

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

BETTY CRISTIANE KUHN

**Análise de diversidade genética em *Cattleya forbesii* (Lindley)
(Orchidaceae) propagadas *in vitro***

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2011

BETTY CRISTIANE KUHN

**Análise de diversidade genética em *Cattleya forbesii* (Lindley)
(Orchidaceae) propagadas *in vitro***

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 Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2011

Aos meus pais, Vilson Kuhn e Leonides Maria Kuhn, por tudo o que fizeram pela
minha vida.

Ao meu namorado, Luiz, por estar sempre ao meu lado, mesmo nos momentos em
que fisicamente estive distante.

Aos meus irmãos, Fagner Cazuzza e Sama Beatriz.

A toda a minha família, por sempre ter me acompanhado de maneira tão amável,
sendo bons ouvintes, conselheiros e me fazendo muito feliz. Minha família, com
certeza, formam a base de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter muito mais a agradecer do que a pedir.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida.

À minha Orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, e à professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela orientação, dedicação, apoio, atenção e muitas horas de paciência.

À professora doutora Maria Aparecida Milanese Gutierre, Coorientadora deste trabalho, não apenas pelo conhecimento passado, mas, principalmente, pela confiança e primeira oportunidade de estágio na UEM.

À professora doutora Maria Cláudia R. Takasusuki, à professora doutora Sandra A. de Oliveira Collet e ao professor doutor Erasmo Renesto, por tantas contribuições em minha vida acadêmica.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação que dividiram espaço no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal e, em especial, à Letícia Oliveira Claudino, por tantos trabalhos em conjunto.

Ao senhor Laércio Pereira de Carvalho, pela paciência e cuidado com as orquídeas.

Ao meu companheiro, Luiz Carlos Wessler, por me esperar e apoiar durante tantos anos que se passaram e por tantos que ainda virão.

Aos Secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquiria Magro, pela ajuda indispensável.

A todos os meus amigos, principalmente à “turma da faculdade”, pela sincera e duradoura amizade, mesmo não estando mais tão próximos.

BIOGRAFIA

Betty Cristiane Kuhn, filha de Vilson Kuhn e Leonides Maria Kuhn, nasceu na cidade de Medianeira, estado do Paraná, no dia 03 de fevereiro de 1988.

Cursou o Ensino Fundamental, no Colégio Estadual Pedro Américo, de 1995 a 2001. O Ensino Médio cursou no Colégio Estadual Presidente Kennedy, de 2002 a 2004, ambos no município de Serranópolis do Iguaçu, estado do Paraná.

Graduou se em Ciências Biológicas – Licenciatura, em julho de 2008, pela Faculdade União das Américas (Uniamérica), em Foz do Iguaçu, Paraná, com bolsa integral do Programa Universidade para Todos (PROUNI).

No período compreendido entre 2006 e 2008, foi Bolsista do Programa Uniamérica de Iniciação Científica (PRUIC), desenvolvendo o projeto de pesquisa “Impacto da utilização de agrotóxico sobre a incidência de Câncer em Serranópolis do Iguaçu, estado do Paraná”.

Atuou como professora voluntária do Projeto Multiensino, vinculado à Faculdade União das Américas, ministrando a disciplina “Química Inorgânica”, em 2006 e 2007, e “Genética”, em 2007 e 2008.

Participou do projeto de extensão “Cultivo de Orquídeas e Bromélias – aspectos ecológicos e horticulturais”, vinculado ao museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no ano de 2008.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos gerais da família Orchidaceae.....	4
2.1.1. Morfologia	5
2.1.2. Sementes	5
2.2. Aspectos gerais das espécies do gênero <i>Cattleya</i> Lindley (Orchidaceae)	6
2.2.1. <i>Cattleya forbesii</i>	6
2.3. Comportamento populacional em orquídeas	8
2.4. Marcador molecular RAPD para estimar diversidade genética em orquídeas..	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Material vegetal	12
3.2. Extração de DNA	13
3.3. Amplificação <i>Touch Down</i> RAPD	16
3.3.1. Padronização das reações de amplificação com primers de RAPD.....	16
3.3.2. Seleção de primers	16
3.3.3. Amplificação de DNA	16
3.4. Análise dos dados obtidos.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

RESUMO

KUHN, Betty Cristiane, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2011. **Análise de diversidade genética em *Cattleya forbesii* (Lindley) (Orchidaceae) propagadas *in vitro*.** Orientadora: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

A proposta foi estabelecer a metodologia *Touch Down* RAPD (*td*-RAPD) para investigar a diversidade genética em plântulas de *Cattleya forbesii*, formadas a partir de sementes germinadas *in vitro*. É possível que a ampla variabilidade genética naturalmente descrita em estudos que analisam populações distribuídas em seus habitats naturais também possa ser observada em plântulas de *C. forbesii* produzidas a partir de sementes germinadas em *in vitro*. No *td*-RAPD, o programa para PCR foi modificado em relação ao PCR convencional. Foi usada a temperatura de 42 °C para o anelamento inicial e, em seguida, a cada ciclo ocorreu uma diminuição de 0,5 °C, até que a temperatura de 37°C fosse atingida e mantida nos ciclos seguintes. Dos 82 primers testados, doze (OPB17, OPB18, OPC02, OPC05, OPC06, OPC07, OPC08, OPC19, OPM02, OPM03, OPM05 e OPP08) foram escolhidos para amplificar o DNA de 43 plântulas de *C. forbesii* produzidas por sementes germinadas em meio KC. Estes primers amplificaram um total de 148 fragmentos. O polimorfismo entre plântulas de *C. forbesii* foi 89,19%. O primer que revelou menor polimorfismo (64,28 %) foi o OPM02, com 14 bandas, das quais cinco foram monomórficas. O primer OPC-02 gerou maior número de fragmentos, com o total de 17 fragmentos, sendo todos polimórficos; os primers OPC02, OPC07, OPC08, OPC19 e OPM03 apresentaram 100% das bandas polimórficas. A base genética das plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*, usando o meio KC foi ampla (0,50 a 0,86), indicou que o cultivo *in vitro* produz mudas desta espécie de orquídea com uma ampla variabilidade genética. O sistema de germinação e cultivo *in vitro* das sementes de *C. forbesii* não estabeleceu uma pressão de seleção que possa indicar uma redução na diversidade genética da espécie. Este sistema pode ser considerado adequado à produção de mudas para reposição de estoques a serem cultivados na natureza, ou para realizar cruzamentos preferenciais para estimular a produção de híbridos.

Palavras-chave: *Cattleya forbesii*, *in vitro*, *td*-RAPD, micropropagação, diversidade genética.

ABSTRACT

KUHN, Betty Cristiane, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, February, 2011. **Analysis of genetic diversity in *Cattleya forbesii* (Lindley) (Orchidaceae) propagated *in vitro*.** Adviser: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

The purpose of the present study was to establish the Touch Down RAPD (td-RAPD) methodology to investigate the genetic diversity of *Cattleya forbesii* seedlings obtained from seeds germinated *in vitro*. It is possible that the wide genetic variability naturally described in studies analyzing populations distributed in their natural habitats, could also be observed in seedlings of *C. forbesii* grown from seeds germinated *in vitro*. In the td-RAPD, the PCR program was adjusted, in which the annealing temperature was modified in relation to conventional PCR. A 42°C was used for the initial annealing temperature, from which the temperature decreased 0.5°C after each cycle, until the 37°C was achieved and maintained in the following cycles. From the 82 tested primers, twelve (OPB17, OPB18, OPC02, OPC05, OPC06, OPC07, OPC08, OPC19, OPM02, OPM03, OPM05 and OPP08) were chosen to amplify 43 DNA samples of *C. forbesii* seedlings produced by seeds germinated KC medium. The polymorphism among *C. forbesii* plants was 89.19%. The primer that showed less polymorphism (64.28%) was the OPM02, with 14 bands from which five were monomorphic. The OPC02 primer generated a larger number of fragments, a total of 17 fragments, all being polymorphic; the OPC02, OPC07, OPC08, OPC19 and OPM03 showed 100% of polymorphic bands. The genetic base of the seedlings grown from seeds germinated *in vitro* using KC medium was wide (0.50 to 0.86), indicating that the *in vitro* growth can produce seedlings with large genetic variability. The germination and *in vitro* growth system of *C. forbesii* seeds didn't established a selection pressure that could indicate a reduction in the genetic diversity of the specie. This system can be considered appropriate to produce seedlings for the replenishment of stocks to be grown in the wild, or with the perspective of executing assortative mating to stimulate the production of hybrids.

Key words: *Cattleya forbesii*, *in vitro*, td-RAPD, micropropagation, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

Considerando as plantas já catalogadas, a família Orchidaceae compõe 7% de todas as espécies do planeta, constituindo, aproximadamente, 35 mil espécies naturais, nas suas duas subfamílias, duas divisões, cinco tribos, duas séries, duas subséries, 85 subtribos e mais de 2.500 gêneros, além de uma infinidade de híbridos naturais e artificiais (Altafin et al., 2003).

As orquídeas apresentam muitas particularidades, inclusive espécies do mesmo gênero podem apresentar características totalmente distintas, caso, por exemplo, das características florais e método de reprodução, que podem variar desde a autofecundação até a pseudocópula de insetos atraídos por ferormônios mimetizados pela flor (Resende et al., 2008).

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 considerável importância econômica.

Os dados disponíveis na literatura especializada no que se refere às exportações de mudas de orquídeas brasileiras são do ano de 2004 (Junqueira e Peetz, 2004), documentando saídas principalmente para os Estados Unidos (24,3%), Japão (21,0%), Alemanha (20,3%), Reino Unido (12,7%) e Hong Kong (11,9%), acumulando vendas superiores a de US\$ 122 mil.

Para suprir esta demanda, a germinação das sementes e a micropropagação *in vitro* têm sido apontadas como ferramentas para a produção em larga escala em curto espaço de tempo, produzindo plantas de alta qualidade fitossanitária, independentemente da época do ano (Soares et al. 2009). As sementes de orquídeas não contêm endosperma, são pequenas, muito leves e podem ser dispersas pelo vento para longas distâncias, o que é importante para promover o fluxo de genes, entretanto, necessitam da simbiose com fungos micorrizas, devido ao fato da taxa de germinação ser baixa, fato que gera em algumas espécies um nível baixo de diversidade (Ding et al. 2008).

O meio de cultura usado na micropropagação tem sido um fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro*. Embora diferentes meios de cultivo

sejam utilizados, o meio “KC”, formulado por Knudson (1946), vem sendo o mais recomendado, até o presente, para a germinação da maioria das espécies de orquídeas.

O cultivo *in vitro* pode gerar alteração no nível de diversidade genética, que pode ser constatado com a análise molecular das plantas. Para uma análise molecular, pode ser usado o marcador RAPD que, apesar de ser um marcador dominante, apresenta vantagens, principalmente pelo grande número de segmentos de DNA marcados e por não exigir conhecimento prévio do material genético a ser estudado (Sun e Wong, 2001). Entretanto, na literatura especializada não existem registros de estudos da diversidade genética em populações de *Cattleya forbesii*. Os estudos de diversidade genética usando marcadores moleculares disponíveis na literatura foram realizados com outras espécies de orquídeas. Ding et al. (2008), analisando *Dendrobium officinales*, uma espécie de orquídea Chinesa em extinção, verificaram uma baixa diversidade genética em nível populacional, mas um alto nível de diversidade genética na espécie. Goh et al. (2005) também obtiveram taxa de similaridade intraespecífica maior do que interespecífica para 149 acessos, representando 46 espécies do gênero *Phalaenopsis*. Estes resultados demonstram que a diversidade interespecífica em orquídeas tende a ser alta.

Neste contexto, a proposta no presente estudo foi analisar a diversidade genética em plântulas de *Cattleya forbesii* provenientes de sementes germinadas *in vitro*, em meio Knudson (1946), sem a adição de reguladores de crescimento.

A estimativa da diversidade genética nas plântulas de *C. forbesii* cultivadas *in vitro* foi realizada por meio de análises de segmentos aleatórios de DNA amplificados pela técnica de *Touchdown-PCR* (*td-PCR*). A técnica *Touchdown-PCR*, desenvolvida por Don et al. (1991), é uma modificação da PCR (*Polymerase Chain Reaction*: Reação em Cadeia usando Polimerase) convencional que usa apenas uma determinada temperatura de “anelamento” para os primers. Esta técnica foi usada para analisar segmentos específicos de DNA e foi também indicada para amplificar os segmentos de DNA com primers aleatórios (Ince et al., 2009). Os primers aleatórios são empregados para analisar o polimorfismo de seqüências aleatórias de DNA (RAPD: *Random Amplified Polymorphic of DNA*; Williams et al., 1990). A finalidade da *Touchdown-PCR* é promover uma amplificação mais específica dos segmentos aleatórios de DNA. Para isso, é usada uma temperatura inicial de “anelamento” mais alta do que a comumente usada na PCR convencional. Esta

temperatura deve diminuir gradativamente 1°C a cada ciclo por segundo, até atingir uma temperatura específica de aterrissagem (temperatura de “anelamento” *touchdown*) que é então usada para amplificar os segmentos de DNA nos ciclos remanescentes. Este procedimento deve garantir um “anelamento” mais específico para os primers aleatórios, de forma a selecionar segmentos específicos para serem amplificados e aumentar a reprodutibilidade da análise do RAPD.

Nos frascos de cultura *in vitro* de *C. forbesii*, verificou-se plântulas de tamanhos diversos e a expectativa neste estudo é que o nível de polimorfismo dos segmentos de DNA aleatórios amplificados por *td*-PCR seja alto, mostrando que o sistema de germinação de sementes *in vitro* não estabelece pressão de seleção, com conseqüente redução da diversidade genética em *C. forbesii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da família Orchidaceae

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, porém, muitas destas estão correndo risco de extinção, devido à destruição de seu habitat e às coletas predatórias (Colombo et al., 2004).

As espécies do gênero *Cattleya*, são epífitas de ocorrência natural no Brasil, 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).

As orquídeas são classificadas conforme seus hábitos vegetativos em: epífitas, terrestres, rupícolas, saprófitas, dentre outros (Silva e Gutierre, 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 freqüente, 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 Gutierre, 2004).

Analisando as epífitas vasculares em floresta da planície litorânea da Ilha do Mel, Paraná, Brasil, 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%). Kersten e Silva (2001) também constataram que, na região, a orquídea *C. forbesii*, por exemplo, é uma das

espécies que mostraram preferência pelo estrato de 2-4 m da floresta analisada e é considerada uma holoepífita característica.

As orquídeas são plantas herbáceas, perenes, bastante diversificadas quanto ao tamanho, forma e cor das flores. Exibem características altamente especializadas que servem para favorecer a reprodução sexuada, com uma grande diversidade floral e também adaptação para polinizadores, sendo registrado que aproximadamente 60% das espécies de orquídeas possuem um único polinizador (Palomino e Theißen, 2009).

2.1.1. Morfologia

As flores das orquídeas possuem particularidades marcantes que desempenham importante papel na atração do agente polinizador o que, conseqüentemente, favorece a polinização cruzada (Dressler, 1993). O perianto consta de dois verticilos trímeros (3 sépalas e 3 pétalas), sendo que a pétala mediana geralmente é maior e apresenta glândulas (nectários, glândulas de óleo, osmóforos, entre outros) ou ornamentações (calos), com funções relacionadas ao processo de polinização. Por ser morfológicamente diferenciada, a pétala mediana é denominada de “labelo” (lábio, em latim), que é apresentado para baixo por ocasião da abertura da flor. Assim, o labelo pode atuar como plataforma de pouso ou guia mecânico para os polinizadores. O androceu e o gineceu encontram-se fusionados em maior ou menor grau, formando uma estrutura única denominada coluna. O número de anteras férteis em geral é muito reduzido (normalmente uma, mas raramente duas ou, muito mais raramente, três) (Singer, 2009).

2.1.2. Sementes

As sementes de orquídeas se diferenciam da maioria das outras espécies por não possuírem reservas nutritivas para promover sua germinação (Ramos, 1969), a qual ocorre, sob condições naturais, somente depois de instalada uma simbiose com fungos micorrízicos. Tal processo pode ocorrer em troncos de árvores, em rochas, ou no solo. Tal simbiose mostra-se bastante delicada, podendo não ocorrer frente à aplicação de agrotóxicos ou em condições adversas (Paula e Silva, 2002).

As sementes são muito leves e podem ser dispersas pelo vento para longas

distâncias, o que é importante para promover o fluxo de genes. Entretanto, algumas espécies possuem um nível baixo de diversidade devido ao fato da taxa de germinação ser baixa. O grande número de sementes produzidas por fruto tem sido considerado uma resposta às diversas pressões seletivas do ambiente (Ding et al., 2008).

Buscando obter a propagação *in vitro* das espécies de orquídeas, Knudson (1946) desenvolveu um meio de cultura apropriado para a germinação de sementes destas espécies na ausência de simbiose com fungos micorrizicos, sendo este o meio mais utilizado atualmente.

Diversos são os aditivos ou suplementos que podem ser adicionados ao meio de cultura conhecido como “suplementos indeterminados”, tais como: água de coco (endosperma líquido de *Cocos nucifera*), carvão ativo, polpa de frutas, em especial a banana, e os conhecidos como “suplementos determinados”, tais como reguladores de crescimento (auxinas e citocininas). Os suplementos indeterminados e determinados são usados para aumentar a taxa de germinação, crescimento, brotação, e outros fatores de interesse (Dixon, 1985).

2.2. Aspectos gerais das espécies do gênero *Cattleya* Lindley (Orchidaceae)

As orquídeas começaram a ser cultivadas em maior escala a partir de 1818, quando William Cattley de Barnet, na Inglaterra, observou a floração de uma espécie de *Cattleya* pela primeira vez na Europa. John Lindley denominou esta espécie de *Cattleya labiata*, devido ao seu labelo proeminente (Araújo, 2009). O gênero *Cattleya* tem uma distribuição geográfica ampla, desde o hemisfério norte (até a América do Sul, onde ocorre maior número de espécies. No Brasil, o gênero *Cattleya* possui representantes em todos os estados, desde o extremo norte até o Rio Grande do Sul (Araújo, 2009).

2.2.1. *Cattleya forbesii*

As plantas de *C. forbesii* (figura 1) são epífitas, encontradas em árvores, pedras e arbustos, próximo 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 2) (Groves, 2009). Em razão de seu sistema vegetativo, o gênero *Cattleya* é dividido em duas categorias: plantas

monofoliadas e plantas bifoliadas; *C. forbesii* é um exemplo de planta bifoliada (Araújo, 2009).

C. forbesii é considerada de fácil cultivo, necessitando de luminosidade intensa e apresentam um bom desenvolvimento em nível do mar até 300 m de altitude. Também precisa de umidade elevada com um período de repouso no inverno não muito rígido. Um clima variando de temperado a quente é considerado como o ideal, mas, por ser uma planta resistente, pode suportar temperaturas mais baixas no inverno (Araújo, 2009).

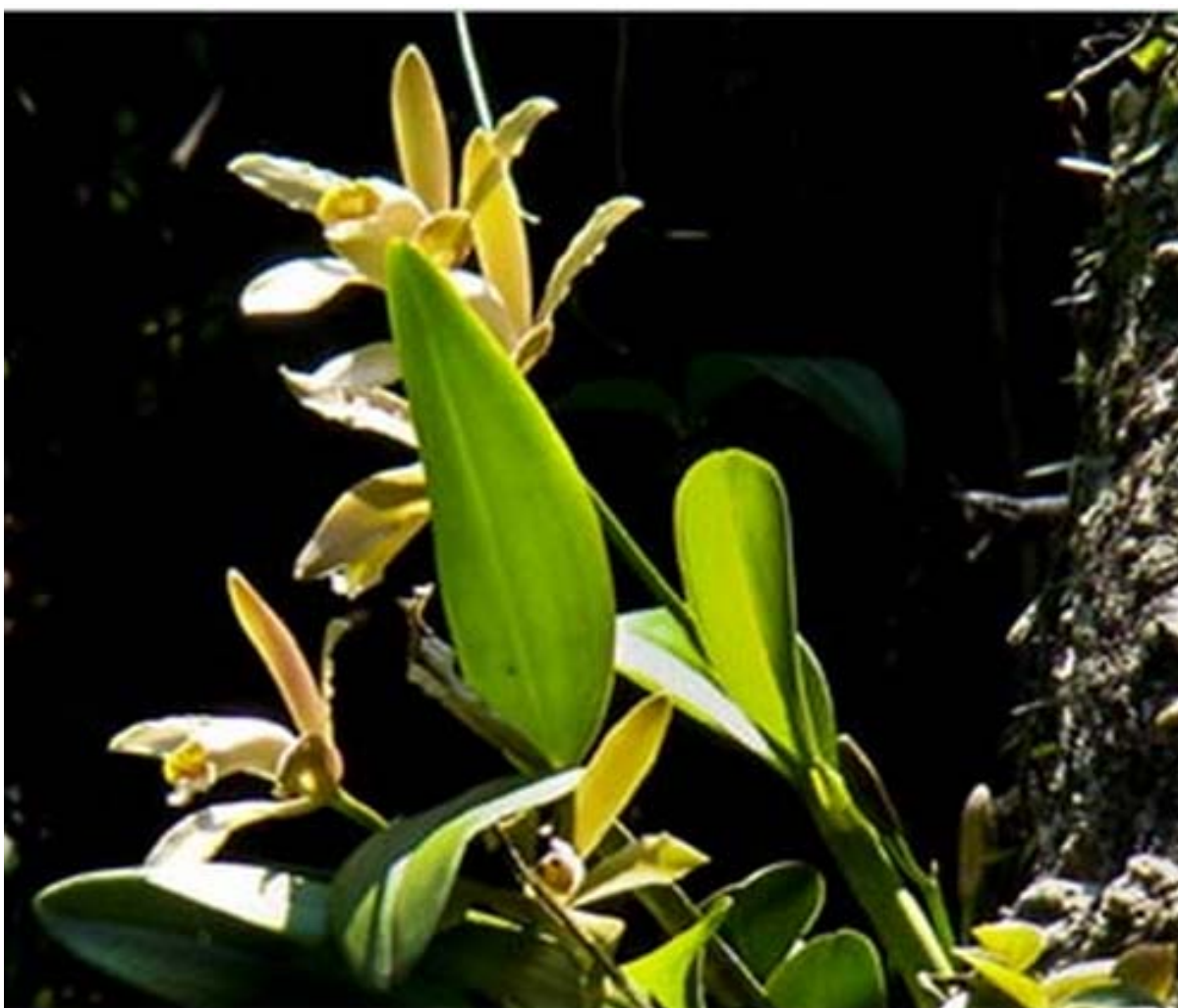


Figura 1 - *Cattleya forbesii*, fonte: Araujo, 2009.

Foi observado, também, que a autopolinização reduziu a produção de semente em orquídeas. Medindo a formação de embrião em 14 espécies de *Cattleya* alógamas, comparando o fruto produzido por autopolinização e polinização

cruzada observou-se uma média de 15,3% e 47,5% de sementes respectivamente. Embora sementes obtidas de polinização natural sejam melhores que de autopolinização, raramente alcança 100% de viabilidade. *Cattleya forbesii*, planta não autógama, apresentou uma taxa de 6,4% para auto-fecundação e 57,0% para fecundação cruzada (Tremblay et al., 2005).



Figura 2 - Flor de *Cattleya forbesii*. Foto cedida pela professora Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

2.3. Comportamento populacional em orquídeas

A maioria das espécies de orquídeas possui dependência forte por habitat e polinizadores preferenciais, por isso a perda de habitat natural pode levar uma espécie a extinção, como, por exemplo, a fecundação por um polinizador específico. Perdendo o habitat, perde-se o polinizador e conseqüentemente a orquídea não consegue se reproduzir (Singer et.al., 2004).

Ding et al. (2008), analisando *Dendrobium officinales*, uma espécie de orquídea Chinesa em extinção, verificou uma baixa diversidade genética em nível populacional, mas um alto nível de diversidade genética na espécie, provavelmente

resultantes da distribuição da população e fluxo genético limitado, principalmente devido à fragmentação e à perda de habitat. O referido autor apontou que pólen e sementes são modos eficazes de fluxo gênico em *D. officinale*. Entretanto, essa espécie é normalmente encontrada em penhascos a uma altitude entre 800 e 1.500m, sendo difícil para os polinizadores fazerem a transferência de pólen interpopulacional, outro fator determinante para a diferenciação alta entre as populações é o fato de que as sementes não possuem reserva, sendo assim, são mais leves e podem ser levadas facilmente pelo vento.

Para explicar a baixa diversidade genética intrapopulacional em espécies de orquídeas raras e ameaçadas de extinção, Chung e Chung (2007) apontaram fatores como a ocorrência de endogamia dentro das populações, deriva genética aleatória associada a um efeito do pequeno tamanho da população (efeito fundador), e/ou a combinação de alguns desses fatores. Várias técnicas têm sido empregadas para avaliar o polimorfismo das orquídeas, entre elas o marcador molecular RAPD (Besse et al., 2004; Chung et al., 2006, Goh et al., 2005 e Wallace, 2002).

Um exemplo de adaptação de orquídea e polinizador ocorre na espécie *Mormolyca ringens*. Singer et al. (2004) descreveu o comportamento de pseudocópula por um zangão (*Apidae meliponini*) sexualmente excitado por falso ferormônio liberado pela flor desta espécie. Neste caso, o polinizador pode promover inclusive a autopolinização (apesar de indicações de autoincompatibilidade nesta espécie). Esta relação é tão íntima que as orquídeas florescem no período do ano correspondente à produção de abelhas machos.

2.4. Marcador molecular RAPD para estimar diversidade genética em orquídeas

A técnica denominada de RAPD (*Random Amplified Polymorphic of DNA*; polimorfismo de DNA aleatoriamente amplificados), descrito por Williams et al. (1990), usa um único primer normalmente de dez nucleotídeos e de sequência arbitrária, que se anela (pareia) em temperaturas específicas e adequadas com as sequências complementares do DNA a ser analisado, para designar os segmentos de DNA que devem ser amplificados pela enzima *Taq* polimerase, usada para polimerizar os nucleotídeos na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A presença ou ausência dos segmentos amplificados define o polimorfismo de DNA e a proporção de segmentos polimórficos (diferentemente amplificados) é um

parâmetro para estimar a diversidade genética numa amostra de uma população ou de uma espécie (Borém, 2009).

O marcador RAPD tem sido amplamente empregado na avaliação das distâncias genéticas em muitas espécies, sendo utilizado em estudos populacionais de orquídeas (Goh et al., 2005) e para a identificação de híbridos (Liu e Cordes, 2004). Estudos populacionais comparativos utilizando métodos isoenzimáticos e RAPD têm sido considerados como necessários para obtenção de informação sobre os níveis e padrões de diversidade genética de orquídeas selvagens. Este é o primeiro passo para facilitar a sua conservação, uma vez que, quanto maior a taxa de diversidade interpoblacional, menor o risco de extinção da espécie, pois existem genótipos adaptados a diversas condições e pressões de seleção (Wong e Sun, 1999).

Em comparação com as técnicas de análises de isoenzimas e microssatélites, existem algumas limitações e deficiências na técnica de RAPD, por ser um marcador dominante e por possuir, às vezes, baixa reprodutibilidade. No entanto, Sun e Wong (2001) apontam as principais vantagens da análise de RAPD superam as suas desvantagens: pode vir a dar um número muito maior de segmentos de DNA marcados, e níveis maiores de polimorfismo comparando com isoenzimas; apresenta também um custo reduzido e é mais rápido e fácil do que a análise por microssatélites, porque não precisa da informação prévia da seqüência do DNA da espécie-alvo. De acordo com o proponente da técnica RAPD (Williams et al., 1990), este marcador pode, em alguns casos, detectar a mudança de uma única base de DNA genômico. A repetitividade do RAPD foi assegurada por Besse et al. (2004), repetindo as amplificações duas vezes, com concentrações diferentes de DNA, em análises separadas, e considerando fragmentos de pontuações fortes para obter como resultado padrões de bandas (segmentos de DNA) consistentes.

Os marcadores RAPD podem ser usados para avaliar os potenciais efeitos da fragmentação e da reduzida dimensão da população sobre a viabilidade futura das populações e possui uma ampla utilização em estudos de variação genética em populações naturais de espécies raras (Wallace, 2002). A análise de marcadores RAPD foi utilizada com sucesso para determinar a relação entre as espécies *Paphilopedilum* e *Phragmepedium* (Orquídea terrestre), apresentando resultados que confirmaram os encontrados em classificação baseada em análise morfológica (Chung et al., 2006). Sete primers (OPA03, OPA04, OPA09, OPB01, OPB08,

OPB18 e OPC11) foram utilizados por Wallace (2002) em um estudo de diversidade genética com *Platanthera leucophaea* (Orquídea terrestre). Goh et al. (2005) utilizaram 20 primers (OPU01-OPU20) para analisar similaridade genética em *Phalaenopsis* (epífita). Besse et al. (2004) utilizaram 8 primers do Kit Operon C (Operon Technologies Inc.) para a análise da diversidade das baunilhas cultivadas (*Vanilla planifolia*) e para verificar a relação entre as espécies *V. tahitensis* e *V. pompona*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os experimentos com as plântulas de *Cattleya forbesii* Lindley foram realizados no Laboratório de Cultura de orquídeas do Museu Dinâmico interdisciplinar (bloco O33) da Universidade Estadual de Maringá-PR.

As cápsulas maduras de *C. forbesii* proveniente de autofecundação coletadas em mata ciliar na cidade de Maringá-PR foram abertas para retirada das sementes, as quais foram armazenadas a -20°C durante, aproximadamente, 6 meses. Para determinar a viabilidade das sementes, foi realizado o teste de 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 de formazan, de coloração vermelha-carmim, enquanto 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 depois submersas em hipoclorito de sódio comercial a 15% por 15 minutos, visando à assepsia das mesmas, além de serem lavadas por 4 vezes com água destilada e esterilizada.

O meio de cultura básico utilizado foi a formulação “C” de Knudson (Knudson, 1946), modificado pela adição de 6 g de ágar (Himedia, “Agar Agar, Type 1”), e 100 g/L de banana nanica (estágio de maturação:7). Após autoclavar os frascos com meio de cultura durante 20 minutos em 1 atm de pressão e 120 °C, as sementes provavelmente desinfetadas foram inoculadas neste meio para germinação.

Banana nanica no estágio de maturação 7, segundo escala descritiva de maturação variando de 1 a 7, baseada na coloração da casca: 1= totalmente verde; 2= verde com traços amarelos; 3= mais verde que amarela; 4= mais amarela que verde; 5= amarela com a ponta verde; 6= toda amarela; 7= amarela com leves manchas marrons, conforme Oliveira Neto (2002).

Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura aproximada de 25 ± 3 °C e com iluminação contínua proporcionada por lâmpadas fluorescentes “luz do dia”, de 40 Watts. Após 12 meses, as plântulas

crescidas foram utilizadas para extração de DNA (figura 3).



Figura 3 - Frasco contendo plântulas de *Cattleya forbesii* germinadas *in vitro* em meio Knudson (1946), com adição de 100g de polpa de banana nanica.

3.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA, foram escolhidas aleatoriamente 43 plântulas germinadas no meio KNUDSON. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o método CTBA (*cetyltrimethylammonium bromide*) de Knapp e Chandlee (1996), adaptado por Choi et al. (2006), (Quadro 01), macerando-se 100 mg de planta fresca em nitrogênio líquido, em seguida adicionado 100 μ L de tampão de extração gelado (3% de CTAB, 1,42 M de NaCl, 20mM de EDTA, 100mM de Tris-Cl pH 8,0, 2% de PVP (polivinilpirrolidona) e 5mM de ácido ascórbico). Após homogeneizar durante 2 minutos, as amostras foram incubadas por 25 minutos em 65 °C. Após a incubação foi acrescentado na mistura o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v/v). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos com 12.000 rpm e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para um novo tubo, acrescentando 1/5 do volume de CTAB 5% em 0,7M NaCl e incubadas por 10 minutos em 65 °C. O DNA foi extraído novamente com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 minutos com 1.200 rpm. Novamente o sobrenadante contendo DNA foi transferido a um novo tubo, após

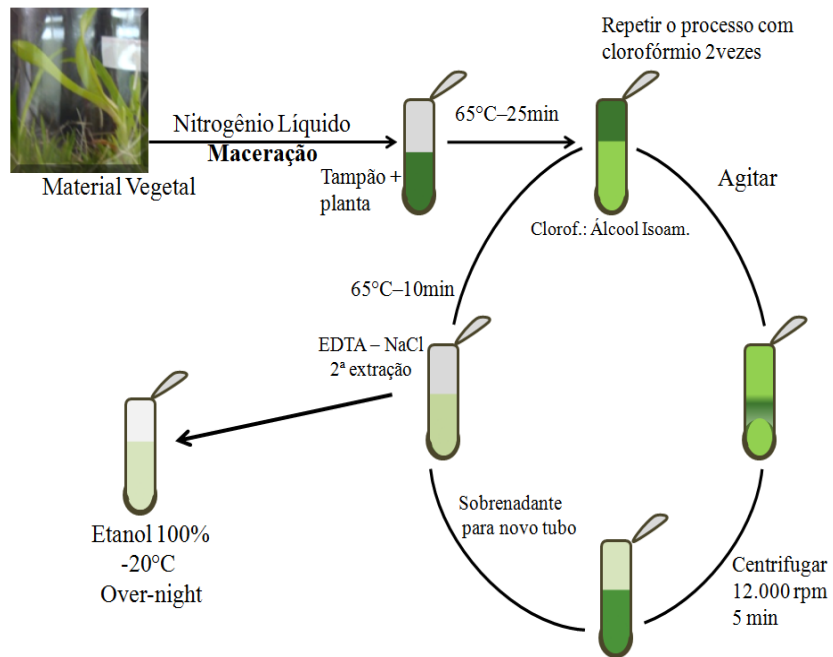
adicionar 2 volumes de etanol absoluto gelado e a mistura foi incubada por 24 horas em -20 °C. Após este tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos com 12.000 rpm em 4 °C e o precipitado foi lavado com 300 µL de etanol 70% gelado e novamente com 300 µL de etanol absoluto e colocado para secar na temperatura ambiente. Depois de seco o precipitado, foi ressuscitado com 50 µl de tampão TE e guardado em freezer (-20°C) (Figura 4).

Quadro 1 - Protocolo utilizado para extração de DNA de tecidos de plântulas de *Cattleya forbesii*

Knappe e Chandlee (1996) adaptado por Choi et al. (2006)	
Tecido da plântula	100 mg
Reagentes de Extração	
Tris-HCl	100mM
EDTA	20mM
NaCl	1,42M
CTAB	3%
PVP-40	2%
Ácido ascórbico	5mM
CTAB 5%	20% do volume
Reagentes de Purificação	
Clorofórmio:Álcool isoamílico (24/1)	1 volume
RNase (10mg/mL)	0,1ng/µL
Reagentes de Precipitação	
NaCl 5mol/L	20% do volume
Lavagem do Precipitado	
Etanol 70%	300 µL
Etanol absoluto	1ml

A quantificação do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE (Tris, Acetato de Sódio EDTA, pH 8,0 - Hoisington et al., 1984), por comparação com DNA padrão Fago λ de concentrações gradativas e conhecidas (50, 100, 150 ng). O gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 µg/mL e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminator High Performance* - Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Com base na quantificação do DNA das amostras, foram selecionadas de 43 plântulas inteiras, da população para análise através de RAPD.

Etapa 1



Etapa 2

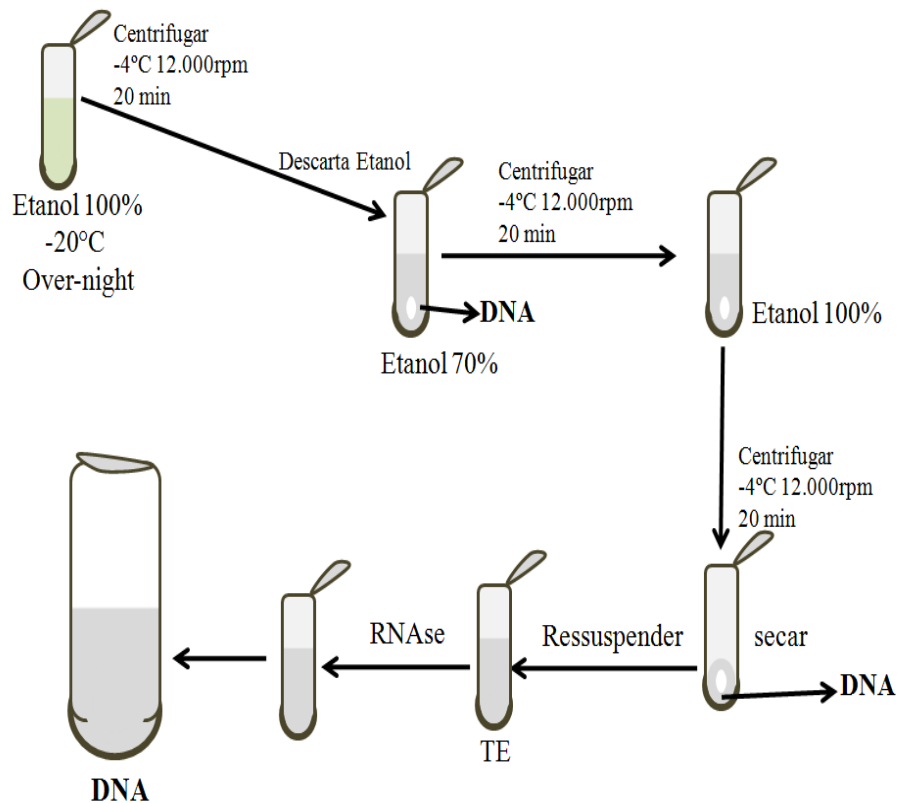


Figura 4

- Esquema do protocolo de Extração de DNA. Knappe e Chandlee (1996) adaptado por Choi et al. (2006).

3.3. Amplificação *Touch Down* RAPD

3.3.1. Padronização das reações de amplificação com primers de RAPD

Para a obtenção de fragmentos de DNA amplificados utilizando os primers de RAPD, foram selecionados aleatoriamente dois indivíduos de *C. forbesii* para padronizar as concentrações de DNA e MgCl₂ a serem utilizadas na amplificação das reações *Touch Down* RAPD (*td*-RAPD). Foram testadas as concentrações de DNA de 10, 20 e 30 ng, e de MgCl₂ 1,2; 2,0; 2,5; 3,0 mM e o melhor padrão de bandas encontrado na concentração foi de 20 ng de DNA e 2,5 mM de MgCl₂.

3.3.2. Seleção de primers

A seleção de primers foi realizada com a amplificação de amostras de DNAs dos dois indivíduos de *C. forbesii*. Foram testados os primers para RAPD desenvolvidos pela Operon Technologies Inc – Alameda, CA, USA, sendo utilizados os kits: A (1 a 20), B (1 a 20), C (1 a 20), F (5,13), L (11), M (1 a 10), P (2, 4, 7 a 11 e 17), totalizando 82 primers avaliados.

Dos 82 primers amplificados, doze amplificaram com padrão de bandas bem definidos e foram escolhidos para amplificação das 43 amostras de DNAs de plântulas de *C. forbesii*. Os primers selecionados foram: OPB17, OPB18, OPC02, OPC05, OPC06, OPC07, OPC08, OPC19, OPM02, OPM03, OPM05 e OPP08.

3.3.3. Amplificação de DNA

As reações de amplificação para os ensaios de RAPD foram feitas em um termociclador Techne TC-512, conforme o protocolo original descrito por Williams et al. (1990), com pequenas modificações no que se refere ao volume final das reações e as quantidades dos reagentes utilizados. As reações foram realizadas em câmara asséptica, em um volume final de 20 µL, contendo 20 ng de DNA genômico, 0,3 µmol/L de primers (Operon Technologies Inc,-Alameda, CA, USA), 2,5 mM de MgCl₂, 2,0 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen), 0,1 mmol/L de cada dNTP, 2,5 mmol/L de MgCl₂, 1 unidade de Taq-DNA polimerase (Invitrogen) e água mili-Q autoclavada q.s.p. Somente um “mix de reação” (com os reagentes necessários a amplificação) foi preparado para cada primer, o qual foi usado para comparar simultaneamente as 43 amostras individuais de DNA na mesma reação de amplificação (Figura 5).

O programa utilizado para realizar as ampliações foi cuidadosamente controlado para garantir a reprodutibilidade dos padrões do RAPD, conforme as recomendações de Sun e Wong (2001) para a técnica de *Touch down*-RAPD (*td*-RAPD). As ampliações do DNA das plântulas de *C. forbesii* foram realizadas com 3 min para desnaturação em 94 °C, seguido por 10 ciclos pré-PCR de 1min de desnaturação em 94 °C, 45 s de anelamento em 42 °C, e 2 min de extensão em 72°C. A temperatura de anelamento foi reduzida em 0,5 °C por ciclo, durante os 10 primeiros ciclos. As ampliações de PCR continuaram por mais 30 ciclos com uma temperatura de anelamento de 37 °C e com extensão final de 10 min em 72 °C, seguindo protocolo descrito por Ince et al. (2010).

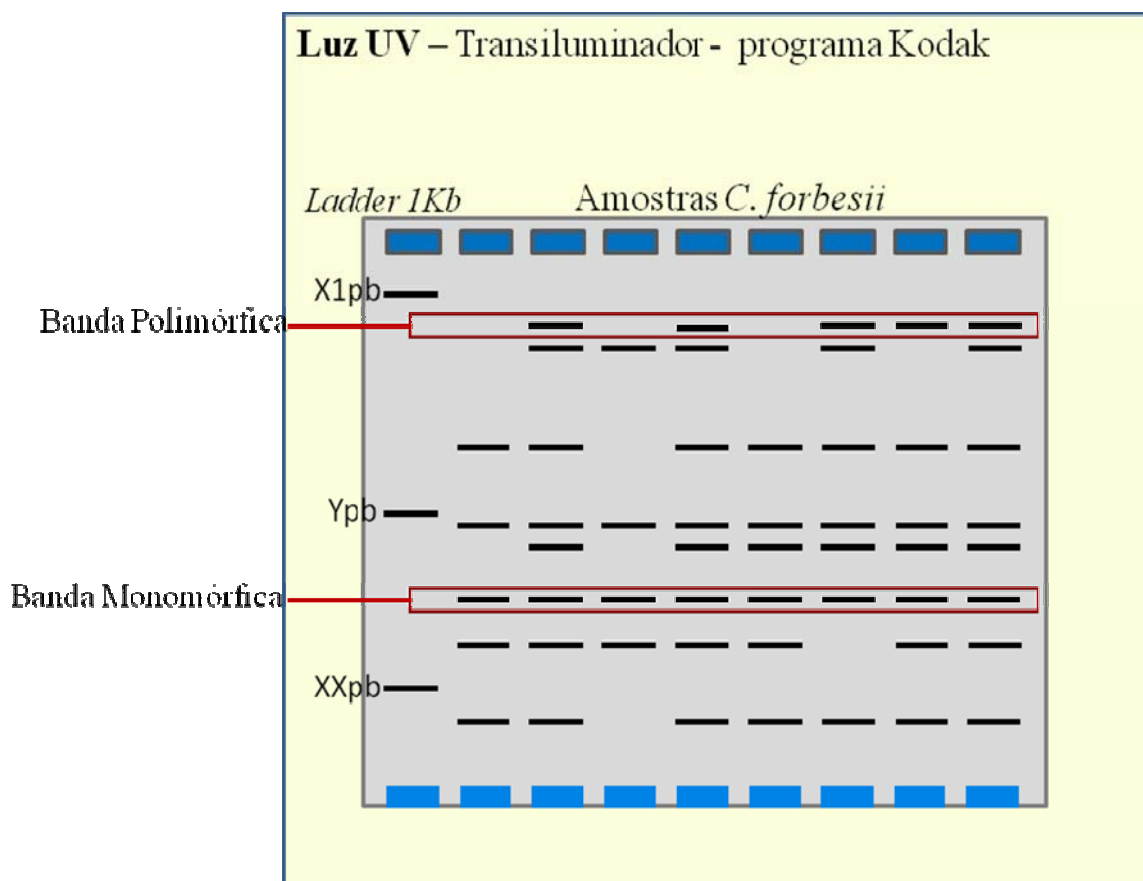


Figura 5 - Representação de Gel de agarose 1,7% com o resultado do *td*-RAPD.

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese com 60V durante 3,5 horas em gel 1,7% de agarose, preparado com um tampão TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA). O marcador de peso molecular utilizado nos géis foi o DNA *Ladder 1Kb* (Invitrogen). A identificação das

bandas foi feita incubando-se o gel em solução com brometo de etídio (EtBr) (0,5 mg/mL) e a imagem captada no *High Performance Ultraviolet Transilluminator-Edas 290*, utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

Os fragmentos foram analisados comparando-se os perfis *Touch Down* RAPD (*td*-RAPD) de cada planta em termos de presença ou ausência de cada fragmento de DNA.

3.4. Análise dos dados obtidos

Os fragmentos foram analisados por comparação do perfil RAPD de cada plântula, em termos da presença e ausência de segmentos de DNA (bandas). A similaridade entre as plântulas foi calculada usando o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Para isso foi usado o software *NTSYS-pc* (Rohlf, 1989).

A similaridade das plântulas foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, enquanto a análise do agrupamento UPGMA foi realizada com o software *NTSYS-pc* (Rohlf 1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação visual em gel de agarose 0,8% da intensidade das bandas de DNA das amostras da progênie de *C. forbesii* com as amostras de DNA do fago λ de concentração conhecida mostrou que a quantidade de DNA extraído variou de 30 a 250 ng/ μ L (Figura 6).

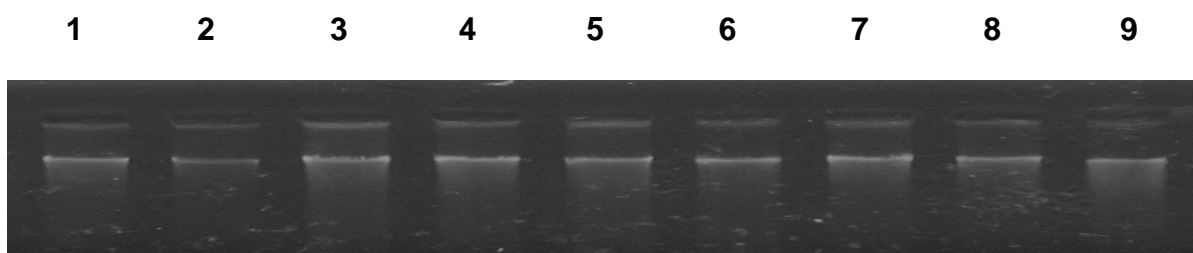


Figura 6 - Gel de agarose 0,8%, utilizado para a quantificação de DNA. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de Fago λ de 50, 100 e 150 ng respectivamente. Amostras 4 a 9 são DNAs extraídos de *C. forbesii*.

Para a padronização das condições de amplificação utilizando os primers de RAPD, foram testadas as concentrações de DNA (10, 20 e 30ng) e de $MgCl_2$ (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mM). Para isso foi utilizado o primer OPA02, pois este apresentou boa amplificação em testes anteriores. A melhor concentração de DNA testada foi a de 20 ng e a concentração de 2,5 mM de $MgCl_2$ foi a que apresentou bandas mais definidas no gel de resolução após as amplificações (Figura 7).

No *td*-RAPD, o programa para PCR sofreu adaptações, com modificação na temperatura de anelamento. Esta modificação recebeu o nome e *Touch Down* PCR. A modificação para o *Touch Down* PCR em relação ao PCR convencional consistiu em usar inicialmente uma temperatura de 42°C para o anelamento inicial e, em seguida, a cada ciclo ocorreu a diminuição de 0,5°C, até que a temperatura de 37°C fosse atingida e mantida nos ciclos seguintes. O programa *Touch Down* PCR foi utilizado por Ince et al. (2010), que o consideraram como o mais adequado para o anelamento dos primers de RAPD e concluíram que este procedimento aumenta a reprodutibilidade dos *primers* RAPD em estudo com diferentes espécies de pimenta (*Capsicum sp*). Condições ótimas de reação devem ser previamente estabelecidas para que seja garantida reprodutibilidade da técnica de RAPD (Black, 1992).

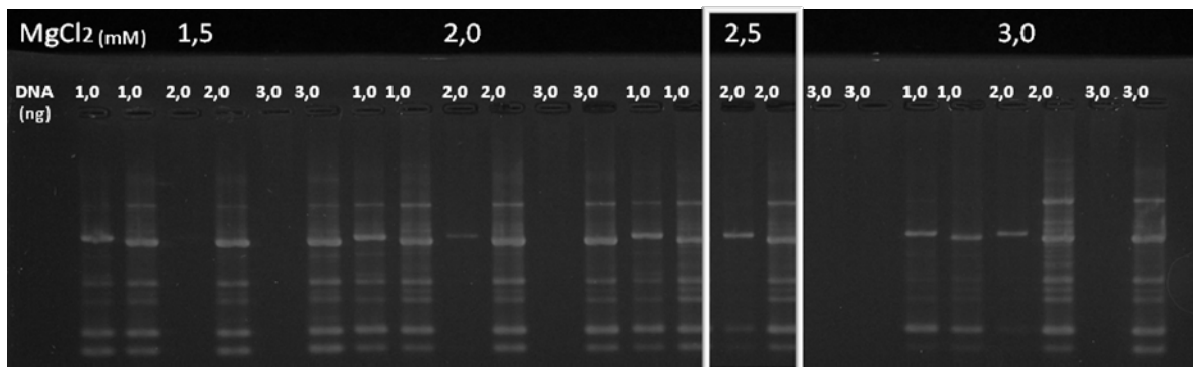


Figura 7 – Teste da concentração de $MgCl_2$ (mM) e de DNA(ng) Gel de agarose 1,7%, com tampão TBE 0,5x. Duas repetições cada concentração.

Uma vez que as condições adequadas de amplificação para *td*-RAPD foram estabelecidas, estas foram utilizadas para as reações de seleção dos primers e para posteriores amplificações do DNA das plântulas de *C. forbesii*.

Para a seleção de primers, foram amplificadas 2 amostras de DNAs com 82 primers. Destes 82 primers avaliados, doze amplificaram com padrão de bandas bem definidas e foram escolhidos para amplificar as 43 amostras de DNAs de plantas de *C. forbesii*. Os primers selecionados foram: OPB17, OPB18, OPC02, OPC05, OPC06, OPC07, OPC08, OPC19, OPM02, OPM03, OPM05 e OPP08, com uma amplificação de 7 a 17 bandas, com uma média de 12,33 bandas por primer. O aproveitamento de primers para RAPD neste trabalho foi de 14,6%. Os primers selecionados foram aqueles que produziram bandas bem definidas e reproduzíveis no gel (Figura 8).

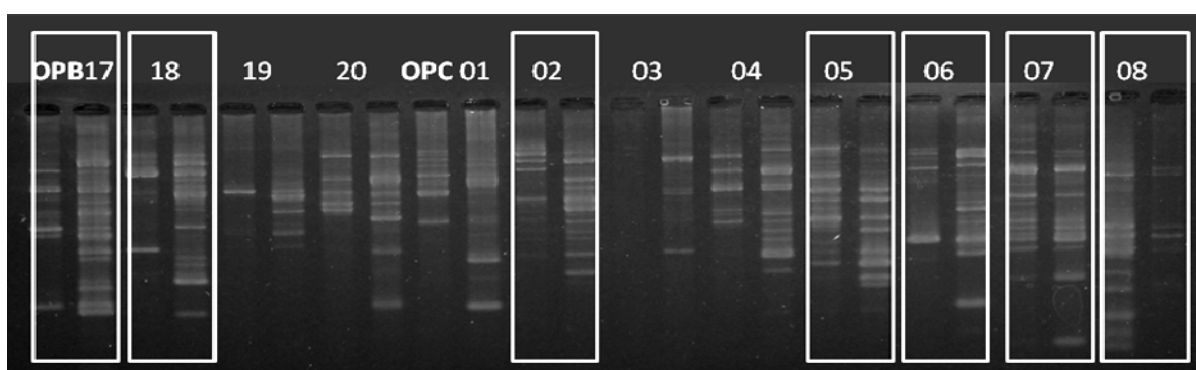


Figura 8 - Gel de agarose 1,7% utilizado para selecionar os primers que foram usados para amplificar as 43 amostras de DNA de plantas de *Catleya forbesii*. Nesta figura, estão destacados sete (OPB17, OPB18, OPC02, OPC05, OPC06, OPC07, e OPC08) dos 12 primers que foram selecionados, a partir dos 82 primers avaliados.

A Figura 9 ilustra as seqüências de DNA amplificadas com o primer OPC05, representando parte do gel de agarose usado para amplificar simultaneamente as 43 amostras da progênie.

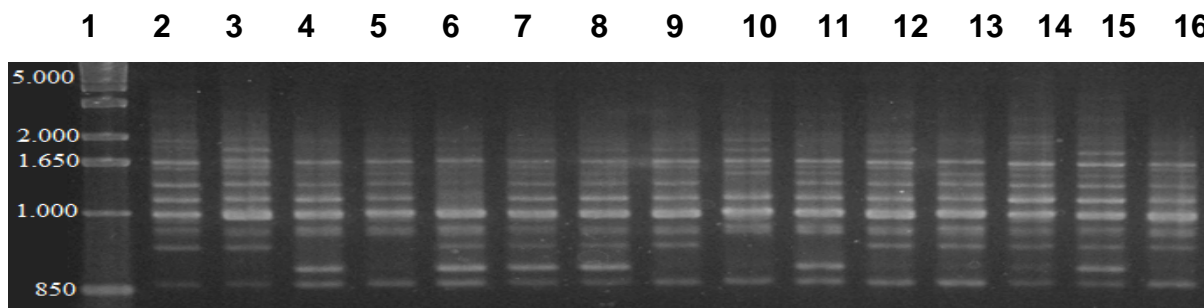


Figura 9 - Gel de agarose 1,7% utilizado para separar os fragmentos de DNA. As amostras 2 a 16 representam a população de *C. forbesii* amplificada com o primer OPC 05. A amostra 1 corresponde ao marcador 1 Kb DNA *ladder* (Invitrogen).

A amplificação do DNA das 43 amostras da população de *C. forbesii* com os doze primers selecionados resultou na produção de 148 fragmentos amplificados. Destes, 16 foram monomórficos e 132 foram polimórficos, conferindo um polimorfismo de 89,19% para as 43 plântulas de *C. forbesii*. O primer que revelou menor polimorfismo (64,28 %) foi o OPM02, com 14 bandas, das quais cinco foram monomórficas. O primer OPC-02 gerou maior número de fragmentos dentre os primers testados: um total de 17 fragmentos, sendo todos polimórficos. Os primers OPC-02, OPC-07, OPC-08, OPC-19 e OPM-03 apresentaram 100% das bandas polimórficas (Quadro 2).

O polimorfismo (variação entre presença e ausência de determinada banda de DNA nas 43 plântulas analisadas) entre plantas de *C. forbesii* é grande, pois um grande número de bandas polimórficas foi detectado, com apenas 16 primers.

A matriz binária de dados obtidos por meio da leitura dos géis resultantes das ampliações *td*-RAPD foi submetida a análises utilizando o programa NTSYS e empregando o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard.

Com a análise do polimorfismo dos marcadores *td*-RAPD para as 43 amostras individuais de plantas de *C. forbesii*, foi possível a construção do agrupamento apresentado na Figura 10. O dendrograma foi construído usando o programa NTSYS e identificou as plântulas de *C. forbesii* com maior (86%) e menor (50%) similaridade genética entre seus segmentos de DNA amplificados no método *td*-RAPD. A base genética das plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*

usando o meio KC foi ampla (0,50 a 0,86), indicando que o cultivo *in vitro* pode produzir mudas de *C. forbesii* com uma ampla variabilidade genética, sendo a similaridade entre a maioria (95%) das mudas menor do que 0,85. O nível de identidade genética inferior a 0,85 foi considerado por Thorpe e Solé-Cava (1994) como sendo freqüentemente encontrado para espécies geograficamente distantes em processo de especiação, ou para espécies co-genéricas (espécies diferentes do mesmo gênero). De acordo com o postulado pelos referidos autores, a diversidade genética em *C. forbesii* é tão ampla quanto seria se estivessem sendo comparadas plantas de espécies diferentes de um determinado gênero.

Quadro 2 - Número e freqüência dos fragmentos polimórficos, obtido para cada primer utilizado para amplificar o DNA das plantas de *C. Forbesii*

Primer	Sequência (5'-3')	N. Total de bandas	Bandas polimórficas
OPB17	AGGGAACGAG	16	14 – 87,5%
OPB18	CCACAGCAGT	13	12 – 92,3%
OPC02	GTGAGGCGTC	17	17 – 100%
OPC05	GATGACCGCC	13	10 – 76,9%
OPC06	GAACGGACTC	9	07 – 77,8%
OPC07	GTCCCGACGA	11	11 – 100%
OPC08	TGGACCGGTG	16	16 – 100%
OPC19	GTTGCCAGCC	8	8 – 100%
OPM02	ACAACGCCTC	14	9 – 64,3%
OPM03	GGGGGATGAG	7	7 – 100%
OPM05	GGGAACGTGT	9	8 – 88,9%
OPP08	ACATCGCCCA	15	13 – 86,7%
Total		148	132 – 89,19%

Oliveira et al. (2010) também encontraram um alto índice de polimorfismo analisando espécies do gênero *Catasetum*, onde o polimorfismo interpopulacional entre 37 e 83%. Com os dados obtidos, os autores concluíram que os altos índices de polimorfismos de RAPD obtidos permitem que este marcador seja utilizado tanto para determinar relações no gênero quanto identificação do polimorfismo interespecífico em *Catasetum*.

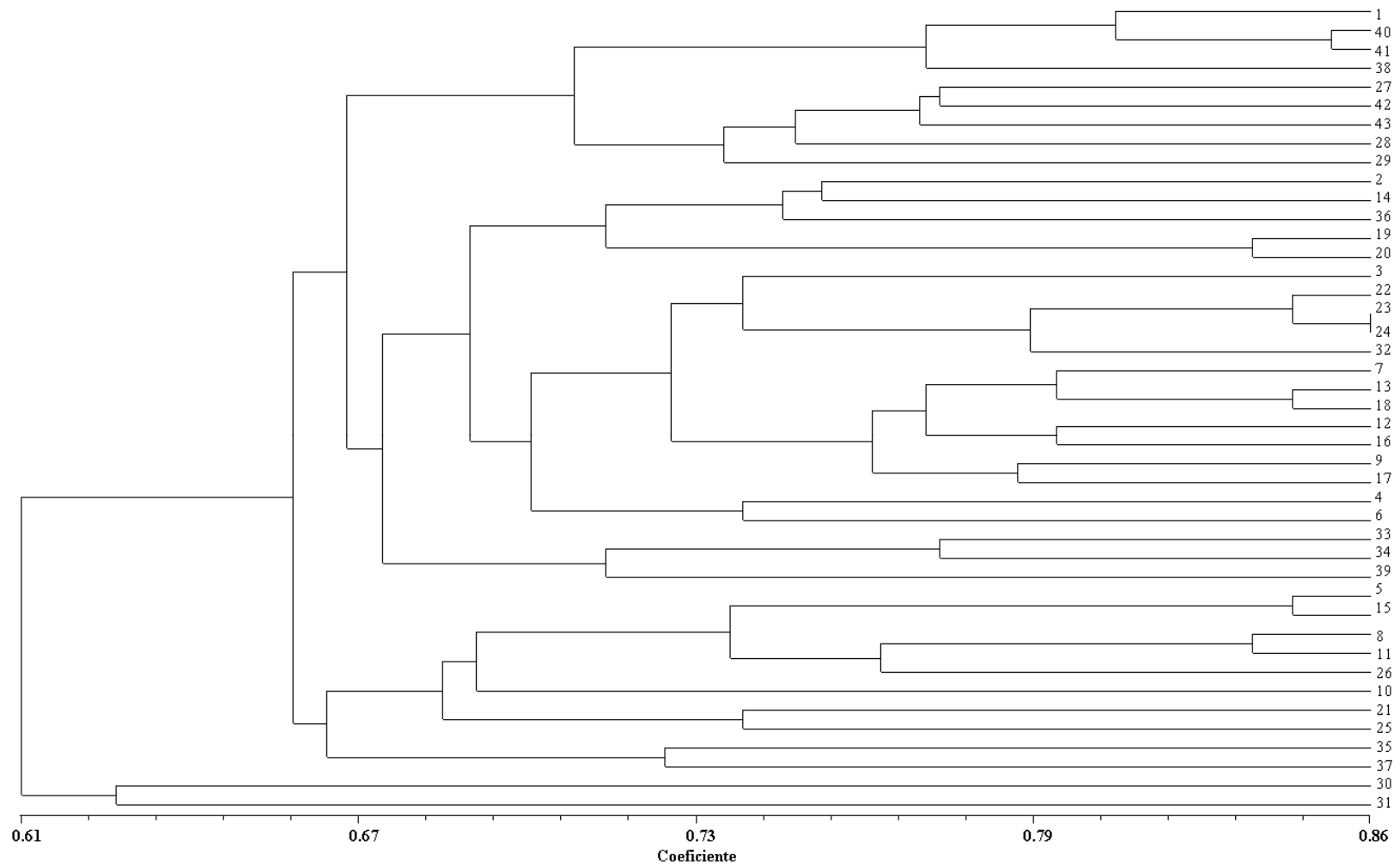


Figura 10 - Dendrograma representa a relação entre plantas de *C. forbesii* baseado na análise de agrupamento UPGMA dos perfis RAPD derivados de 12 primers, pelo coeficiente de similaridade de Jaccard.

Para outras espécies de orquídeas o polimorfismo em nível de DNA tem sido menor. Forrest et al. (2004) analisaram DNA de cloroplastos com os marcadores moleculares AFLP e microssatélite e encontraram em *Spiranthes romanzoffiana* uma baixa taxa de diversidade interpopulacional (10,8%). Dois grandes grupos foram analisados (norte e sul) e a taxa de diferenciação entre os grupos foi de 85,8%, sendo que, entre as populações dentro dos grupos, a diferenciação foi baixa: 3,5%. Sun e Wong (2001), analisando marcadores RAPD em espécies do gênero *Zeuxine*, também encontraram uma taxa de variação genética: 21,65% em *Zeuxine gracilis*; 17,82% em *Z. strateumatica*; 2,84% em *Eulophia sinensis*.

O polimorfismo alto (86%) de segmentos aleatórios de DNA amplificados por *td*-PCR (*td*-RAPD) 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. Os estudos com RAPD para analisar diversidade genética em orquídeas são poucos e estes focalizam espécies de gêneros diferentes. O polimorfismo de segmentos aleatórios de DNA amplificados por PCR, verificado em outras espécies, também tem sido alto e freqüentemente associado a sistemas de polinização variáveis e complexos, encontrados em diferentes espécies de orquídeas, como descrito em *Zeuxine gracilis*; *Z. strateumatica*; *Eulophia sinensis* (Sun e Wong, 2001), *Vanila* (Verma et al. 2009); *Dendrobium officinales* (Ding et al. 2008) e *Dendrobium londgesii* (Cai et al., 2011).

Verma et al. (2009) também encontraram um polimorfismo alto, estudando orquídeas do gênero *Vanila*. Utilizando o marcador RAPD, a taxa de polimorfismo interespecífica foi de 83,24% e com marcador ISSR a taxa foi de 86,11%. Ding et al. (2008), analisando *Dendrobium officinales*, uma espécie de orquídea Chinesa em extinção, verificaram uma alta taxa de diversidade em nível de espécie (88,07%) e em nível populacional (51,68%). Duffy et al. (2009) encontraram variação de interpopulacional de 72% em *Neotinea maculata* da Irlanda e Itália. Goh et al. (2005) também obtiveram taxa de similaridade intraespecífica maior do que interespecífica para 149 acessos, representando 46 espécies do gênero *Phalaenopsis*.

Cai et al (2011) analisaram com o marcador molecular SRAP, sete

populações de *Dendrobium loddigesii* coletadas no sul da China e constataram que a percentagem de polimorfismo interpopulacional variou de 27,71% a 68,83%, embora a variação entre as populações tenha sido baixa. Os autores apontaram que os altos níveis de diversidade dentro da população e menor diferenciação genética entre as populações podem estar associados com características únicas de muitas orquídeas, como as estratégias de polinização enganosa e a alta dispersão das sementes, que podem promover o fluxo gênico entre as populações citadas por Hamrick e Godt (1996).

A ampla diversidade genética verificada em *C. forbesii* poderia ser justificada por um sistema preferencial de polinização cruzada e também pela ocorrência de cruzamentos interespecíficos. Em duas espécies do gênero *Cattleya* (*C. tenuis* e *C. elongata*), Smidt et al. (2006) evidenciaram que há semelhanças entre as flores de ambas as espécies, que estas possuem o mesmo agente polinizador (*Bombus brevivillius*), apresentam compatibilidade entre seus gametas, mas apresentam produção de frutos diferenciada. Os estudos de 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 diversidade genética alta estimada a partir da análise do sistema *td*-RAPD.

A informação mais importante no presente estudo é que a ampla variabilidade genética naturalmente descrita em estudos que analisam populações distribuídas em seus habitats naturais também é observada em plântulas produzidas a partir de sementes germinadas em meio básico KC (Knudson, 1946). 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, ou com a perspectiva de realizar cruzamentos preferenciais para estimular a produção de híbridos em programas de melhoramento, não estabelece uma pressão de seleção que pode indicar uma redução na diversidade genética da espécie.

Outro aspecto interessante, no presente estudo, é que os primers OPC02, OPC07, OPC08, OPC19, OPM03, OPB18, OPM05, OPP08, OPB17, que foram mais polimórficos ou resultaram em um número maior de regiões de DNA amplificadas (número maior de bandas), podem ser indicados para: estudos de

diversidade genética em populações naturais, estimar a divergência entre populações, ou para verificar os efeitos de adição de suplementos, naturais ou sintéticos, para aumentar ou restringir a variabilidade genética de plântulas de *C. forbesii* quando cultivadas *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

a) A base genética das plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* usando o meio KC foi ampla (0,50 a 0,86), indicando que o cultivo *in vitro* produz mudas desta espécie de orquídea com uma ampla variabilidade genética.

b) O sistema de germinação e cultivo *in vitro* das sementes de *C. forbesii* não estabelece uma pressão de seleção que pode indicar uma redução na diversidade genética da espécie. A ampla variabilidade genética naturalmente descrita em estudos que analisam populações distribuídas em seus habitats 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 a serem cultivados na natureza, ou com a perspectiva de realizar cruzamentos preferenciais para estimular a produção de híbridos em programas de melhoramento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAFIN, V.L.; MENEZES, M.O.; LIMA FILHO, R.R.; PITOMBO, L.M. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. Espírito Santo do Pinhal: Unipinhal**, 2003. 14p. (Boletim Técnico, 7).
- ARAÚJO, D. **Brasilian orchids**. <http://www.delfinadearaujo.com/generos/cattleya/cat01.htm>. Acesso em: 23, outubro, 2009.
- BESSE, P.; SILVA, D.; BORY, S.; GRISONI, M.; BELLEC, F.L.; DUVAL, M.F. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompon*. **Plant Science**, 167:379–385, 2004.
- BLACK IV, W.C.; DUTEAU, N.M.; PUTERKA, G.J.; NECHOLS, J.R.; PETTORINI, J.M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomol. Research**, 82:151-9, 1992.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2009, 374p.
- CAI, X.; FENG, Z.; ZHANG, X.; XU, W.; HOU, B.; DING, X. Genetic diversity and population structure of an endangered Orchid (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) from China revealed by SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, 129:877-881, 2011.
- CHOI, S.H.; KIM, M.J.; LEE, J.S.; RYU, K.H. Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within species of oriental cymbidiums based on RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, 108:79-85, 2006.
- 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, S.Y.; CHOY, S.H.; KIM, M.J.; YOON, K.E.; LEE, G.P.; LEE, J.S.; RYU, K.H. Genetic relationship and differentiation of *Paphilopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, 109:153-159, 2006.
- COLOMBO L.A.; FARIA, R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M.; FONSECA,

I.C.B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, 6:253-258, 2004.

COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? **TRENDS in Ecology and Evolution**, 20:487-494, 2005.

DING, G.; ZHANG, D.; DING, X.; ZHOU, O.; ZHANG, W.; LI, X. Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis. **Plant System Evolution**, 276:149-156, 2008.

DIXON, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. IRL Press Limited, Oxford: England, 1985.

DUFFY, K.J.; SCOPECE, G.; COZZOLINO, S.; FAY, M.F.; SMITH, R.J.; STOUT, J.C. Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. **Annals of Botany**, 104:507–516, 2009.

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

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.

GOH, M.W.K; KUMAR, P.P.; LIM, S.H.; TAN, H.T.W. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (*Epidendroideae*: Orchidaceae). **Euphytuca**, 141:11-22, 2005.

GROVES, D. **WSBE orchids**, <http://wsbeorchids.org.uk/wp-content/uploads/2009/01/cattleya%20fobesii.pdf>. Acesso em: 23, outubro, 2009.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 351:1291–1298, 1996.

- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. México: CIMMYT; 1994, 50p.
- INCE, A.G.; KARACA, M.; ONUS, A.N. Genetic Relationships Within and Between Capsicum Species. **Biochemical Genetics**, 48:83–95, 2010.
- JERSÁKOVÁ, J.; JOHNSON, S.D.; KINDLMANN, P. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. **Biological Reviews**, 81:219–235, 2006.
- JUNQUEIRA, AH.; PEETZ, MS. Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil. Campinas: **Ibraflor/Hortica**, 2004. 5p.
- 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
- KNAPP, J.E.; CHANDLEE, J.M. RNA/DNA mini-prep from single sample of orchid tissue. **BioTechniques**, 21:54-56, 1996.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, 15:214 -217, 1946.
- LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, 238:1–37, 2004.
- NADKARNI, N.M. An ecological overview and checklist of vascular epiphytes in the Monteverde cloud forest reserve, Costa Rica. **Brenesia**, 24:55-632, 1986.
- OLIVEIRA, R.R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botânica Brasileira**, 18:793-799, 2004.
- OLIVEIRA, L.V.R.; FARIA, R.T.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; SANTOS, M.O.; CARVALHO, V.P. Genetic Analysis of Species in the Genus *Catasetum* (ORCHIDACEAE) using RAPD Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53:375-387, 2010.
- OLIVEIRA NETO, O.C. **Maturação e conservação sob atmosfera modificada de Bananas Prata, Pacovan e Nanicão tratadas póscolheita com 1-metilciclopropeno (1-MCP)**. Areia: Universidade Federal da Paraíba, 2002. 155p. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

- PALOMINO, M.M.; THEIBEN, G. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. **Annals of Botany**, 104:583–594, 2009.
- PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de orquídeas**. Viçosa: UFV, 2002. 63p.
- RAMOS, M.S.S. **A orquídea e sua reprodução pela semente**. Campinas: Indústria Gráfica Saraiva, 1969, 103p.
- RESENDE, H.C.; BARROS, F.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. **Neotropical Entomology**, 37:609-611, 2008.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 1.80. Setauket, NY: Exeter Software, 1989.
- SILVA C.I.; GUTIERRE, M.A.M. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 26:91-100, 2004.
- SILVA, E.F.; PASQUAL, M.; PAIVA P.D.; SILVA, A.B.S.; 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.
- SINGER, R. **Orquídeas: diversidade e morfologia geral**. <http://www.webbee.org.br/singer/01.htm>. Acesso em: 03, dezembro, 2009.
- SINGER, R.; FLACH, A.; KOEHLER, S.; MARSAIOLI, A.J.; AMARAL, M.C. Sexual Mimicry in *Mormolyca ringens* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae: Maxillariinae). **Annals of Botany**, 93:755-762, 2004.
- 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**, 39:772-777, 2009.

- SUN, M.; WONG, K.C. Genetic structure of tree orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, 88:2180-2188, 2001.
- THORPE, J.P.; SOLE-CAVA, A.M. The use of electrophoresis in Invertebrate taxonomy. **Zoologica Scripta**, 23:3-18 1994.
- 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.
- VERMA, P.C.; CHAKRABARTY, D.; JENA, S.N.; MISHRA, D.K.; SINGH, P.K.; SWANT, S.V.; TULI, R. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR. **Industrial crops and products**, 29:581-589 2009.
- WALLACE, L.E. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): Inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Species Biology**, 17:37-49, 2002.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFTASKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6335, 1990.
- WONG, K.C.; SUN, M. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, 86:1406-1413, 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.