sido aplicada com sucesso para a classificação taxonômica de várias famílias,

como poaceae (Johnson et al., 1967; Duvall e Biesboer, 1989), cucurbitaceae (Pasha e Sen, 1991) e fabaceae (Misset e Fontanelle, 1992). Além disso, este método tem alcançado grande sucesso na identificação de variedades e cultivares e no estabelecimento da diversidade genética em plantas de *Vitis vinifera* (Altube et al., 1992), *Lolium rigidum* (Bravi et al., 1994), *Hevea brasiliensis* (Leconte et al., 1994), *Saccharum spp* (Orasmo e Machado, 2003), *Manihot esculenta* Crantz (Resende et al., 2000) e *Glycine max* (Pascale et al., 1994).

Dentre as várias isoenzimas utilizadas como marcadores moleculares, estão as Esterases (EST; EC 3.1.1.1) que são um conjunto de enzimas geneticamente distintas e amplamente distribuídas entre os seres vivos, podendo desempenhar funções diferentes em um organismo, além de possuir, em comum, a propriedade de catalisar a hidrólise de ésteres, além de peptídeos, amidas e haletos (Walker e Mackness, 1983).

Parece não haver registros na literatura especializada de estudos da especificidade ao substrato das enzimas Esterases *in vivo*, mas uma grande variedade de substratos é hidrolisada por elas *in vitro*, sendo utilizados para caracterizá-las em diferentes espécies. Os substratos ésteres de naftil são comumente empregados para evidenciar isoenzimas Esterases na eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). No sistema PAGE, as isoenzimas α - e β - esterases são identificadas e caracterizadas por suas preferências *in vitro*, pelos substratos α -naftil acetato e β - naftil acetato, respectivamente (Johnson et al., 1966; Steiner e Johnson, 1973). A utilização destes substratos, acoplados ao emprego de corantes histoquímicos, proporciona uma coloração diferencial para as α - e β - esterases.

As isoenzimas Esterases foram caracterizadas por um alto grau de polimorfismo e por isso foram amplamente investigadas em abordagens da genética de populações (Kahler e Allad, 1970; Tanksley e Rick, 1980; Kahler, 1981; Rebordinos e De La Veja, 1989).

A isoenzima Malato Desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) catalisa a interconversão de L-malato para oxaloacetato, utilizando a nicotinamida adenina (NAD) como uma coenzima. Malato Desidrogenase é encontrada em todas as células eucarióticas como pelo menos duas isoenzimas: mitocondrial (mt-MDH) e citoplasmática (solúvel, s-MDH). Alguns trabalhos têm demonstrado uma isoenzima a mais da Malato Desidrogenase, sendo esta uma isoenzima localizada em microcorpos de planta (Rocha e Ting, 1970; 1971). Procariontes contêm apenas

uma forma desta isoenzima. Oxaloacetato desempenha um papel crucial em muitas vias metabólicas, incluindo as etapas do ciclo do ácido tricarbóxico. Apesar de isoenzimas Malato Desidrogenase de tecidos de plantas superiores terem sido objeto de muitas investigações (De Jong e Olson, 1972; Rocha e Ting, 1970; 1971; O'sllivan e Wedding, 1972), pouco se sabe sobre a distribuição e a função destas isoenzimas em várias plantas.

A MDH foi isolada a partir de diversas fontes, incluindo eubactérias, arqueas, fungos, plantas e mamíferos, e de organelas subcelulares, tais como mitocôndrias, cloroplastos, glioxissomos e peroxissomos. Malato Desidrogenase são enzimas multiméricas, constituídas por subunidades idênticas, geralmente organizadas como dímeros ou tetrâmeros com pesos moleculares variando de 30 e 35 kDa (Banaszak e Bradshaw, 1975; Sundaram et al., 1980).

Em orquídeas, a eletroforese em gel de amido vem sendo muito utilizada para analisar a diversidade genética entre e dentro populações de *Epipactis thunbergii* de regiões distintas na Coréia do Sul (Chung e Chung, 2007). Foram utilizados 15 sistema isoenzimáticos, em gel de amido, para análise da diversidade genética em populações muito isoladas de *Amitostigma gracile* (Chung e Park, 2008). Sun e Wong (2001), utilizando 11 sistemas isoenzimáticos em gel de amido, conseguiram analisar a diversidade genética em três espécies de orquídeas *Zeuxine gracilis*, *Z. strateumatica* e *Eulophia sinensi*. Também foram estudados os efeitos do tamanho da população e do manejo florestal sobre a diversidade genética e estrutural de *Orchis mascula* e para isso foi realizada a análise de isoenzimas em gel de amido (Jacquemyn et al., 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os experimentos com as plântulas de *C. forbesii* foram realizados no Laboratório de Cultivo de Orquídeas do Museu Dinâmico Interdisciplinar (Bloco O-33) e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese (Bloco H-67, sala 17) da Universidade Estadual de Maringá – PR.

Foram analisadas 100 plântulas de um mesmo fruto natural (irmãos completo), com aproximadamente um ano de cruzamento. O fruto foi recolhido e levado para o Laboratório de Cultivo de Orquídeas do Museu Dinâmico Interdisciplinar. A cápsula de *C. forbesii* foi aberta para a retirada das sementes, as quais foram armazenadas em refrigerador comum, durante aproximadamente 6 meses.

Visando a determinar a viabilidade das sementes, foi realizado o teste do tetrazólio, que se fundamenta na alteração da coloração dos tecidos da semente em presença de uma solução de sal de tetrazólio, o qual é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando num composto denominado formazan, com coloração vermelha-carmim. Os tecidos mortos ou muito deteriorados apresentaram-se descoloridos (Fogaça et al., 2006).

Para a germinação, as sementes foram embebidas em água destilada durante 24 horas e, após este período, passaram por um processo de assepsia com hipoclorito de sódio comercial a 15 %.

Quadro 1 - Meio básico – formulação “C” de Knudson (Knudson, 1946)

Nitrato de cálcio – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1 g/L
Fosfato monobásico de potássio – KH_2PO_4	0,25 g/L
Sulfato de magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
Sulfato de amônia – $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	0,50 g/L
Sulfato ferroso – $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g/L
Sulfato de manganês – $\text{Mn}(\text{SO}_4) \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,0075 g/L
Sacarose	20 g/L
Ágar	6 g/L
Polpa de banana nanica	100 g/L

O meio de cultura básico utilizado foi a formulação “C” de Knudson (Knudson, 1946) (Quadro1), modificado pela adição de 6 g de agar (HIMEDIA, “Agar Agar, Type 1”) e 100 g/L de polpa de banana nanica. Antes da autoclavagem, o pH do meio de cultura foi ajustado para $5,0 \pm 0,1$. Após autoclavar os frascos com meio de cultura durante 20 minutos em 1 atm de pressão e $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, as sementes foram inoculadas no meio para germinação e mantidas em temperatura de $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, com iluminação contínua proporcionada por lâmpadas fluorescentes “luz do dia”, de 40 Watts. Após as plântulas *in vitro* atingirem 1 cm de altura (Figura 03), elas foram utilizadas para a padronização das condições de estudo para as isoenzimas Esterase, Malato Desidrogenase e Isocitrato Desidrogenase.



Figura 3 - Plântulas de *C. forbesii* após seis meses de manutenção em meio de cultura Knudson.

3.2. Extração das isoenzimas

As plântulas com aproximadamente 1 cm crescidas em meio Knudson foram utilizadas como amostras. Estas plântulas foram homogeneizadas com solução de extração gelada, em microtubos para microcentrífuga, utilizando a proporção de 40 μL para 60 mg de plântula. A solução de extração foi preparada com tampão fosfato 1,0 M pH 7,0, PVP-40 5 % ou 7,5 %, EDTA 1,0 mM, β -mercaptoetanol 0,5 % e glicerol 10 % (solução 1). Uma segunda solução (solução 2), contendo os mesmos componentes da solução anterior acrescido de ácido ascórbico (50 mM),

metabissulfito de sódio (10 mM) e Ditioneitol (DTT 10 mM) foi preparada e utilizada para extrair as enzimas Malato Desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37). As amostras foram maceradas em microtubos com bastão de vidro em banho de gelo e, após este procedimento, foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Jouan MR23i, durante 30 minutos com 12.000 r.p.m. em 4 °C. O sobrenadante de cada amostra macerada com as diferentes soluções de extração (Quadro 2) foi utilizado para a análise de Esterase (EST; EC 3.1.1.1) utilizando o sistema PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), Malato Desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) e Isocitrato Desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.42) em gel de amido simultaneamente.

Quadro 2 - Solução utilizada para extração das isoenzimas, de plântulas de *C. forbesii*

Solução de extração 1	
Tampão fosfato 1,0 M pH 7,0	890 µL
PVP-40 5 %	50 mg
EDTA 1,0 mM	10 µL
β-mercaptoetanol	5 µL
Glicerol	50 µL
Solução de extração 2	
Tampão fosfato 1,0 M pH 7,0	890 µL
PVP-40 5 %	50 mg
EDTA 1,0 mM	10 µL
B-mercaptoetanol	5 µL
Glicerol	50 µL
Ácido ascórbico (50 mM)	500 µL
Metabissulfito de sódio (10 mM)	100 µL
Ditioneitol (DTT 10 mM)	100 µL

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sistema PAGE: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Para estabelecer o protocolo adequado para a análise de isoenzimas α- e β-esterases, em gel de poliacrilamida, de *C. forbesii*, a concentração dos géis foi padronizada, sendo realizados testes com géis a 12 e 13 % para a concentração do

gel de separação. Os tempos de fracionamento para as isoesterases nos géis foram de 6 horas e 30 minutos e de 7 horas, respectivamente, com 200 volts na fonte.

Uma alíquota de 30 µL do sobrenadante de cada amostra foi aplicada em cada poço do gel de poli(acrilamida) 12 e 13 % (Quadro 3). O gel de separação foi preparado usando o protocolo descrito por Ceron (1988).

Quadro 3 - Volumes das soluções estoque utilizadas para o preparo dos géis de separação para as isoesterases de *C. forbesii*

Solução estoque	Volume
Solução acrilamida/bisacrilamida*	6,2 mL
Solução Tampão (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8)	4,0 mL
Água destilada	5,7 mL
Persulfato de amônia 2 %	0,320 mL
TEMED	16 µL

* A solução estoque de acrilamida/bisacrilamida foi filtrada com 30 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida, dissolvida em 100 mL de água destilada.

Esta solução do gel de separação foi acondicionada entre duas placas de vidro medindo 15 x 16,5 cm, separadas por espaçadores de 1 mm, e coberta com uma fina camada de água. Após a polimerização do gel de separação, a água adicionada foi retirada e a solução do gel de empilhamento foi adicionada (Quadro 4). Nas cubas com os eletrodos, foi utilizado tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3. A eletroforese foi realizada por 6 horas e 30 minutos ou por 7 horas em geladeira (4°C) usando uma voltagem constante de 200 V. Para identificar as Esterases, foram usadas as técnicas de coloração desenvolvidas por Johnson et al. (1966), modificadas por Ceron (1988). Os géis foram incubados por 30 minutos com 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2 em temperatura ambiente. A atividade das Esterases foi visualizada em géis corados por 1 hora em solução preparada com 50 mL do tampão fosfato de sódio, 40 mg de β-naftil acetato, 40 mg de α-naftil acetato dissolvidos em 1 mL de acetona, 70 mg de Fast Blue RR salt e 5 mL de N-propanol e incubados durante 60 minutos em estufa a 37 °C. Após a coloração, os géis de poli(acrilamida) foram secos como descrito por Ceron et al. (1992) e Lapenta et al. (1995). Os géis foram incubados em temperatura ambiente por no mínimo 1 hora em uma mistura contendo ácido acético 7,5 % e glicerol 1 %. Após este período, os géis foram banhados em uma solução de gelatina comercial 5 % e prensados em um

bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados em temperatura ambiente por três a quatro dias para secagem.

Quadro 4 - Volumes das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis de empilhamento para as isoesterases de *C. forbesii*

Solução estoque	Volume
Solução acrilamida/bisacrilamida*	3,0 mL
Tampão Tris-HCl 0,24 M pH 6,8	3,0 mL
Água destilada	30 µL
TEMED	3,0 µL
Persulfato de Amônia 2 %	250 µL

* A solução estoque de acrilamida/bisacrilamida foi filtrada com 5 g de acrilamida e 0,25 g de bis-acrilamida, dissolvida em 50 mL de água destilada.

3.4. Eletroforese das isoenzimas Malato Desidrogenase e Isocitrato Desidrogenase

Para estabelecer o protocolo adequado para a análise das isoenzimas Malato Desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) e Isocitrato Desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.42) no gel de amido em *C. forbesii* a concentração dos géis foram padronizadas: foram realizados testes com 14 e 16 %.

Foram testadas, para o preparo do gel de amido, 3 condições diferentes apresentadas e descritas no Quadro 5.

Para a avaliação das isoenzimas Malato Desidrogenase e Isocitrato Desidrogenase, o sobrenadante de cada amostra foi absorvido em papel Whatman 3 MM (4 x 5 mm). Estes papéis foram aplicados verticalmente em gel de amido 16 % (penetrose®50), previamente preparado com solução tampão contendo ácido cítrico 0,04 M titulado com morfolina [N-(3-AMINOPROPYL)-MORFOLINE] para pH 7,5 e diluído 1:20. Para a elaboração do gel, utilizou-se uma suspensão preparada com 51 g de amido em 300 mL da solução tampão do gel, fervida em frasco Erlenmeyer, sobre bico de bunsen, com agitação contínua até se tornar hialina. Depois do cozimento, a suspensão foi acondicionada em placa de vidro medindo 25 x 17 cm com molduras de 6 mm. Após a aplicação das amostras no gel, este foi conectado aos compartimentos dos eletrodos, por meio de uma ponte de papel de filtro previamente embebido em solução tampão dos eletrodos. Nas cubas contendo os eletrodos, foi utilizado o tampão preparado com ácido cítrico 0,04 M titulado com

morfolina [N-(3-AMINOPROPYL)-MORFOLINE] para pH 7,5. A separação das isoenzimas foi realizada por 14 horas na temperatura de 4 °C, com 60 Volts medido nas extremidades do gel.

Quadro 5 - Sistemas tampões empregados para eletroforese em gel de amido de *C. forbesii*

Condição	Tampão do gel	Tampão dos eletrodos	Voltagem nas extremidades do gel (V)	Duração
1	TRIS 0,0103 M ácido cítrico 0,0028 M e pH 7,0	TRIS 0,155 M ácido cítrico 0,043 M e pH 7,0	50 V	17 horas
			60 V	14 horas
			70 V	7 horas
			100 V	6 horas
2	Histidina 0,05 M HCl-EDTA 0,0014 M, titulado com Tris 1 M para pH 7,0 e diluído 4:5	TRIS 0,125 M, titulado com ácido cítrico 1,0 M para o pH 7,0	50 V	17 horas
			60 V	14 horas
			70 V	7 horas
			100 V	6 horas
3	Ácido cítrico 0,04 M titulado com morfolina [N-(3- MINOPROPYL)- MORFOLINE] para pH 6,0; 7,0; 7,5 e 8,0 e diluído 1:20	Ácido cítrico 0,04 M titulado com morfolina para pH 6,0; 7,0; 7,5 e 8,0.	60 V	14 horas

Após a migração da eletroforese, os géis foram fatiados horizontalmente. Sobre uma fatia do gel, foi adicionada a solução de coloração preparada com 25 mL do tampão Tris-HCl 0,1 M e o pH acertado para 8,6 após a adição de 0,500 g de ácido málico; com 8 mg do cofator NAD. Como corantes, foram utilizadas 7 mg de MTT e 5 mg de PMS e 30 mL de ágar 2 % foi adicionado a esta mistura de coloração. A outra fatia do gel foi corada para análise da Isocitrato Desidrogenase. Sobre ela, foi adicionada a solução de coloração preparada com 25 mL do tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, 0,150 g de ácido isocítrico e como cofator foi utilizado 8 mg de NADP. Como corantes foram utilizadas 25 mg de MTT e 5 mg de PMS; 30 mL de ágar 2 % foi adicionado à esta mistura de coloração. Em seguida, os géis foram incubados por aproximadamente 1 hora, a 37 °C, em estufa. Concluída a reação de coloração e visualizada a presença de bandas azuis, os géis foram lavados e fixados com uma solução preparada com metanol, água destilada e ácido acético na razão de 5:5:1, e armazenados para a identificação dos *loci* e seus alelos. Cada gel foi fotografado e esquematizado.

3.5. Análise da variabilidade genética

Após a padronização das condições de fracionamento, foram analisadas simultaneamente 100 plântulas de *C. forbesii* para as isoenzimas MDH, IDH e EST. Após a revelação das regiões de atividade para Esterases, foram estimadas as frequências dos alelos e os parâmetros de diversidade genética. Foi estimada também a proporção de *loci* polimórficos, o número médio de alelos por *locus* e por *locus* polimórfico, a heterozigosidade observada (H_o) e a esperada (H_e). O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado em cada *locus* polimórfico. O coeficiente de endogamia (F_{is}), e o déficit de heterozigotos (F_{it}), foram estimados empregando-se o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a obtenção de melhores resultados dos estudos de isoenzimas de *C. forbesii* foram padronizadas as condições de separação para a Esterase (EST; E.C.3.1.1.1), Malato desidrogenase (MDH; E.C.1.1.1.37) e Isocitrato Desidrogenase (IDH; E.C.1.1.1.42).

A condição mais adequada de solubilização de α - e de β -esterases para *C. forbesii* foi quando as amostras de plântulas foram maceradas inteiras e com a solução de extração preparada com 5 % de PVP-40, ao invés do uso de 7,5 % deste reagente, maior número, e isoesterases com melhor resolução foram reveladas. A padronização do método de extração se faz necessária, pois em plantas são comuns problemas relacionados à extração de proteínas, uma vez que elas podem ser inativadas e, desta forma, não serem visualizadas no gel, ou o seu padrão de atividade pode estar alterado apresentando baixa atividade. Estes problemas ocorrem em razão da liberação de substâncias como fenóis e a produção de quinonas, capazes de inativar as proteínas em solução (Loomis, 1974). Deste modo, durante o isolamento de enzimas de plantas, há a necessidade de remover estes compostos e outros produtos secundários tão rápido quanto possível, o que foi contornado pela adição de agentes absorventes ou protetores, que podem competir com as proteínas da planta em reação com fenóis e as quinonas e, simultaneamente, prevenir a oxidação realizada pelos primeiros (Loomis, 1974; Wendel e Weeden, 1989; Kephart, 1990).

Outro ponto importante é o fracionamento das enzimas e este é determinado pela porosidade do gel, regulando desta forma a velocidade e a posição na qual a macromolécula em estudo se posiciona para a migração (Alfenas et al., 2006). Como pode ser observado na Figura 4, o gel preparado com a concentração de 12 % de poliacrilamida foi o mais adequado para o fracionamento das isoesterases. Quando a concentração do gel foi aumentada de 12 para 13 %, o tempo de fracionamento também foi aumentado de 6 horas e 30 minutos para 7 horas e, nesta última condição, não foi possível visualizar a separação dos alelos dos diferentes *loci*. Assim, a condição mais adequada para o estudo de α - e de β -esterases em *C. forbesii* ocorreu com o fracionamento realizado em géis 12 % por 6 horas e 30 minutos (Figura 5). Com esta condição de fracionamento, foram observados 7 *loci* e

seus respectivos alelos. O esquema destes *loci* e de seus alelos está apresentado na Figura 6 e, na Figura 5, estes *loci* foram numerados em ordem decrescente em direção ao ânodo, de modo que o *locus* menos anódico foi denominado *Est-7* e o mais anódico foi denominado *Est-1*. Quando foi utilizada a concentração de 13 % para os géis de poliacrilamida, não foi possível identificar os alelos com pequena diferença de peso molecular e, portanto, estes migram em posições coincidentes no gel (Figura 4).

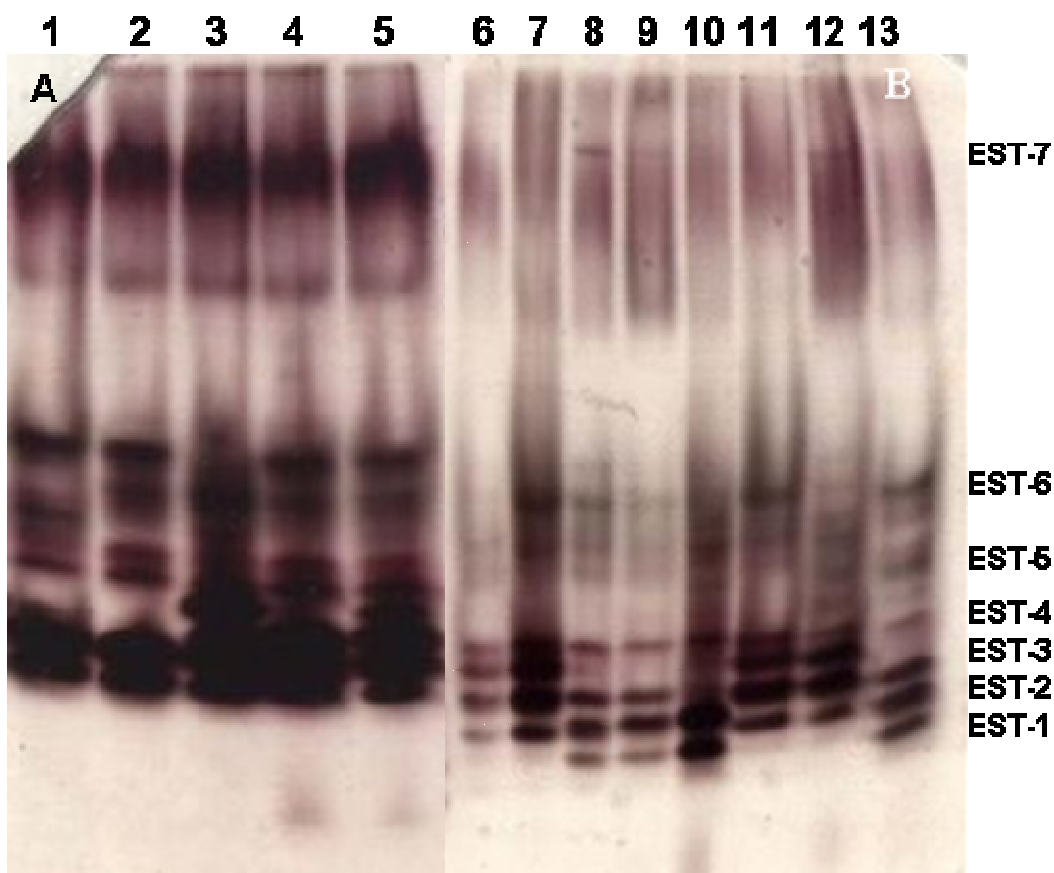


Figura 4 - Em A (1 a 5) gel de poliacrilamida 13 % utilizado para separar as isoesterases em *C. forbesii*, em B (6 a 13) gel de poliacrilamida 12 %. Todas essas amostras foram extraídas com a solução de extração contendo 5 % de PVP-40.

O polimorfismo foi estudado para 5 dos 7 *loci* observados, conferindo um polimorfismo de 62,5% para este sistema enzimático. Os 5 *loci* avaliados apresentaram 18 alelos, com uma média de 3,6 alelos por *locus* polimórfico. O número de alelos por *locus* variou de 3 (*loci Est-2 e Est-3*) a 4 alelos (*loci Est-4, Est-5 e Est-6*). O número de alelos e os fenótipos para cada um dos cinco *loci* estudados estão esquematizados na Figura 6.

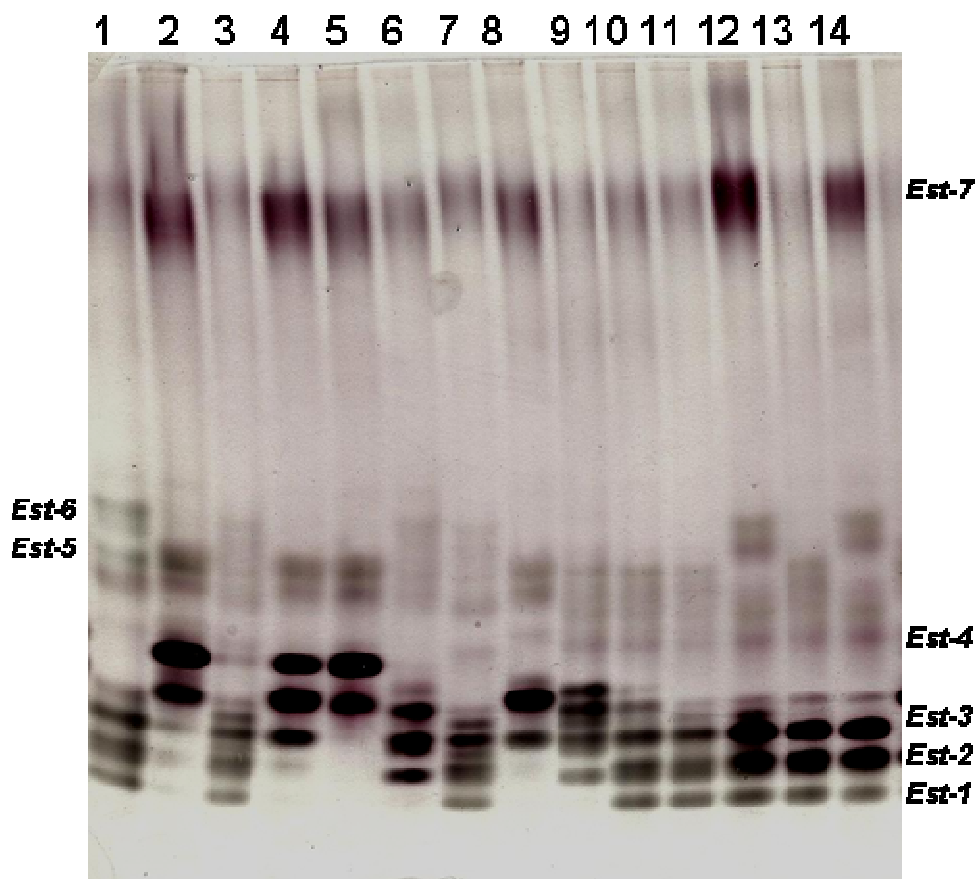


Figura 5 - Gel de Poliacrilamida a 12 % utilizado para separar as isoesterases de plântulas (produzidas de sementes) de *C. forbesii*. O fracionamento foi realizado por 6 h e 30 min com 200 Volts na fonte de eletroforese. Foram evidenciados 7 *loci* para as isozimas esterases.

Para a Malato Desidrogenase e Isocitrato Desidrogenase, foram avaliadas duas condições de extração (denominadas de condições 1 e 2). Apesar da solução de extração 2 ser mais complexa que a 1, em função de conter metabissulfito de sódio que pode formar um complexo covalente estável com os fenóis que não reagem com PVP-40 (Buckley et al., 1988), e o ácido ascórbico que possui a capacidade de reduzir quinonas (Loomis, 1969) que o β -mercaptoetanol não reduz (Shaw et al., 1987; Buckley et al., 1988), observamos que o uso da solução 1 permite a visualização de maior número de enzimas e melhor definição para as isoenzimas MDH e IDH. A solução 2 foi a que proporcionou a melhor condição de estudo para as isoenzimas EST, MDH, Xiquimato Desidrogenase (SKDH), Fosfatase Ácida (ACP) e Superóxido Oxidorredutase (SOD) em estudos realizados em cultivares de *Manihot esculenta* Crantz por Resende et al. (2000), sugerindo que diferenças inerentes das espécies analisadas apresentam requerimentos específicos para o estudo de suas enzimas.

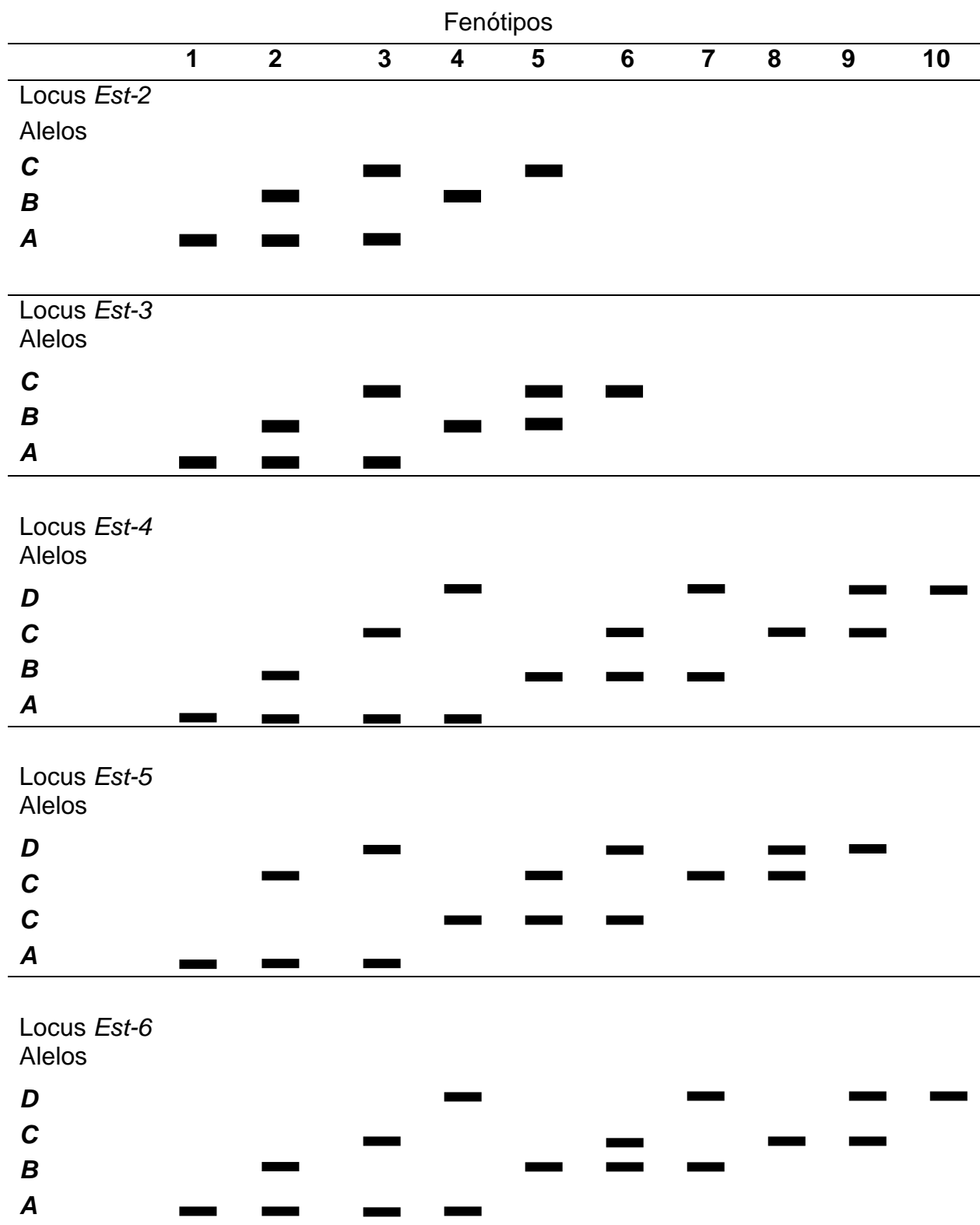


Figura 6 - Diferentes alelos e fenótipos observados para os *loci Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, e Est-6*, separados em gel de poliacrilamida 12 % para *C. forbesii*.

Para as isoenzimas Malato Desidrogenase e Isocitrato Desidrogenase, a melhor condição de separação foi a 3 (Figura 7 e 8). Para esta condição, foi utilizado tampão do gel preparado com ácido cítrico 0,04 M e titulado com morfolina [N-(3-

AMINOPROPYL)-MORFOLINE] para pH 6,0; 7,0; 7,5 e 8,0; e a melhor condição tamponante para a análise destas isoenzimas foi o pH 7,5. A voltagem utilizada para o fracionamento foi 60 volts. A padronização deste parâmetro foi tão importante quanto o tempo para a obtenção dos resultados e o melhor tempo de fracionamento foi de 14 horas. Quando a migração foi realizada por 17 horas, com qualquer uma das diferentes voltagens utilizadas, as bandas das isoenzimas MDH perderam a definição no gel.

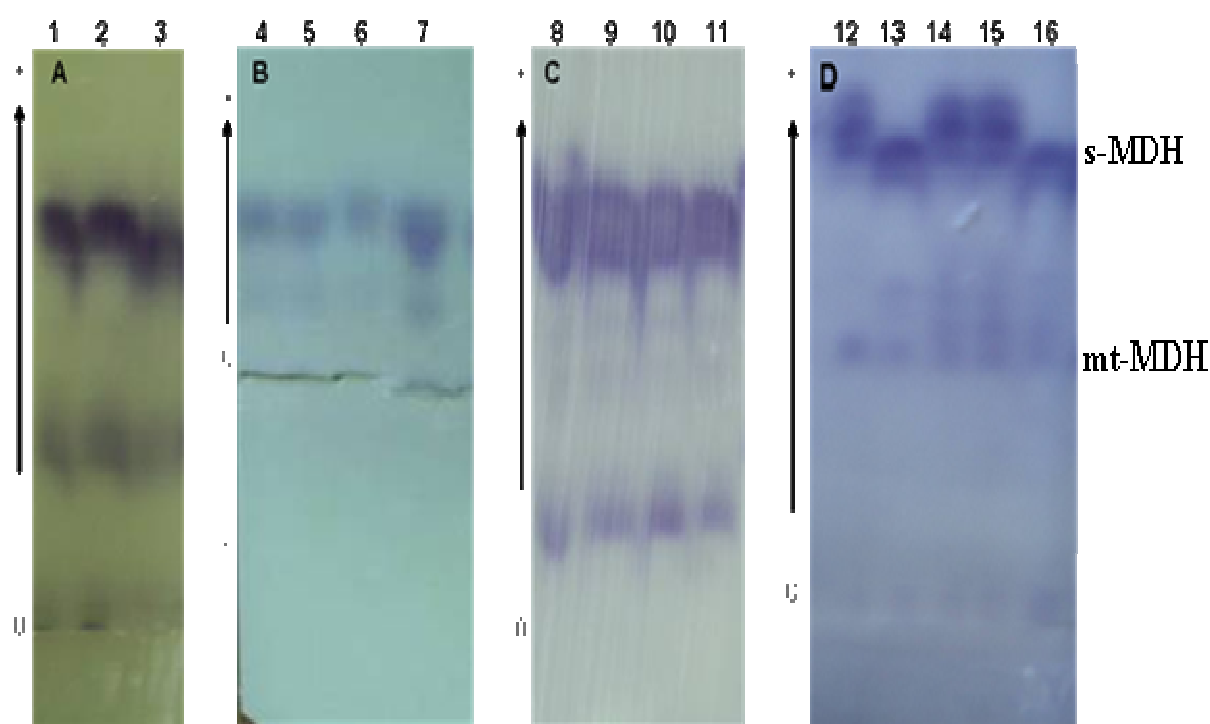


Figura 7 - Malato Desidrogenase de *C. forbesii*. **A.** Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas utilizando a condição 2, TRIS/Histidina pH 7,0. **B.** Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas com a condição 1, Tris-Citrato pH 7,0 e 50 Volts no gel por 14 horas de migração. **C.** Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas com a condição 1, Tris-Citrato pH 7,0 e 70 Volts no gel e 14 horas de migração. **D.** Isoenzimas mt-MDH e s-MDH fracionadas com a condição 3, Citrato de Morfolina, pH 7,5 e 60 Volts no gel com 14 horas de migração.

Nos padrões eletroforéticos das isoenzimas IDH e MDH, todas as bandas migraram para o pólo positivo, sendo caracterizadas como formas anódicas. As isoenzimas foram nomeadas a partir da banda de menor migração conforme seguido por Markert e Moller, 1959. Um único *locus* foi observado para a isoenzima IDH e este apresentou três alelos (Figura 8 e 9).

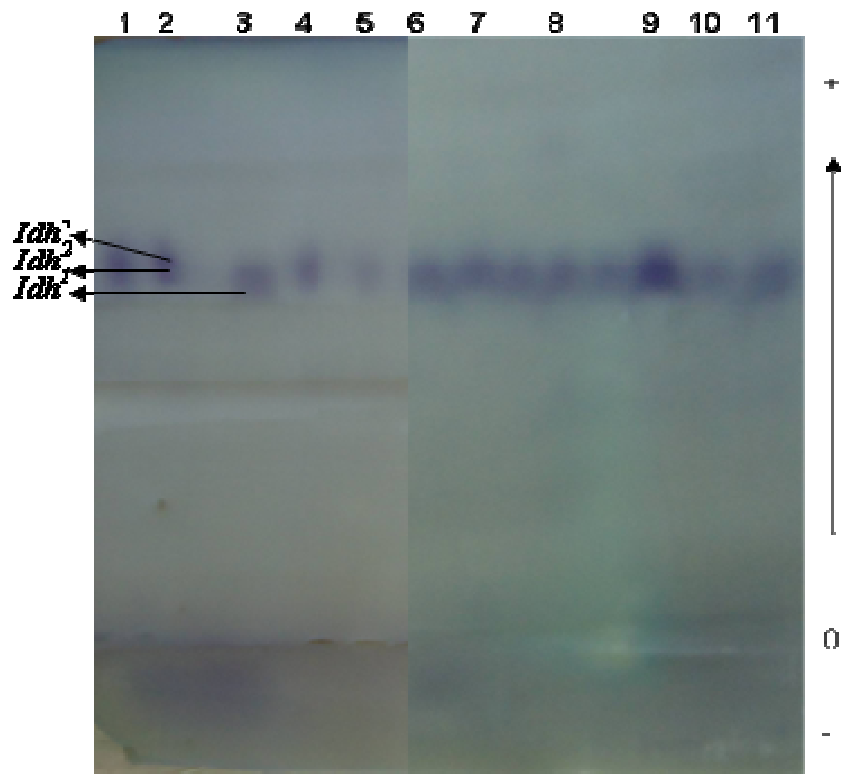


Figura 8 - Isoenzimas Isocitrato Desidrogenase de *C. forbesii* fracionadas utilizando a condição 3, Citrato Morfolina, pH 7,5 e 60 volts no gel e 14 horas de migração.

Para MDH, foram identificadas duas regiões de atividade, a região com banda mais anódica MDH-1, com 2 alelos, corresponde à forma de MDH mitocondrial (mt-MDH) e a menos anódica MDH-2, com 2 alelos, corresponde à forma MDH citosólica ou solúvel (s-MDH); e a forma glioxissomal (g-MDH), descrita para *Cereus peruvianus* (Machado et al., 1993), não foi observada no presente trabalho.

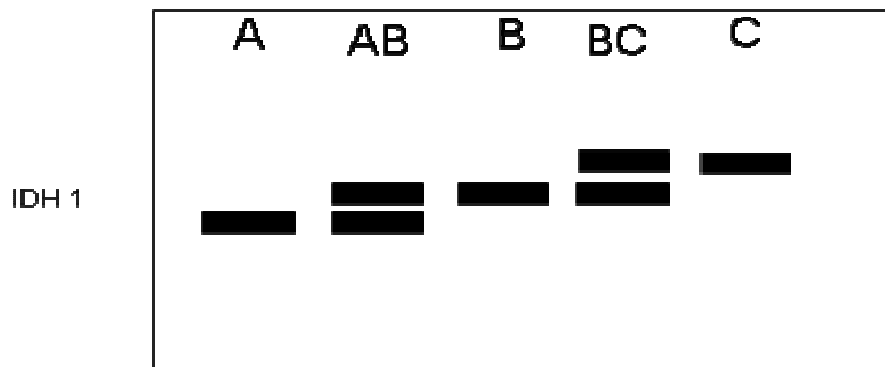


Figura 9 - Esquema dos três diferentes alelos e os diferentes fenótipos observados para o loci *Idh*, para *C. forbesii*.

Segundo Musrati et al. (1998), MDH é um grupo de enzimas multiméricas, consistindo de subunidades idênticas, usualmente organizadas tanto em dímero ou em tetrâmero, com subunidades de pesos moleculares de 30-35 kDa. Em *C. forbesii* a mt-MDH pode ser observada na forma monomérica ou dimérica, isto é, os heterozigotos podem apresentar-se com duas ou três bandas (Figura 10) e este é um processo pós-traducional.

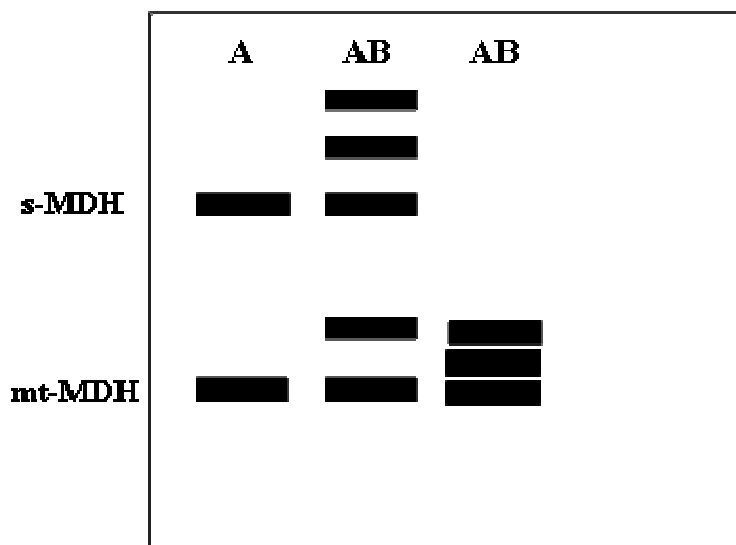


Figura 10 - Diferentes alelos e fenótipos observados para os *loci* s-MDH e mt-MDH, para *C. forbesii*. Para mt-MDH o genótipo AB pode conferir o fenótipo de duas ou de três bandas.

As condições padronizadas para o estudo de Malato Desidrogenase, Isocitrato Desidrogenase e Esterase revelaram 10 *loci* (sete para Esterase, dois para Malato Desidrogenase e um para Isocitrato Desidrogenase). Destes *loci*, oito foram polimórficos (cinco para Esterase, dois para Malato Desidrogenase e um para Isocitrato Desidrogenase), conferindo um polimorfismo de 80 % para a progênie de *C. forbesii* estudada.

O alto polimorfismo obtido com o estudo de isoenzimas em plântulas de *C. forbesii*, obtidas de sementes germinadas *in vitro*, não pode ser comparado com o polimorfismo encontrado em outras amostras de *C. forbesii* ou em outras espécies de *Cattleya*, porque estes dados, se existirem, não estão disponíveis na literatura especializada. A ausência de diversidade de alozimas já foi descrita em um grande número de orquídeas terrestres (Scacchi et al., 1991; Ehlers e Pedersen 2000; Sun e Wong 2001; Chung et al., 2007). Entretanto, níveis extremamente baixos de variação

genética dentro de populações, ou a falta completa de diversidade foram observados em espécies de orquídeas amplamente distribuídas, mas raras e ameaçadas de extinção. Para *Epipactis thunbergii*, em uma espécie de orquídea terrestre que cresce na Coreia do Sul, o polimorfismo encontrado foi extremamente baixo, apresentando uma frequência média de 3,8 % de *loci* polimórficos. Chung e Chung (2007) justificam este nível extremamente baixo de polimorfismo pelo pequeno tamanho efetivo da população, um fluxo gênico restrito e o isolamento das populações. Chung (2009) também descreveu baixo nível de variação genética para *Gymnadenia cucullata*, *G. camtschatica*, *Amitostigma gracile* e *Pogonia minor*, para estas espécies raras a porcentagem de *loci* polimórficos foi de 12,5 %. Alguns autores são unânimes em descrever que os baixos níveis de variação genética em espécies de orquídea devem estar associados a processos evolutivos, tais como deriva genética, endogamia, dispersão gênica limitada e efeito fundador (Chung e Chung, 2008; Chung e Park, 2008).

Para outras espécies de orquídeas, a diversidade genética encontrada foi muito alta. Em sete espécies de *Bulbophyllum* Thouars (epifítica), estudadas por Azevedo et al. (2007), a porcentagem de *loci* polimórficos variou de 86 a 100 %. O polimorfismo de isoenzimas encontrado em *Liparis kumokiri* (terrestre) e em *L. makinoana* variou de 66,7 a 73,3 % (Chung et al., 2007). Segundo Hamrick e Godt (1989), o sistema de cruzamento é um parâmetro que apresenta grande associação com os níveis de variação genética avaliado em espécies de plantas. Em particular, espécies autopolinizadas, polinizadas por animais ou que apresentam sistemas mistos de cruzamento, exibem menores níveis de variação genética do que espécies que apresentam predominantemente sistema de fecundação cruzada.

Desta forma, a ampla diversidade genética verificada em *C. forbesii* (80 % de polimorfismo) poderia ser justificada por um sistema preferencial de polinização cruzada e também pela ocorrência de cruzamentos interespecíficos. Entretanto, o sistema reprodutivo de duas espécies do gênero *Cattleya* (*C. tenuis* e *C. elongata*) descrito por Smidt et al. (2006) mostrou que existem semelhanças entre as flores de ambas espécies e tem o mesmo agente polinizador (*Bombus brevivillius*), autocompatibilidade em ambas as espécies, mas uma produção de frutos diferenciada. Os estudos desses autores (Smidt et al., 2006) indicam que espécies do gênero *Cattleya* têm divergências no que se refere ao potencial do sistema reprodutivo e, portanto, não é possível fazer inferências quanto ao sistema

reprodutivo de *C. forbesii* analisada no presente estudo, para explicar a alta diversidade genética estimada a partir da análise de oito *loci* de isoenzimas.

O número médio de alelos por *locus* e por *locus* polimórfico para *C. forbesii* foi de 3,1250 e de 2,5788, respectivamente, (Quadro 6). O menor número de alelos foi observado para os dois *loci* de Malato Desidrogenase (*s-Mdh* e *mt-Mdh*). Nestes, foram observados 2 alelos, o maior número de alelos foi observado para os *loci Est-4*, *Est-5* e *Est-6*, que foram encontrados 4 alelos. Os alelos e as frequências para estes em cada *locus* estão apresentadas no Quadro 7.

Quadro 6 - Número de alelos por *locus* (na*), número de alelos por *loci* polimórficos (ne*), Heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) em plântulas, germinadas *in vitro* de *C. forbesii*

<i>Loci</i>	N	ne*	na*	He	Ho
<i>Mt-Mdh</i>	200	1,3931	2,0000	0,2836	0,3000
<i>s-Mdh</i>	200	1,5355	2,0000	0,3505	0,4500
<i>ldh-1</i>	196	2,5519	3,0000	0,6113	0,2653
<i>Est-2</i>	198	2,3400	3,0000	0,5756	0,2323
<i>Est-3</i>	200	2,8118	3,0000	0,6476	0,6000
<i>Est-4</i>	200	3,3151	4,0000	0,7019	0,4100
<i>Est-5</i>	200	3,8632	4,0000	0,7449	0,4600
<i>Est-6</i>	200	2,8197	4,0000	0,6486	0,5200
Média	199	2,5788	3,1250	0,5705	0,4047

A análise das frequências genotípicas indica distorção na segregação para 7 dos 8 *loci* analisados, onde a maioria das frequências dos alelos não apresenta uma distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Somente o *locus mt-Mdh* manteve-se em equilíbrio (Quadro 7).

Na análise das 100 plântulas de *C. forbesii* foi verificado que os *loci* mt-MDH e s-MDH apresentaram valores negativos para o coeficiente de endogamia (Fis), indicando um excesso de heterozigotos para os referidos *loci* (Quadro 8). No entanto, o valor médio de Fis para os oito *loci* analisados foi de 0,2870, indicando que existe uma deficiência de heterozigotos para os demais *loci* estudados. Este resultado é um reflexo da diferença entre a heterozigosidade esperada e a observada, respectivamente, 0,5705 e 0,4047 (Quadro 6). Altos valores de Fis também foram observados por Chung (2009) para as espécies de orquídeas *Gymnadenia cucullata* (0,276) e *G. camtschatica* (0,308). Este autor justifica estes valores para Fis em função da ocorrência de autofecundação e/ou cruzamentos

entre parentais endogâmicos, tendo em vista que as duas espécies são autocompatíveis. Estes eventos podem justificar a diminuição de variação genética dentro das populações das duas espécies.

Quadro 7 - Distribuição dos alelos para os diferentes *loci* de isoesterases e a indicação dos *loci* que estão ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg para as plântulas germinadas *in vitro* de *C. forbesii*.

Alelo	<i>Loci</i>							
	<i>Mt-Mdh</i>	<i>s-Mdh</i>	<i>Idh-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Est-3</i>	<i>Est-4</i>	<i>Est-5</i>	<i>Est-6</i>
A	0,8300	0,7750	0,1582	0,3687	0,2800	0,4350	0,2450	0,1500
B	0,1700	0,2250	0,5000	0,5303	0,4550	0,1700	0,2900	0,1650
C			0,3418	0,1010	0,2650	0,1450	0,2900	0,5300
D						0,2500	0,1750	0,1550
EHW	0,3423	8,211*	70,846*	107,35*	22,867*	85,305*	58,863*	23,973*

* Significativo a $P < 0,05$, indicando a ausência do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Se por um lado a ampla diversidade genética verificada em *C. forbesii* (80% de polimorfismo) poderia ser justificada por um sistema preferencial de polinização cruzada e também pela ocorrência de cruzamentos interespecíficos, por outro lado o valor de Fis (0,2870) (que indica que existe um déficit de heterozigotos) pode ser satisfeito pelas condições descritas acima para outras espécies de orquídeas (autofecundação e/ou cruzamentos entre parentais endogâmicos, a espécie ser autocompatível). Em nosso trabalho, este déficit de heterozigotas pode ser explicado pela deriva genética, pela interferência humana (uma vez que as orquídeas são usadas como plantas ornamentais sob seleção artificial), ou pela seleção por genótipos homozigotos. Estas justificativas também podem ser usadas para explicar o desvio das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para todos os *loci*, menos para o *locus* mt-MDH, como pode ser observado no Quadro 7.

Os resultados obtidos apontam para o excesso de heterozigotos para os *loci* s-Mdh e mt-MDH em orquídeas e que apresentam 2 e 3 alelos respectivamente; contradizem as informações descritas por Gillespie e Langley (1974). Estes autores descrevem as enzimas envolvidas no metabolismo intermediário, na glicólise e no Ciclo de Krebs como enzimas do Grupo I como apresentando menor variabilidade genética do que as enzimas que utilizam múltiplos substratos e que são descritas como do Grupo II. Desta forma, é importante salientar que podemos utilizar tanto enzimas do Grupo I ou do Grupo II para quantificar a diversidade genética em *C.*

forbesii, sem incorrer nos problemas apontados por Hartl e Clark (1997). Estes autores alertam para o problema da escolha de sistemas enzimáticos, mais polimórficos, pois estes podem não refletir uma amostragem ao acaso da variabilidade genética da população.

Quadro 8 - Parâmetros de diversidade genética para as plântulas germinadas *in vitro* de *C. forbesii*

<i>Loci</i>	N	Fis	Fit
<i>mt-Mdh</i>	200	-0,0631	-0,0631
<i>s-Mdh</i>	200	-0,2903	-0,2903
<i>ldh-1</i>	196	0,5637	0,5637
<i>Est-2</i>	198	0,5943	0,5943
<i>Est-3</i>	200	0,0688	0,0688
<i>Est-4</i>	200	0,4129	0,4129
<i>Est-5</i>	200	0,3793	0,3793
<i>Est-6</i>	200	0,1942	0,1942
Média	199	0,2870	0,2870

N=número de indivíduos amostrados; Fis=coeficiente de endogamia; Fit=déficit de heterozigotos.

É importante salientar que a ampla variabilidade genética naturalmente descrita em estudos que analisam populações distribuídas em seus habitats naturais também é observada em plântulas de orquídeas produzidas a partir de sementes germinadas em meio básico KC (Knudson, 1946) e provenientes de um único fruto. O sistema de germinação e cultivo *in vitro* das sementes de *C. forbesii*, com a perspectiva de produzir mudas para reposição de estoques a serem cultivados na natureza para programas de conservação genética, ou com a perspectiva de realizar cruzamentos preferenciais para estímulo da produção de híbridos em programas de melhoramento, não estabelece pressão de seleção que pode indicar uma redução na diversidade genética da espécie.

5. CONCLUSÕES

a) As isoenzimas Esterase (EST; E.C.3.1.1.1), Malato Desidrogenase (MDH; E.C.1.1.1.37) e Isocitrato Desidrogenase (IDH; E.C.1.1.1.42) foram marcadores moleculares eficientes para quantificar a diversidade genética em plântulas de *Cattleya forbesii*.

b) O sistema de germinação e cultivo *in vitro* das sementes e plântulas de *C. forbesii* não estabeleceu uma pressão de seleção que pode indicar uma redução na diversidade genética da espécie. A ampla variabilidade genética descrita para populações naturais também foi observada em plântulas produzidas a partir de sementes germinadas em meio básico KC.

c) O sistema de germinação e cultivo *in vitro* das sementes de *C. forbesii* pode ser considerado como adequado para produzir mudas para reposição de estoques na natureza, compondo programas de conservação, ou podem ser utilizadas em processos de cruzamentos preferenciais para a produção de híbridos em programas de melhoramento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, J.E.; HARROD, R.J.; SHEA, K.L. Genetic variation among populations of the rare clustered lady-slipper orchid (*Cypripedium fasciculatum*) from Washington state, USA. **Natural Areas Journal**, 19:234–238, 1999.

ACKERMAN, J.D.; WARD, S. Genetic variation in a widespread epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? **Systematic Botany**, 24:282–291, 1999.

ALFENAS A.C.; DUSI, A.; ZERBINI, F.M.J; ROBINSON, I.P.; MICALES, J.A.; OLIVEIRA, J.R.; DIAS, L.A.S.; SCORTICHINI, M.; PEREIRA, M.C.B; BONDE, R.B.; ALONSO, S.K.; JUNGHANS, T.G.; BRUNR, W. (*In memoriam*). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.

ALPHONSO, A.G. The role of the botanic gardens in the conservation of orchid species. In: EIGHTH WORLD ORCHID CONFERENCE, 1975, Frankfurt. **Proceedings....** Frankfurt: German Orchid Society, 1993. p. 323–325.

ALTUBE, H.A.; CABELLO, F.; ORTIZ, J.M. Caracterización de variedades y portainjertos de vid (*Vitis vinifera* L.) mediante isoenzimas de las raíces. **Agriscientia**, 9:21-29, 1992.

ARAUJO, D. **Descrição das espécies**. Disponível em: <<http://www.delfinadearaujo.com>>. Acesso em: 12, novembro, 2009.

ARDITTI, J. Factores affecting the germination of orchids seeds. **The Botanical Review**, 30:1-29, 1967.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. Nova York: John Wiley and Sons, 1992. 691p.

ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, 145:367–421, 2000.

- AZEVEDO, M.T.; BORBA, E.L.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. High genetic variability in Neotropical myophilous orchis. **Botanical Journal of the society**, 153:33-40, 2007.
- BANASZAK, L.J.; BRADSHAW, R.A. Malate dehydrogenase. In: BOYER, P.D. **The enzymes**. New York: Academic Press, 1975. p. 369-396p.
- BARRETT, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. **Genetics and conservation rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 3–30.
- BENZING, D.H.; OTT, D.W.; FRIEDMAN, W.E. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **American Journal of Botany**, 69:608-614, 1982.
- BERG, C. Banco genético de orquídeas: Diversidade e Conservação. ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 1998, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: ESALQ - Departamento de Genética, 1998. p. 15.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J. Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian campos rupestres. **Lindleyana**, 13:203–218, 1998.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J. Temporal variation in pollinarium size in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. **Plant Systematics and Evolution**, 217:197-204, 1999.
- BORBA, E.L.; SHEPPARD, G.J.; SEMIR, J. Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian 'campo rupestre' vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, 217:205–214, 1999.
- BORNBUSCH, A.H.; SWENDER, L.A.; HOOGERWERT, D.L. Genetic variation in Massachusetts populations of *Cypripedium arietinum* R. Brown in Ait. and *C. acaule* Ait. (Orchidaceae). **Rhodora**, 96:354–369, 1994.

BRAGA, M.M.N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. **Acta Amazônica**, 7:74-74, 1977.

BRAGA, P.I.S. Orquídeas: biologia floral. **Ciência Hoje**, 5:53-55, 1987.

BRAVI, R.; SOMMOVIGO, A.; DELOGU, C.; MERISIO, G. Indagine sull'identità specifica del seme di *Lolium rigidum* commercializzato in Itália. **Sementi Selette**, 40:1-17, 1994.

BRZOSKO, E.; WROBLEWSKA, A. Genetic variation and clonal diversity in island *Cephalanthera rubra* populations from Biebrza National Park, Poland. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 143:99–108, 2003.

BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T.; BRAWS, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Hum. E Bonpl.: Lecythidaceae) 1. Genetic variation of natural populations. **Theoretical and Applied Genetics**, 76:923-928, 1988.

BUTH, D.G. The application of electrophoretic data in systematic studies. **Systems in Ecology**, 15:501–522, 1984.

CAMARGO, J.M.F.; STORT, A.C. **A abelha: *Apis mellifera* Linnaeus**. São Paulo: Edart, 1973. 79p.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: manual prático da cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1996. 143p.

CASE, M.A. Extensive variation in the levels of genetic diversity and degree of relatedness among five species of *Cyripedium* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, 81:175–184, 1994.

CASE, M.A.; MLODOZENIEC, H.T.; WALLACE, L.E.; WELDY, T.W. Conservation genetics and taxonomic status of rare Kentucky lady's slipper: *Cyripedium kentuckense* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, 85:1779–1786, 1998.

CATLING, P.M. Auto-pollination in the Orchidaceae. In: ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 121–158.

CERON, C.R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1988. 142p. Tese (Doutorado em em Biociências).

CERON, C.R.; SANTOS, J.R.; CAMPOS, H.E.M.B. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, 15:201-203, 1992.

CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; BARRETT, R.L.; FREUDENSTEIN, J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K.W.; KELL, S.P.; BARRETT, R.L.; CRIBB, P.J. **Orchid conservation**. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications, 2003. p. 69–90.

CHRISTENSEN, D.E. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in Eastern Ecuador. **Lindleyana**, 7:28–33, 1992.

CHUNG, M.Y. Lack of allozyme diversity in populations of the rare, endangered terrestrial orchids *Tipularia japonica* and *Epipactis papillosa* in Korea. **Plant Systematics and Evolution**, 278:203–209, 2009.

CHUNG, M.Y.; CHUNG, M.G. Extremely low levels of genetic diversity in the terrestrial orchid *Epipactis thunbergii* (Orchidaceae) in South Korea: implications for conservation **Botanical Journal of the Linnean Society**, 155:161–169, 2007.

CHUNG, M.Y.; CHUNG, M.G. Conservation genetics of the endangered terrestrial orchid *Pogonia minor* in South Korea. **Annales Botonici Fennici**, 45:455–464, 2008.

CHUNG, M.Y.; CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial genetic structure in populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae). **Genes and Genetic Systems**, 73:281–285, 1998.

CHUNG, M.Y.; NASON, J.D. Spatial demographic and genetic consequences of harvesting within populations of the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. **Biological Conservation**, 137:125–137, 2007.

- CHUNG, M.Y.; NASON, J.D.; CHUNG, M.G. Implication of clonal structure for effective population size and genetic drift in a rare terrestrial orchid, *Cremastra appendiculata*. **Conservation Biology**, 18:1515–1524, 2004.
- CHUNG, M.Y.; NASON, J.D.; CHUNG, M.G. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata*. **American Journal of Botany**, 91:92–97, 2004a.
- CHUNG, M.Y.; NASON, J.D.; CHUNG, M.G. Fine-scale genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Orchis cyclochila* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 254:209–219, 2005.
- CHUNG, M.Y.; NASON, J.D.; CHUNG, M.G. Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric populations. **Molecular Ecology**, 14:4389–4402, 2005a.
- CHUNG, M.Y.; PARK, C.W. Fixation of alleles and depleted levels of genetic variation within populations of the endangered lithophytic orchid *Amitostigma gracile* (Orchidaceae) in South Korea: implications for conservation. **Plant Systematics and Evolution**, 272:119–130, 2008.
- CHUNG, M.Y.; PARK, C.W.; MYERS, E.R.; CHUNG, M.G. Contrasting levels of genetic diversity between the common, self-compatible *Liparis kumokiri* and rare, self-incompatible *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in South Korea. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 153:41–48, 2007.
- CHUNG, M.Y.; NASON, J.; CHUNG, M.G.; KIM, K.; PARK, C. SUN, B.; PAK, J. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). **American Journal of Botany**, 89:1229–1236, 2002.
- COGNIAUX, A. **Orchidaceae**. In: MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G.; URBAN, I. **Flora brasiliensis**. Munique: Oldenbourg Verlag, 1898. 688p.
- COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? **Trends in Ecology e Evolution**, 20:487–494, 2005.

CRUZ, D.T.; BORBA, E.L.; VAN DEN BERG, C. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no estado da Bahia. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, 3:26–34, 2003.

DARWIN, C. The Various Contrivances by which Orchids are Fertilised by Insects. London: **John Murray**, 1985. 300p.

DAVIES, K.L.; WINTERS, C.; TURNER, M.P. Pseudopollen: its structure and development in *Maxillaria* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, 85:887-895, 2000.

DE JONG, D.W.; OLSON, A.C. Electrophoretic migration and redox behavior of malate dehydrogenases from cell suspension cultures of tobacco. **Biochimica et Biophysica Acta**, 276:53-62, 1972.

DEGEN, B.; BLANC, L.; CARON, H.; MAGGIA, L.; KREMER, A.; GOURLET-FLEURY, S. Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species. **Biology Conservation**, 131:386–401, 2006.

DIXON, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. Estados Unidos: Oxford University Press, 1985. 230p.

DODSON, C.H. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. **American Orchid Society Bulletin**, 31:525-649, 1962.

DONDON, R.; MARSAIOLI, A.J.; KOEHLER, S.; SINGER, R.; AMARAL, M.C. A química das recompensas florais de Maxillarieae (Orchidaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2002, Poços de Calda. **Resumos expandidos...** Poços de Calda: Sociedade Brasileira de Química, 2002. p. 20-23.

DRESSLER, R.L. The orchids: Natural history and classification. Massachusetts: **Harvard University Press**, 1981. 333p.

DRESSLER, R.L. Phylogeny and classification of the orchid family. **Oregon: Dioscorides Press**, 1993. 314p.

- DUTECH, C.; SORK, V.L.; IRWIN, A.J.; SMOUSE, P.E.; DAVIS, F.W. Gene flow and fine-scale genetic structure in a windpollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). **American Journal of Botany**, 92:252–261, 2005.
- DUVALL, M.R.; BIESBOER, D.D. Comparisons of eletrophoretic seed protein profiles among North American populations of *Zizania*. **Biochemical systematics and Ecology**, 17:39-43, 1989.
- EHLERS, B.K.; PEDERSEN, H.A.E. Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences. **Biological Journal of the Linnean Society**, 69:411–430, 2000.
- ELTZ, T.; WHITTEN, W.M.; ROUBIK, D.W.; LINSENMAIR, K.E. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. **Journal of Chemical Ecology**, 25:157– 176, 1999.
- FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. Genetics and Conservation of Rare Plants. **Oxford: Oxford University Press**, 1991. 304p.
- FARIA, R.T.; STANCATO, G.C. Orquídea-semeadura. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. p. 37-39.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.
- FIVEASH, R. **Australian orchids. Rigby limited**. Australia: Adelaide, 1974. 360p.
- FOGAÇA, C.A.; MALAVASI, M.M., ZUCARELI, C.; MALAVASI, U.C. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. *Caesalpinaceae*. **Revista Brasileira de Sementes**, 28:101-107, 2006.
- FORREST, A.D.; HOLLINGSWORTH, M.L.; HOLLINGSWORTH, P.M.; SYDES, C.; BATEMAN, R.M. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. **Heredity**, 92:218–227, 2004.

GILLESPIE, J.H., LANGLEY, C.H.A. General model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics, Pittsburgh**, 76:837-887, 1974.

GROVES, D. **Cattleya forbesii**. Disponível em: < <http://wsbeorchids.danielgroves.co.uk/wp-%20content/uploads/2009/01/cattleya%20fobesii.pdf>>. Acesso em: 23, outubro, 2009.

GUSTAFSSON, S. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. **Molecular Ecology**, 9:1863–1872, 2000.

HAMILTON, W.D. Pathogen as causes of genetic diversity in their host populations. In: ANDERSON, R.M.; MAY, R.M. (eds.). **Population biology of infectious diseases**. New York: Springer-Verlag, 1982. p. 269-296.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **Columbus: American Journal of Botany**, 69:1685-1693, 1982.

HAMRICK, J.L. Isozymes and analyses of genetic structure of plant populations. In: SOLTIS, D.; SOLTIS, P. (eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland Oregon: **discorides Press**, 1989. p. 87-105.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1989. p. 43–63.

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and eletrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 10:173-200, 1979.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, 15:559–571, 2006.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 481. 1997.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. Oxford: Oxford University Press, 1985. 336p.

HOEHNE, F.C. Orchidaceae. **Flora Brasílica**, 12:224, 1942.

HOLLINGSWORTH, P.M.; DICKSON, J.H. Genetic variation in rural and urban populations of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. (Orchidaceae) in Britain. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 123:321–331, 1997.

HUNT, L.F. **The international book of orchids**. London: Cavendish House, 1984. 168p.

JACQUEMYN, H.; BRYNS, R.; VANDEPITTE, K.; HONNAY, O.; ROLDÁN-RUIZ, I. Fine-scale genetic structure of life history stages in the food-deceptive orchid *Orchis purpurea*. **Molecular Ecology**, 15:2801–2808, 2006.

JERSÁKOVÁ, J.; JOHNSON, S.D.; KINDLMAN, P. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. **Biological Reviews**, 81:219–235, 2006.

JOHNSON, B.L.; BARNHART, D.; HALL, O. Analysis of genome and species relationships in the polyploidy wheats by protein electrophoresis. **American journal of Botany**, 54:1089-1098, 1967.

JOHNSON, F.M.; KANAPI, C.G.; RICHARDSON, R.H.; WHEELER, M.R.; STONE, W.S. An operational classification of drosophila esterases for species comparison. **University of Texas Publications**, 1:517-532, 1966.

JUNQUEIRA, AH; PEETZ MS. **Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil**. Campinas: Ibraflor/Hortica, 2004. 5p.

KAHLER, A.L. Worldwide patterns of genetic variation among four esterase *loci* in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, 59:101-111, 1981.

KAHLER, A.L.; ALLAD, R.W. Genetics of isozymes variants in barley I. Esteresases. **Crop Science**, 10:444-448, 1970.

KENNEDY, A.H.; WALKER, G.L. The Population Genetic Structure of the Showy Lady's-Slipper Orchid (*Cypripedium reginae* Walter). **Castanea**, 72:248, 2007.

KEPHART, S.R. Starch gel eletrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American journal of Botany**, 77:693-712, 1990.

KERSTEN, R.A.; SILVA, S.M. Composição florística e estrutura do componente epifítico vascular em floresta da planície litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, 24:213-226, 2001.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, 15:214 -217, 1946.

KOCYAN, A.; ENDRESS, P.K. Floral structure and development in *Apostasia* and *Neuwiedia* (Orchidaceae) and their relationships to other Orchidaceae. **International Journal of Plant Sciences**, 162:847-867, 2001.

LAPENTA, A.S.; CAMPOS BICUDO, H.E.M.; CERON, C.R. CORDEIRO, J.A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, 84:13-29, 1995.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 60:197-214, 1981.

LECONTE, A.; LEBRUM, P.; NICOLAS, D.; SEGUIN, M. Electrophorèse. Application á l'identification clonale de l'hevea. **Plantations, recherche, Developpement**, 1:28-33, 1994.

LOOMIS, W.D. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzyme. **Methods in Enzymology**, 31:528-544, 1969.

LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolic and quinones isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, 31:528-544, 1974.

LOWE, A.J.; BOSHIER, D.; WARD, M. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical neotropical trees. **Heredity**, 95:255-273, 2005.

LUKASOVÁ, A.; SARMANOVÁ, A. Metody shlukové analýzy. Státní nakladatelství technické literatury, **Praha**: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. 51p.

MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J.; MANGOLIN, C.A. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 31:569-575, 1993.

MACHON, N.; BARDIN, P.; MAZER, S.J.; MORET, J.; GODELLE, B.; AUSTERLITZ, F. Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. **New Phytologist**, 157:677–687, 2003.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **National Academy of Sciences**, 45:753-763 p. 1959.

MARTINI, P.C.; WELLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* *in vitro* germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:1319-1324, 2001.

MCMILLIN, D.E. Plant isozymes: A historical perspective. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Oxford, 1983. p. 3-13.

MEDEIROS, R. **Exsicatas de outros estados**. Disponível em: <<http://alexandrecattleyabicolor.blogspot.com>>. Acesso em: 20, abril, 2011.

MILANEZE, M.A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil: morfologia de sementes e cultivo assimiótico**. Rio Claro: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, 1997. 233p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal).

MISSET, M.T.; FONTANELLE, C. Protein relationships between natural populations of *Ulex europaeus* and *U. galli* (Fabaceae, Genisteae) and their hybrids. **Plant Systematics and Evolution**, 179:19-25, 1992.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum Agronomy**, 24:1397-1400, 2002.

MORALES, S.; TAKEDA, G.M.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Anatomia das raízes de sessenta e cinco espécies de orquídeas nativas do Brasil. **Arquivos da APADEC**, 2:191-199, 2002.

MUSRATI, R.A.; KOLLAROVA, M.; MERNIK, N.; MIKULASOVA, D. Malate dehydrogenase: Distribution, function and properties. **General Physiology and biophys**, 3:193-210, 1998.

NADKARNI, N.M. An ecological overview and checklist of vascular epiphytes in the Monteverde cloud forest reserve, Costa Rica. **Brenesia**, 24:55-632, 1986.

NAZAROV, V.V.; GERLACH, G. The potential seed productivity of orchid flowers and peculiarities of their pollination systems. **Lindleyana**, 12:188-204, 1997.

NILSSON, L.A. The pollination ecology of *Herminium monorchis* (Orchidaceae). **Botaniska Notiser**, 132:537–549, 1979.

NILSSON, L.A. Orchid pollination biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 7:255–259, 1992.

OLATUNJI, O.A.; NENGIM, R.O. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 80:357-370, 1980.

OLIVEIRA, R.R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botanica Brasilica**, 18:793-799, 2004.

OLIVEIRA, V.D.C.; SAJO, M.G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, 3:365-374, 1999.

ORASMO, G.R.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme diversity in RB (Republic of Brazil) sugarcane (*Saccharum spp*) varieties. **Acta Scientiarum**, 25:213-219, 2003.

O'SLLIVAN, S.A.; WEDDING, R.T. Malate dehydrogenase isoenzymes from cotton leaves. Molecular weights. **Plant Physiology**, 49:117-123, 1972.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**. Hildesheim: BruckeBrucke-Verlag Kurt Schmersov, 1975. 408p.

PACINI, E.; HESSE, M. Types of pollen dispersal units in orchids, and their consequences for germination and fertilization. **Annals of Botany**, 89:653–664, 2002.

PASCALE, N.C.; CAMDESSUS, M.C.; LENARDIS, A. E. Diferenciación de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill por técnicas de laboratorio. **Oleaginosos**, 7:12-16, 1994.

PASHA, M.K.; SEN, S.P. Seed protein patterns of Cucurbitaceae and their taxonomic implications. **Biochemical Genetics and Ecology**, 19:569-576, 1991.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo práctico de orquídeas**. Viçosa: UFV, 2002. 63p.

PEAKALL, R.; BEATTIE, A.J. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* – a species pollinated by facultatively anthophilous insects. **Lindleyana**, 10:19–28, 1996.

PEDERSEN, H.A. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* da species pollinated by facultatively anthophilous insects. **Lindleyana**, 10:19-28, 1995.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PINTAÚDI, C.A.; STORT, M.N.S.; MARIN-MORALES, M.A. Polinizações naturais e artificiais de *Xylobium squalens* Lindl. (Orchidaceae). **Naturalia**, 15:67–80, 1990.

RAJORA, O.P.; RAHMAN, M.H.; BUCHERT, G.P.; DANCİK, B.P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, 9:339-348, 2000.

RAMBO, B. Orchidaceae Riograndenses. **Iheringia, Botânica**, 13:1-96, 1965.

RAMSEY, M.M.; STEWART, J. Re-establishment of the Lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 126:173–181. 1998.

RASMUSSEN, H.N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 332p.

- RASMUSSEN, H.N.; WHIGHAM, D.F. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. **New Phytologist**, 154:797–807, 2002.
- REBORDINOS, L.; DE LA VEJA, M.P. Extent of genetic variability of endosperm esterases in *Triticum aestivum* L. $2n=6x=42$. **Theoretical and Applied Genetics**, 78:728-734, 1989.
- REGO, L.V.; FARIA, R.T. Interação genótipo x meio nutritivo na propagação *in vitro* de orquídeas nativas do Brasil. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1993, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Associação Brasileira De Melhoramento de Plantas, 2001. p. 1-3.
- RESENDE, A.G.; FILHO, P.S.V.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). **Biochemical Genetics**, 38:203-216, 2000.
- ROCHA, V.; TING, I.P. Tissue distribution of microbody, mitochondrial and soluble malate dehydrogenase isoenzymes. **Plant Physiology**, 46:754-756, 1970.
- ROCHA, V.; TING, I.P. Malate dehydrogenases of leaf tissue from *Spinacia oleracea*: properties of three isoenzymes. **Archives of Biochemical and Biophysics**, 147:114-122, 1971.
- SAENZ-ROMERO, C.; GURIES, R.P.; MONK, A. Landscape genetic architecture of *Pinus banksiana*: Allozyme variation. **Canadian Journal of Botany**, 79:871-878, 2001.
- SANFORD, W.W. The ecology of orchids. In: WITHNER, C.L. **The orchids: scientific studies**. New York: John Wiley & Sons, 1974. p. 1–100.
- SCACCHI, R.G.; DE ANGELIS, R.M.; CORBO. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 176:53–62, 1991.
- SCATENA, V.L.; NUNES, A.C. Anatomia de *Pleurothallis Rupestris* Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 15:3543, 1996.
- SELOSSE, M.A.; WEIB, M.; JANY, J.L.; TILLIER, A. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with achlorophyllous *Neottia nidus-avis* (L.)

- L.C.M. Rich and neighbouring tree Ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, 11:1831–1844, 2002.
- SHARMA, I.K.; JONES, D.L.; FRENCH, C.J. Unusually high genetic variability revealed through allozymic polymorphism of an endemic and endangered Australian orchid, *Pterostylis aff. Picta* (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 31:513-526, 2003.
- SHAW, J.; MEAGHER, T. R.; HARLEY, P. Electrophoretic evidence of reproductive isolation between two varieties of the moss *Climacium americanum*. **Heredity**, 59:337-343, 1987.
- SILVA, C.I.; MILANEZE M.A.G. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum**, 26:91-100, 2004.
- SILVA, E.F.; PASQUAL, M.; PAIVA P.D.O.; SILVA, A.B.; NOGUEIRA, D.A. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo In Vitro de orquídea. **Plant Cell Culture Micropropagation**, 1:8-12, 2005.
- SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1986. 96p.
- SINGH, F. Micropropagation of orchids *Spaihogloottis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation IV**. London: Springer – Verlag, 1992. p. 223 – 450.
- SIPES, S.D.; TEPEDINO, V.J. Reproductive biology of the rare orchid, *Spiranthes diluvialis*: breeding system, pollination, and implications for conservation. **Conservation Biology**, 9:929–938, 1995.
- SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E.L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, 21:85-91, 2006.
- SOARES, J.D.; ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; ASSIS, F.A. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro de plântulas de orquídea. **Ciência Rural, Santa Maria**, 39:772-777, 2009.

SONYA. **Orquídeas e bromélias**. Disponível em: Acesso em: <<http://www.plantasonya.com.br/orquideas-e-bromelias/cattleya-forbesii.html>>.

Acesso em: 20, janeiro, 2011.

SOUZA, C.V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SQUIRRELL J.; HOLLINGSWORTH, P.M.; BATEMAN, R.M.; DICKSON, J.H.; LIGHT, M.H.S.; MACCONAILL, M. Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). **American of Journal Botany**, 88:1409–1418, 2001.

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, 7:25-33, 2001.

STEBBINS, G.L. Introduction. In: SOLTIS, D. E., SOLTIS, P.S. Isozymes in plant biology. **Oregon-Portland**: Dioscorides Press, 1989. p. 1–3p.

STEINER, K.E. The pollination of *Disperis* (Orchidaceae) by oil-collecting bees in southern Africa. **Lindleyana**, 4:164-183, 1989.

STEINER, W.W.M.; JOHNSON, W.E. Techniques for eletrophoresis of Haeaiian *Drosophila*. US International Biological Program Island Ecosystems IRP. **Technical Report**, 30:1-21, 1973.

STORT, M.N.S. Cruzamentos artificiais envolvendo espécies de gênero *Cattleya*, subgêneros *Monophyllae* e *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciência e Cultura**, 35:1481–1486, 1983.

STORT, M.N.S. Fertilidade de cruzamentos e relação filogenética entre algumas espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 9:69–73, 1986.

STORT, M.N.S.; MARTINS, P.S. Autopolinização e polinização cruzada em espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciência e Cultura**, 32:1080-1083, 1980.

- STORT, M.N.S.; PAVANELLI, E.A.S. Crossing systems in *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Revista Biologia Tropical**, 34:59–62, 1986.
- SUN, M. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. **American Journal of Botany**, 84:224–232, 1997.
- SUN, M.; WONG, K.C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, 88:2180–2188, 2001.
- SUNDARAM, T.K.; WRIGHT, I.P.; WILKINSON, A.E. Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology, and catalytic activity. **Biochemistry**, 19:2017-2022, 1980.
- SUTTLEWORTH, F.S. **Orquídeas**: guia dos orquidófilos. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1997. 158p.
- SUZUKI, S.O.S. **Orquídeas**. Disponível em: <<http://eptv.globo.com/terradagente/NOT,0,0,287675,S-O-S-+Orquideas.aspx>>. Acesso em: 20, março, 2011.
- TANKSLEY, S.D.; RICK, C.M. Genetics of esterases in species of *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, 56:209-219, 1980.
- TRAPNELL, D.W.; HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. **Molecular Ecology**, 13:1111-1118, 2004.
- TREMBLAY, R.L. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Canadian Journal of Botany**, 70:642–650, 1992.
- TREMBLAY, R.L.; ACKERMAN, J.; ZIMMERMAN, J.K.; CALVO, R. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, 84:1–54, 2005.
- VAN DEN BERG, C. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). **Neodiversity**, 3:3-12, 2008.

- VAN DEN BERG, C.; CHASE, M.W. Nomenclatural notes on Laeliinae-I.. **Lindleyana**, 15:115-119, 2000.
- VAN DEN BERG, C.; CHASE, M.W. A chronological view of Laeliinae taxonomical history. **Orchid Digest**, 68:226-254, 2004.
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L. 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, W.M.; SOTO-ARENAS, M.A.; CHASE, M.W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, 104:417-430, 2009.
- VAN DER PIJL, L.; DODSON, C.H. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Coral Gables: University of Miami Press, 1966. 214p.
- VARGAS, C.F.; PARRA-TABLA, V.; FEISINGER, P.; LEIRANA-ALCOCER, J. Genetic diversity and structure in fragmented populations of the tropical orchid *Myrmecophila christinae* var. *christinae*. **Biotropica**, 38:754-763, 2006.
- WALKER, C.H.; MACKNESS, M.I. Esterases: problems of identification and classification. **Biochemistry Pharmacology**, 32:3265-3269, 1983.
- WALLACE, L.E. Spatial genetic structure and frequency of interspecific hybridization in *Platanthera aquilonis* and *P. dilatata* (Orchidaceae) occurring in sympatry. **American Journal of Botany**, 93:1001–1009, 2006.
- WARCUP, J.H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New Phytology**, 87:371–381, 1981.
- WENDEL, J.F.; WEEDEN, N. . Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS P.S. (eds.). **Isozymes in plant biology**, Portland, Oregon: Discorides Press, 1989. p. 5-45.
- WERTH, C. Implementing and isozyme laboratory at a field station. **Virginia Journal of Science**, 36:53-76, 1985.

WIRTH, M.; WITHNER, C.L. Embryology and development in the Orchidaceae. In: Withner CL. (ed.) **The orchids: a scientific survey**. New York: Wiley and Sons, 1959, 155–188p.

WONG, K.C.; SUM, M. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, 86:1406–1413, 1999.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Bulletin Journal of Botany**, 1:129-157, 1999.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C.G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botânica Brasileira**, 17:101-118, 2003.