

**GRUPAMENTO DE PROGÊNIES OBTIDAS DE CRUZAMENTOS
ENTRE CLONES CERÚLEOS DE *Cattleya walkeriana*
POR MEIO DE RAPD**

MILÉIA RICCI PICOLO

**GRUPAMENTO DE PROGÊNIES OBTIDAS DE CRUZAMENTOS
ENTRE CLONES CERÚLEOS DE *Cattleya walkeriana*
POR MEIO DE RAPD**

MILÉIA RICCI PICOLO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos pra obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto.

584.4
P598g

Picolo, Miléia Ricci.

Grupamento de progênies obtidas de cruzamentos entre clones cerúleos de *Cattleya walkeriana* por meio de RAPD / Miléia Ricci Picolo – Presidente Prudente, 2008.
34 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2008.

Bibliografia

1. Genética molecular.
2. Marcadores RAPD.
3. *Cattleya walkeriana*. I. Título.

MILÉIA RICCI PICOLO

**GRUPAMENTO DE PROGÊNIES OBTIDAS DE CRUZAMENTOS
ENTRE CLONES CERÚLEOS DE *Cattleya walkeriana*
POR MEIO DE RAPD**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Presidente Prudente, 26 de novembro 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dra. Ana Claudia Pacheco
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Dr. Rogério Fernandes de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Londrina - PR

À minha mãe Conceição, minha
tia Doralice e minha irmã Malena
por sempre proporcionarem as
condições necessárias para
meus estudos, por todo o carinho
e incentivo.

Ofereço

A Deus

Dedico

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por cada aprendizado e por me manter sempre firme em meus propósitos;

À Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, pela oportunidade de aperfeiçoamento;

Ao professor Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, pela orientação, por todos os ensinamentos e confiança depositados em mim durante a realização deste trabalho;

Às professoras do programa de pós-graduação em Agronomia, Ana Claudia Pacheco e Ceci Castilho Custódio pelas preciosas sugestões ;

Às funcionárias dos laboratórios de Genética Molecular e Citogenética, Luciana Machado Guaberto e Ana Cristina Messas, e a Márcia Guaberto do laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Unoeste agradeço o carinho e a ajuda;

Aos meus amigos de mestrado, em especial a Rita de Cássia Alves Nunes, Agnaldo Masao Sato, Silvério Takao Hosomi, Brigiane Longui, Renato Tadeu Guerreiro e Isa Luchini, agradeço pela amizade sincera.

À minha família e aos meus amigos pessoais pelo apoio.

À todos aqueles que confiaram em mim e de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

RESUMO

Grupamento de progênies obtidas de cruzamentos entre clones cerúleos de *Cattleya walkeriana* por meio de RAPD

Cattleya walkeriana é amplamente cultivada por colecionadores e tem recebido especial atenção dos melhoristas por apresentar variações na forma da coloração que são raras de serem obtidas, e possuem grande valor visual. Marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) são um dos tipos de marcadores moleculares mais utilizados em estudos genéticos por apresentarem vantagens como a utilização de baixa quantidade de DNA genômico, ausência de hibridação, emprego de amplificação gênica além de baixo custo e fácil execução. Para a realização deste trabalho, foi extraído DNA de diversas plantas de *Cattleya walkeriana*, plantas nativas e de progênies, obtidas de outras plantas de forma cerúlea, cujo DNA foi amplificado por marcadores RAPD selecionados. A partir das bandas geradas foi possível estimar o índice de fixação alélica (F_{ST}) e construir um dendrograma das amostras. Determinou-se que *Cattleya walkeriana* é uma espécie alógama e que houve diminuição da variabilidade genética dentro dos cruzamentos à medida que plantas recessivas de mesmo fenótipo foram utilizadas. Plantas cerúleas são de difícil obtenção, pois apresentam todos os pares de genes na forma recessiva. A herança para a característica em questão é oligogênica e determinada por genes que atuam de maneira complementar e são de segregação independente.

Palavras chave: Orquídea; Marcadores de DNA; F_{ST}

ABSTRACT

Offspring grouping in cerulean clones crosses of *Cattleya walkeriana* by RAPD markers

Cattleya walkeriana is widely grown by collectors and receive special attention by the breeders because it exhibit a rare colour variation and a great visual effect. RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) are one of the molecular markers most used in genetic studies. They have advantages, such as low amount of genomic DNA, hybridization absence, gene amplification at low costs and easy implementation. The DNA extracted from *Cattleya walkeriana* plants, wild and from cerulean offsprings, was amplified by elected RAPD primers. With the generated bands it was possible to estimate the fixation allelic index (F_{ST}) and to construct a dendogram. It could be inferred that *Cattleya walkeriana* is an allogamous species and that was a decrease in the genetic variability among the crosses as the recessive plants were used. Cerulean plants are difficult to obtain since they have all the pairs of genes in the recessive form. The inheritance for the trait in question is oligogenic and determined by genes that act in a complementary manner and are segregated independently.

Terms indexation: Orchid; DNA markers. F_{ST} .

LISTA DE SÍMBOLOS

P1 e P2	parentais 1 e 2
F1	primeira geração de filhos
F2	segunda geração de filhos
RC1	retrocruzamento 1
rpm	rotações por minuto
EDTA	etilenodiamino tetraacetato
g	Gramas
H	Hora
°C	grau Celsius
min	Minutos
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mg/L	miligrama por litro
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanograma
ng. μL	nanogramas por microlitro
pH	potencial de Hidrogênio
V	Volts
cm	Centímetros
Fst	Índice de fixação alélica

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	11
2MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 MATERIAL VEGETAL	17
2.2 DESCRIÇÃO DOS CRUZAMENTOS	17
2.2.1 Geração F1	17
2.2.2 Geração F2	18
2.2.3 Geração RC1	18
2.2.4 Testemunhas.....	18
2.3 Extração de DNA.....	19
3RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
5CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXOS	33

1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Orchidaceae* foram inicialmente utilizadas como plantas medicinais e posteriormente a partir do século XVIII, como plantas ornamentais. Um dos aspectos mais importante das orquídeas é o seu uso como plantas ornamentais e flores de corte em buquês, como as grandes e ostentosas flores de *Cattleya* e *Phalaenopsis* além das mais modestas flores de *Cymbidium*, *Dendrobium* e *Oncidium*. O cultivo de orquídeas está crescendo comercialmente nas Américas, Europa e Ásia (AMERICAN ORCHID SOCIETY, 2003)

O comércio de orquídeas, como planta de vaso ou flor de corte, é bastante significativo e tem crescido ano a ano. Nos Estados Unidos, ultrapassou US\$ 144.000.000,00 no ano de 2005 (AMERICAN ORCHID SOCIETY, 2006), pulando para US\$ 171.012.000,00 em 2006 e se aproximou dos US\$ 181.000.000,00 (NASS, 2008), Clones de algumas espécies de orquídeas tendem a ter preços elevados, chegando, em casos especiais, a serem avaliados em alguns milhares de dólares por planta.

O cultivo de orquídeas como plantas ornamentais começou por volta do século XIX (BLACK, 1984) sendo as plantas exclusivamente oriundas de coletas nas América e Ásia tropicais e as plantas sobreviventes, multiplicadas por divisões ou por sementeiras que geravam poucos indivíduos (KNUDSON, 1922). Em 1943, as soluções nutritivas para a cultura de plantas foram estabelecidas (KNUDSON, 1943), sendo que apenas em 1946 um meio eficiente para a germinação *in vitro* de *Cattleyas* e alguns gêneros aparentados foi descrito (KNUDSON, 1946). Após este evento, a propagação em larga escala, via sementes, acarretou um grande aumento na multiplicação destas plantas e conseqüentemente no melhoramento das mesmas, seja por hibridação, seja por seleção dentro das espécies.

Cattleya walkeriana pertence ao grupo das *Cattleyas* unifoliadas e dentro de seu gênero pode ser considerada uma espécie de pequeno porte. Possui bulbos fusiformes e formados por três entrenós. Os entrenós no rizoma são curtos, o que faz com que os pseudobulbos sejam próximos uns dos outros. Possui raízes longas, grossas e muitas vezes ramificadas (SILVA; GUTIERRE, 2004).

Cattleya walkeriana 'Gardner' é mundialmente conhecida e apreciada pelos belíssimos clones e híbridos que tem produzido. Encontra-se nas regiões mais

diferentes do Brasil, seja crescendo sobre pedras, em Goiás, ou sobre árvores, nos Estados de São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais, sempre próximas às águas de lagos, rios ou pântanos sendo plantas de cultivo extremamente fácil. As flores desta espécie vão de 10 a 12 cm com pétalas e sépalas lilases, variando a tonalidade. Seu labelo é branco no centro e magenta ou rosa purpúreo no restante, sendo a zona marginal escura (WITHNER, 1988). As variações das tonalidades naturais mais importantes são a alba, a semi-alba e a cerúlea (*coerulea* - que no latim quer dizer azulada). Isso faz com que esta espécie seja amplamente utilizada no mercado de flores e alvo de muitos melhoristas em todo o mundo, por transmitir a característica de planta pequena, sem diminuir drasticamente o tamanho da flor.

A hibridação interespecífica seguida de retrocruzamento é bastante comum na natureza, causando a introgressão de genes entre as espécies de orquídeas (WITHNER, 1988). Porém, o mau uso desta técnica tem levado ao descrédito muitos clones excepcionais por serem fraudes, como o caso da *Cattleya walkeriana* 'Kenny' que foi comercializada como *Cattleya walkeriana*, mas que na realidade tratava-se de *Cattleya dolosa*, um híbrido entre *Cattleya walkeriana* e *Cattleya loddigesii* (WITHNER, 1988).

As plantas híbridas de *Cattleya* comercializadas hoje em dia, melhoradas a partir de plantas sul-americanas, apresentam porte grande e apenas uma a duas flores por haste e são plantas tardias, levando de cinco a seis anos para a primeira floração. Isto torna o material asiático (*Dendrobium*, *Phalaenopsis* e *Cymbidium*) muito mais atraente para o comércio de flores, pois estas são plantas precoces (18 a 36 meses para florescimento) e multifloras e, a exceção de *Cymbidium*, não necessitam de condições especiais para o florescimento. *Cattleya walkeriana* tem muito a oferecer aos melhoristas, pois suas plantas apresentam hastes multifloras, flores grandes, muitas variações de colorido, forma e precocidade (BICALHO, 1977; WITHNER, 1988; LACERDA' et al., 1995), chegando a florescer com apenas quatro anos em cultura *ex vitro*.

A primeira pessoa a estudar a genética das orquídeas, de acordo com os princípios estabelecidos por Mendel, foi Charles Chamberlain Hurst. Hurst formulou sua "Lei da Prepotência em Orquídeas Híbridas" a qual pressagiu as leis mendelianas de dominância e segregação. No entanto quando as leis de Mendel tornaram-se conhecidas Hurst aceitou-as imediatamente. Sua subsequente pesquisa foi designada para determinar se essas leis eram aplicadas a uma larga variedade

de plantas e animais, incluindo orquídeas. Todos os seus artigos de hereditariedade escritos depois de 1900 foram publicados nos termos mendelianos. Hurst descobriu a existência de cores complementares em genes de orquídeas (chamou-os de C, c, R e r) e meticulosamente determinou quais plantas os carregavam. As listas de orquídeas albinas de Hurst ainda são válidas e têm sido reproduzidas em muitos artigos e livros. Seus achados sobre genética de orquídeas estão sumarizados em seu livro *Experiments in Genetics* (ARDITTI, 1992).

Storey estudou a genética de cor da flor em *Spathoglottis*. Para obter dados, ele fez cruzamentos recíprocos entre *Spathoglottis plicata alba* e *Spathoglottis grandifolia* e entre *Spathoglottis plicata* e *Spathoglottis elmeri*. A progênie do cruzamento entre *Spathoglottis plicata alba* e *Spathoglottis grandifolia* segregou dentro dos padrões de coloração. Storey conduziu o cruzamento da segunda geração (F₂). Sua conclusão foi que três genes (P/ p/ T/ t/ B/ b) controlavam a coloração das flores em *Spathoglottis* (ARDITTI, 1992).

Entre 1945 e 1955, Storey e Kamemoto estudaram a herança da característica semi-alba (sépalas e pétalas brancas e labelo colorido) em *Cattleya* autopolinizando uma flor colorida na planta (geneticamente CCRpP) produzida pelo cruzamento de *Cattleya rubio* 'Firmin Lambeau' de genótipo CCrrPP. A herança da cor da flor foi estudada mostrando que a característica semi-alba é controlada por um gene único, designado como P e p, e que tais flores são CcR_pp (ARDITTI, 1992). Ainda segundo Arditti (1992) apesar da herança das formas alba e semi alba serem conhecidas a herança da forma cerúlea ainda é desconhecida.

Os estudos de Storey e Kamemoto ilustraram a dificuldade encontrada por esses para investigar a herança da cor e outras características em orquídeas. Muitos anos são requeridos para produzir plantas e coletar dados, que devem ser analisados estatisticamente. Essa é a aproximação apropriada e a única que assegura exatidão científica (ARDITTI, 1992).

Características como nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala e morfologia foliar, são usadas como bons marcadores fenotípicos ou morfológicos. Estes marcadores possuem herança discreta cujas classes são facilmente distinguíveis (COE et al., 1998; RICK; YODER, 1988), e são de avaliação simples e de custo reduzido. Todavia em plantas perenes a avaliação de algumas destas características pode ser lenta, uma vez que a planta tem que atingir seu completo desenvolvimento para isto.

Atualmente, marcadores moleculares têm sido utilizados no melhoramento genético de plantas o que torna possível, análises mais detalhadas e consistentes de sua genética.

O uso de marcadores moleculares tem servido a um grande número de finalidades, desde mapeamentos de cromossomos em plantas e animais até a identificação de clones ou indivíduos. Estas metodologias têm facilitado, em algumas culturas, o melhoramento genético clássico, além de servir para a clonagem de genes de interesse. O estabelecimento de padrões moleculares, protéicos ou de DNA, serve como parâmetro para a identificação de clones e variedades de plantas e como ferramenta para os sistematas classificarem corretamente os organismos vivos (OLIVEIRA et al., 2000).

Os marcadores moleculares são ferramentas de grande utilidade em análises genéticas. Vários tipos desses marcadores podem ser utilizados para construção de mapas, mas podem diferir em alguns aspectos tais como número de locos que podem ser detectados, graus de polimorfismo entre e dentro de acessos e características de dominância. Hoje em dia existe uma grande quantidade de mapas genéticos disponíveis, o que torna possível a identificação de um grande número de genes para espécies animais e vegetais (MALIEPAARD et al., 1997; JOSHI et al., 1999). Ao lado dos projetos de seqüenciamento e das análises do cariótipo pelas técnicas de hibridização *in situ*, o desenvolvimento de mapas genéticos fundamentados em marcadores de DNA tem propiciado consideráveis avanços á genômica de plantas (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

As análises feitas através de marcadores RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism - Fragmentos de Restrição de Comprimento Polimórfico) são trabalhosas, requerem grande quantidade de material e geralmente demoradas, por outro lado, marcadores RAPD (Random amplification of Polymorphic DNA - Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico) requerem pequenas quantidades de DNA, são menos trabalhosas e mais rápidas. No estudo de orquídeas, este método pode ser utilizado para indicar proximidade genética entre essas plantas e seus híbridos, ajudar a predizer o resultado de um cruzamento baseado em informações do genótipo, de maneira precoce e eficiente, além de auxiliarem na classificação de espécies (DEMEKE et al., 1992). A disponibilidade de marcadores morfológicos é restrita a poucas espécies vegetais para as quais o número de informações

genéticas é maior, tais como, o milho, o tomate e a ervilha (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LIU, 1998).

Marcadores RAPD constituem-se num dos tipos mais utilizados em estudos genéticos. São detectados pela amplificação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos gerados ao acaso, através de reações em cadeia utilizando-se a enzima termoestável, DNA polimerase (WILLIAMS et al., 1990). Segundo Cruz e Milach (1998) e Ferreira e Grattapaglia (1998) a técnica RAPD apresenta algumas vantagens em relação aos outras técnicas: utilização de pequena quantidade de DNA genômico (de 10 a 100 ng), a fácil execução, rápida obtenção de marcadores polimórficos, custo baixo, ausência de hibridação, a não necessidade de radioisótopos, facilidade de visualização do polimorfismo em gel de agarose corado com brometo de etídeo, detecção de polimorfismo em regiões altamente repetitivas no genoma, e alto nível de polimorfismo comparando-se a outros marcadores moleculares. Porém, apresentam algumas poucas desvantagens, como ambigüidade na interpretação das bandas, co-migração de fragmentos de tamanhos iguais ou próximos e caráter dominante na maioria dos marcadores obtidos.

No gênero de orquídeas *Vanda*, Lim et al. (1999) analisaram a distância genética entre várias espécies utilizando-se de métodos citológicos e de marcadores RAPD que foram indicados para serem usados como ferramentas adicionais na classificação de Orchidaceae.

Oliveira et al. (2001) identificaram marcadores RAPD em uma população de *Citrus* que podem ser utilizados para a seleção precoce de híbridos, em 'fingerprintings', estudos de diversidade genética e construção de mapas genéticos.

Marcadores RAPD, em feijão, mostraram-se eficientes ao agrupar cultivares de acordo com o centro de domesticação segundo Emygdio et al. (2003). No entanto, não foram eficientes na separação dos cultivares de acordo com a coloração das sementes.

Segundo Vidal et al. (2006), foi possível estimar a variabilidade genética dentro da população de *Bidens spp* utilizando-se a amplificação aleatória de DNA, mas não foi possível separar as espécies de *Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*.

Com a utilização da Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAMM) é possível fazer-se uma seleção do fenótipo do marcador através da

detecção de marcadores ligados a uma determinada característica de interesse, sem que haja a necessidade de se avaliar o fenótipo da planta. Esta seleção é importante em vários aspectos, principalmente quando a característica de interesse é de avaliação difícil e cara, como nos estudos de espécies perenes de ciclo longo, e para características fenotípicas de herdabilidade baixa, o que pode significar redução no tempo e nos custos de programas de melhoramento (SOUZA, 2001). A análise em nível molecular é vantajosa para estudos em plantas perenes, possibilitando a avaliação da similaridade genética entre genótipos nos primeiros estágios de desenvolvimento (NICOLOSI et al., 2000).

Orquídeas são plantas de genética complexa e ciclo longo. Os marcadores moleculares podem auxiliar o processo de melhoramento dessas plantas em diversos tipos de análises tais como: determinar a coloração das flores precocemente, conduzir cruzamentos de maneira segura pelo estudo da segregação de características de interesse, traçar filogenia entre espécies e fornecer perfis genéticos (*fingerprinting*) de DNA. Porém o uso desses marcadores em orquídea é restrito devido à escassez de dados e pesquisas relativas ao assunto.

Esta pesquisa teve por objetivo comparar por meio de marcadores RAPD o índice de fixação alélica (F_{ST}) entre progênies de *Cattleya walkeriana* obtidas por cruzamento dirigido e em outras plantas da mesma espécie. Avaliou-se também a capacidade destes marcadores em agrupar os diversos fenótipos destas plantas por bandeamento e desta maneira entender a forma de transmissão da herança da característica cerúlea para as progênies posteriores.

Por meio destes dados pretendeu-se chegar ao entendimento de como conduzir um cruzamento de forma que haja uma maior obtenção de plantas com genes cerúleos, já que esta é uma importante característica para o mercado de flores, porém, de segregação desconhecida para esta espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE.

2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas plantas jovens e adultas de coloração tipo (rosadas) e cerúlea (azuladas) de *Cattleya walkeriana*, provenientes de uma coleção particular do Oeste de São Paulo e as progênies oriundas de cruzamentos dirigidos F₁ (primeira geração de filhos), F₂ (segunda geração de filhos) e RC₁ (retrocruzamento 1). Utilizaram-se plantas testemunhas cerúleas, além de albas (brancas) e semi-albas (pétalas e sépalas brancas com labelo colorido) e duas plantas de coloração tipo coletadas em mata, independentes das progênies. Testemunhas, plantas adultas, da mesma espécie dos parentais foram utilizadas com a finalidade de se observar o índice de variabilidade genética destas, quando comparadas com as plantas utilizadas no cruzamento.

2.2 Descrição dos Cruzamentos

2.2.1 Geração F1

O cruzamento foi inicialmente realizado a partir de duas plantas *Cattleya walkeriana* cerúleas (azuladas) sendo P₁, o clone 'Blue City' e P₂, o clone 'Patrícia'. Esperava-se obter deste cruzamento apenas plantas com flores de coloração azulada. Porém todas as plantas oriundas apresentaram coloração tipo (rosada). Assim, como existem falsas albas relatadas, levantou-se a hipótese de um dos parentais ser considerado como uma falsa cerúlea. A primeira geração foi

identificada como F_1 , e seus representantes como $1F_1$, $2F_1$, $3F_1$, $3/F_1$, $4F_1$, $5F_1$, $6F_1$ e $7F_1$.

2.2.2 Geração F2

Duas plantas da geração F_1 , respectivamente, $1F_1$ e $2F_1$, foram cruzadas entre si, obtendo a progênie F_2 , com as amostras denominadas como $1F_2$ a $11F_2$, ainda em fase de crescimento vegetativo. A planta $2F_1$ perdeu-se durante a realização da pesquisa, o que impossibilitou a análise de seu genótipo.

2.2.3 Geração RC1

Um representante tipo da geração F_1 ($3F_1$) foi cruzado, com uma planta cerúlea (azulada) identificada como clone 'ABC', originando a geração RC_1 , com 23 plantas, ainda em fase de crescimento vegetativo.

2.2.4 Testemunhas

Como testemunhas foram analisadas plantas cerúleas (obtidas pelo cruzamento de *Cattleya walkeriana* 'Rancho Sereno' e *Cattleya walkeriana* 'Patrícia', ambas cerúleas), denominadas RSP(P), RSP₁, RSP₂, RSP₃, RSP₄ e CWT. Usaram-se também plantas de coloração alba (CA) e semi-alba (AS e Pu) além de duas plantas de coloração tipo coletadas em mata (T_1 e T_2), sem designação clonal.

2.3 Extração de DNA

A técnica de extração de DNA foi uma adaptação do protocolo de Doyle e Doyle (1987). Utilizou-se até 3g de tecido foliar sadio como fonte inicial de DNA. Macerou-se o tecido em cadinho de porcelana sob nitrogênio, sendo adicionado tampão Tris-EDTA, contendo 500 mM de CTAB e 2% de β -mercaptoetanol. O extrato foi aquecido por 1h a 65°C, adicionando-se posteriormente, uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e mantendo-se em aquecimento por mais 15 min. A mistura foi centrifugada por 5 min a 12000 rpm, separando-se em duas fases. A fase orgânica foi descartada e fase aquosa precipitada por isopropanol gelado (-20°C), centrifugando-se a 12000 rpm por 15 min. O precipitado recolhido foi lavado em etanol 70% e centrifugado novamente a 12000 rpm por 10 min. Para a retirada do excesso de carboidratos incubou-se o pellet por 15 min a 65°C em etanol 70% centrifugando-se novamente por mais 10 min a 12000 rpm.

O DNA coletado foi solubilizado em tampão TE (pH 8,0) adicionado de RNAase 0,1 μ g. μ l⁻¹ incubado a 37°C por 30 min e novamente aquecido a 65°C por 15 min para inativação da enzima. O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose contra um padrão conhecido e através de espectrofotometria, e diluído para amostras de trabalho de 10ng μ L⁻¹ estocando-se a -20°C até o uso.

Os primers foram selecionados com amostras de DNA de *Cattleya walkeriana* forma cerúlea, sendo um parental (P₁), um representante da geração F₁, um representante da geração F₂ e uma planta cerúlea independente das progênes utilizadas como testemunha (RSP). Foram testados em cada amostra seis conjuntos de 20 primers decâmeros de combinações arbitrárias da marca Operon Technologies, sendo respectivamente os conjuntos A, C, D, G, X, Y e Z.

As reações de PCR-RAPD foram realizadas em termociclador MJ-PTC 100, onde cada solução apresentou DNA molde, 10% de tampão para PCR (20 mM Tris-HCL, pH 8.4, 50 mM de KCL) mais 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μ M de cada DNTP, 0,4 μ M do primer selecionado e 1 U de *Taq DNA polimerase* em um volume final de 25 μ l. As reações ocorreram em 48 ciclos, após a desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, cada ciclo constituiu-se de: desnaturação 92°C por 30 segundos;

anelamento 37°C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão 72°C por 30 segundos. Após os 48 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os primers foram testados utilizando-se 25 ng de DNA molde enquanto a amplificação de todas as amostras foi realizada utilizando-se 50 ng de DNA molde. O objetivo desta seleção foi a identificação de marcadores RAPD polimórficos que possibilitassem a amplificação dos locos de interesse nesse estudo.

Após a PCR, o material foi aplicado em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo, embebido em tampão TBE 1X e submetido a corrida de eletroforese. Foram aplicados 25 µl de cada amostra, homogeneizadas com 3 µl de corante Bromofenol Blue em cada poço do gel. A corrida de eletroforese foi realizada em cuba horizontal e submetida a 150 V por 1 hora. Os resultados foram visualizados com iluminação ultravioleta em câmara escura e as imagens capturadas em uma câmera CCD Alpha-Inmotech, sendo então analisadas por software Chemilmager.

A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando “1” como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, com a matriz de similaridade, foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average) utilizando-se para essa análise o programa NTSYS 2.02 (ROLF, 1998). Para estimar variabilidade genética nas populações usou-se o índice de fixação alélica (F_{ST}), e a quantidade de locos polimórficos. A análise da variância molecular (AMOVA) foi calculada através da decomposição total nos seus componentes entre e dentro de espécies utilizando-se as distâncias ao quadrado (EXCOFFIER et al., 1992) com auxílio do programa Arlequin (EXCOFFIER et al., 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a identificação de marcadores relacionados á característica cerúlea extraiu-se DNA do genótipo de quatro plantas, sendo um representante de cada geração (Parentais, F₁ e F₂) e uma amostra das testemunhas (RSP). Foi possível selecionar primers que apresentaram bandas dimórficas, oligomórficas e polimórficas para tais amostras. Dos 120 primers analisados neste trabalho foram escolhidos inicialmente 33, sendo Op A1, A2, A5, A10, A11, A14, A18, A19, A20, C1, C2, C4, C5, C6, C7, C8, C11, C12, C14, C16, D1, D2, D13, G2, G3, G5, G6, G7, G8, G11, G12, G14, G16, respectivamente.

Após este processo, foi realizada a amplificação de todas as amostras das progênes por cada primer escolhido. Posteriormente seguiu-se com a segunda seleção, separando apenas os primers que apresentaram bandas oligomórficas ou polimórficas, e número e clareza dos locos amplificados. As bandas fracas ou de baixa intensidade não foram consideradas a fim de evitar interpretações ambíguas. Os primers selecionados para a análise final foram Op A2, A5, A10, G5, G11 e G13 por terem amplificado com sucesso um total de 54 fragmentos.

Na Tabela 1, observa-se a seqüência dos marcadores utilizados na amplificação das amostras. Os fragmentos gerados variaram de 200 pb a 1500 pb, encontrando-se dentro dos limites segundo Liu et al. (1999), nos quais a técnica RAPD apresenta boa reprodutibilidade.

TABELA 1. Seqüências nucleotídicas dos primers, número de bandas, número de bandas polimórficas e tamanho dos fragmentos amplificados em *Cattleya walkeriana*

Primers	Seqüência nucleotídica (5' → 3')	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Tamanho dos fragmentos (pb)
A2	TGC CGA GCT G	10	10	280 a 1380
A5	AGG GGT CTT G	9	9	300 a 1190
A10	GTC ATC GCA G	10	10	250 a 1370
G5	CTG AGA CCG A	10	10	280 a 1380
G11	TGC CCG TCG T	8	8	400 a 1460
G13	CTC TCC GCC A	7	7	350 a 1060

Após seleção dos primers, fez-se a construção de um dendrograma através da análise do produto de amplificação de todos marcadores RAPD selecionados.

A partir da análise das bandas foi possível estimar a capacidade destes marcadores em agrupar as plantas de acordo com a coloração, cuja eficiência é demonstrada pelo dendrograma abaixo (Figura 1). Este mostra o agrupamento de plantas cerúleas, onde P1 e RSP1 estão no mesmo ramo filogenético, porém em local diferente de P2 e RSP(P). Isto sugere o fato da planta P1 ser considerada uma pseudocerúlea e a doadora de genes de coloração tipo para a progênie F1. Existe a proximidade entre as plantas cerúleas, porém algumas se apresentam no mesmo ramo filogenético devido à semelhança de genótipos entre essas. As amostras RSP2 e RSP3 agruparam-se no mesmo clado, indicando similaridade no genótipo destas com proximidade com RC1 (P). Esperava-se que todas as plantas do cruzamento entre Rancho Sereno e Patricia estivessem no mesmo clado. Com exceção de CWT todas as plantas cerúleas apresentaram-se reunidas em um clado maior. Em outro clado abrangente, as plantas de F1, apesar de mesmo fenótipo, mostraram-se separadas por ramificações indicando proximidade genética, porém não similaridade. A planta CWT apresentou-se próxima das plantas semi-albas, estas últimas compartilhando o mesmo clado, e a planta CA em uma ramificação inferior, porém próxima das semi-albas. A mesma figura mostra os padrões de agrupamento das plantas que já floresceram (Parentais, testemunhas e F1) e das plantas que ainda não floresceram (Gerações F2 e RC1). Algumas plantas de F2 dispõem-se próximas de F1 o que indica provável semelhança fenotípica. A proximidade dessas plantas com as de já sabido fenótipo pode indicar que estas venham a ter a mesma coloração. Porém esse resultado só será comprovado quando tais plantas florescerem.

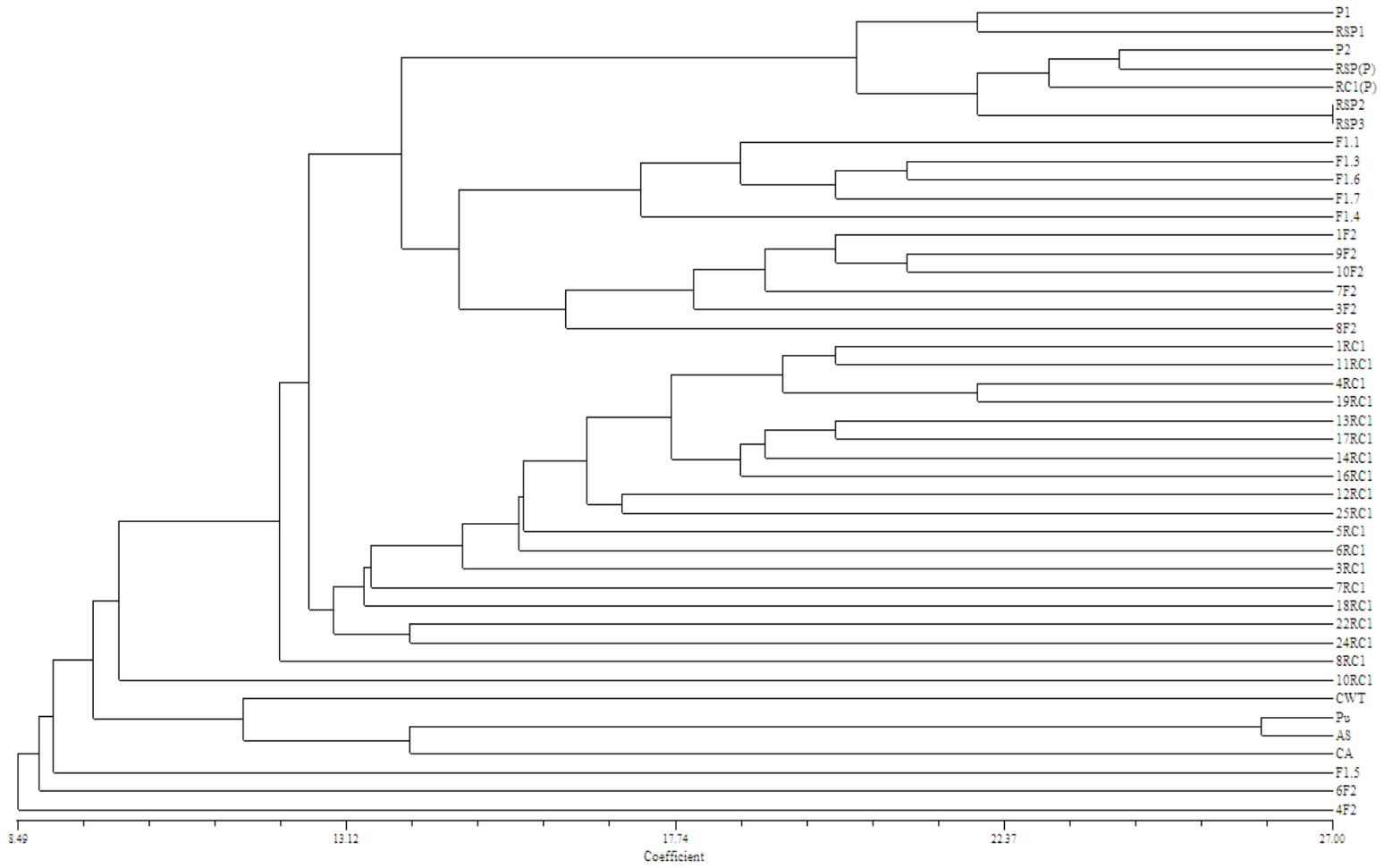


FIGURA 1 - Grupamento de plantas de *Cattleya walkeriana*, progênies F1, F2, RC1 e testemunhas

TABELA 2 - F de Wright (FST) utilizando-se marcadores RAPD em progênies de *Cattleya walkeriana*.

	Total	Cerúleas	Tipos	Parentais	F ₁	F ₂
Cerúleas	0,00095					
Tipos	0,10415	0,46453				
Parentais	0,10075	0,07004	0,37710			
F₁	0,23125	0,28383	0,53916	0,30523		
F₂	0,16319	0,23581	0,52744	0,22092	0,40536	
RC₁	0,16844	0,22066	0,49096	0,13041	0,34177	0,27780

Li e Ge (2006), por meio de marcadores RAPD, encontraram baixa diversidade genética dentro de populações de orquídeas da espécie *Changnienia amoena* e alta taxa de diversidade genética entre as populações avaliadas. Esses resultados foram devidos ao baixo tamanho das populações, a extinção local por causa da destruição dos habitats e o restrito fluxo de genes.

Zucchi et al., (2005) obtiveram índices de variabilidade genética em 10 populações de *Eugenia dysenterica* através de 54 locos marcadores RAPD. O menor valor encontrado foi entre populações sendo 27,3% de variabilidade genética, enquanto que dentro de populações a variabilidade foi de 72,97%, índices gerados a partir do valor de FST igual a 0,2703. Ao se fazer uma correlação entre distância genética e distância geográfica os autores constataram que a distância geográfica tem relação com a diferenciação destas populações possivelmente devido ao baixo fluxo de genes.

Em *P. leucophaea*, uma espécie de orquídea, rara e ameaçada de extinção, os valores de FST para marcadores RAPD e isoenzimas (0,889 e 0,754) indicaram grande quantidade de endogamia sendo consistentes entre si (HOLSINGER et al., 2002). Isso também acontece em *Anthirrhinum subbaeticum* (JIMENEZ et al., 2002); planta endêmica da Espanha, também ameaçada, o FST variou de 0,64231 a 0,91061, exibindo grande quantidade de endogamia. No entanto *Cypripedium calceolus* mostrou baixo valor de FST (0,014) até mesmo nas plantas que exibiam estratégias clonais na estrutura de suas populações (BRZOSKO et al., 2002). Por outro lado, em um estudo realizado por Pressoir e Berthaud (2004), o índice de fixação alélica em variedades crioulas de milho demonstrou pouca variação entre populações (FST 0,011). No entanto, não houve isolamento pela distância e pouca diferenciação entre as vilas analisadas foi encontrada (FST 0,003).

Para arroz selvagem (*Zizania palustris* var. *palustris*) o F_{ST} estimado foi de 0,30, sendo considerado alto por Lu et al., (2005) especialmente entre populações, sugerindo baixo fluxo genético entre populações. Ambiel et al., (2008) estimaram em *Brachiaria* que valores menores de F_{ST} , mas com maior número de bandas polimórficas indicam alto fluxo gênico, e conseqüentemente variabilidade. De acordo com Garris et al. (2005), populações com baixos níveis de seleção mostraram menores valores de F_{ST} .

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para este estudo, sugeriu-se a existência de 4 genes responsáveis pela coloração das flores em *Cattleya walkeriana* que foram representados neste trabalho pelas letras C, R, P e B e suas variáveis.

Os genes C e R estão envolvidos na determinação da coloração tipo em flores de *Cattleya*. A composição do gene C está relacionada à produção de cromógenos, e o gene R produz enzimas que convertem o cromógeno em pigmento colorido. Este tipo de herança pode ocorrer através da atuação de genes complementares, ou através da ação de epistasia recessiva duplicada, como citado em trabalho realizado por Vajrabhaya e Vajrabhaya (1996). Desta forma, todos os genótipos que apresentarem C_R_ expressarão fenótipo com coloração tipo, pois os dois pares de genes, tendo a presença de uma forma dominante em cada par interagem entre si na produção de pigmentos. O surgimento de um dos pares de alelos em recessividade, ou ambos, suprime a expressão do outro e conseqüentemente não ocorre a síntese do pigmento. Este evento codifica o aparecimento da forma alba em orquídeas do gênero *Cattleya*, identificadas geneticamente como crrr, C_rr, ou ccR_.

Para o caráter semi-alba designou-se o gene P. Tendo como base as conclusões obtidas em estudos realizados por Storey e Kamemoto, citados por Arditti, a obtenção de labelo colorido em *Cattleya* se dá através do aparecimento dos genes P em homozigose na forma recessiva. Os alelos de C, e/ou os de R, necessitam também estar em homozigose recessiva de forma a expressar fenótipo alba nas pétalas e sépalas. Assim plantas semi-alba teriam genótipo C_rrpp, ccRrpp, ou crrpp. O aparecimento de P na forma dominante tanto em homozigose quanto em heterozigose inibe a produção de pigmento no labelo das plantas.

Sugere-se, neste trabalho, que o caráter cerúleo é de herança recessiva, e é representado pela letra B. Para a produção deste tipo de pigmento este deve apresentar-se na forma bb, porém sempre atuando de maneira complementar aos outros genes (C, R, P). Deve-se ressaltar que flores cerúleas possuem essa tonalidade tanto nas pétalas, quanto nas sépalas e labelo. É necessário que se repita o padrão de ocorrência dos genes C e R das plantas albas (C_rr, ccR_, crrr) para que este evento ocorra. O gene P pode apresentar-se em

qualquer uma de suas formas (P_, pp). Genótipos de plantas cerúleas podem ser representados por C_rrP_bb, ccR_P_bb, C_rrppbb, crrppbb).

Assim como existem falsas albas, relatadas em literatura, o presente estudo propõe a existência de pseudo-cerúleas. Essas plantas são identificadas, quando, submetidas a um cruzamento com plantas de mesmo genótipo, produzem descendência diferente da esperada, como os parentais utilizados na pesquisa em questão. Os genótipos dessas plantas podem ser representados da seguinte forma: Pseudo-albas: C_rrP_B_ e ccR_ppB_ (o que as torna 'falsas' é a presença de um gene de C ou R na forma dominante), e albas plenas, crrP_B_, onde os dois pares de alelos que participam da produção de pigmento estão na forma recessiva. A mesma teoria se aplica a forma cerúlea, porém sugere-se que os genótipos destas se organizam da seguinte forma quando pseudo-cerúleas: C_rrP_bb, ccR_P_bb, Ccrrppbb (a presença dos genes C ou R na forma dominante, codificam a síntese de pigmentos e a produção de plantas de coloração tipo em F1). Cerúleas plenas têm todos os genes na forma recessiva, e são: crrppbb, e quando entrecruzadas só podem produzir plantas de mesmo genótipo.

5 CONCLUSÕES

Nas gerações F_1 , F_2 e RC_1 , as plantas de *Cattleya walkeriana* mostraram tendência a endogamia. O índice de fixação alélica (F_{ST}) foi eficiente para demonstrar as alterações na variabilidade a medida que plantas distintas geneticamente, mas de fenótipo semelhante, foram cruzadas. O índice também foi eficiente para estimar a variabilidade total das populações e determinar a alta taxa de fecundação cruzada na espécie. Supõe-se que a introdução sucessiva de plantas cerúleas nos cruzamentos aumente a probabilidade de obtenção de outras plantas com a mesma característica.

Plantas cerúleas são de difícil obtenção, pois apresentam todos os pares de genes na forma recessiva. A herança para a característica em questão é oligogênica, e determinada por genes que atuam de maneira complementar e são de segregação independente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBIEL, A. C. et al. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 457-464, 2008.

AMERICAN ORCHID SOCIETY. Business is Booming, **Orchids**, v. 72, p. 567, 2003.

AMERICAN ORCHID SOCIETY. Orchid popularity still growing. **Orchids**, v. 75, p. 563, 2006.

ARDITTTI, J. Heredity and Breeding. In: ARDITTI, J. (ed.). **Fundamentals of Orchid Biology**. University of California. California: Irvine. 1992. p. 571-586.

BICALHO, M. **Native Orchids of Brazil**. São Paulo: Associação Orquidofila de São Paulo, 1977.

BLACK, P.M. **ORQUÍDEAS**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S/A, 1984.

BRZOSKO, E.; WRÓBLEWSKA, A.; RATKEWICZ, M. Spatial genetic structure and clonal diversity of island population of lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) from de Biebrza National Park (Northeast Poland). **Molecular Ecology**, p. 2499-2509, v. 11, 2002.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 89-100; 2002.

COE, H. E.; NEUFFER, M. G.; HOISINGTON, D. A. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J.W. (Eds.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 81-237.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (Ed). **Marcadores Moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 107-116.

DEMEKE, T; ADAMS, R. P.; CHIBBAR, R. Potential taxonomic use of random amplified DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p. 990-994, 1992.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemistry Bulletin of the Botanical Society of America**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMYGDIO, B. M. et al. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijão baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, 2003.

EXCOFFIER, L. et al. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L., et al. Arlequin ver 3.1 An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis (software) Bern: University of Berne Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), 2006. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 27 Jan. 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220,.

GARRIS, A. J. et al. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v. 169, p. 1631-1638, 2005.

HOLSINGER, K. E; LEWIS, P.O.; DEY, D. K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1157–1164, 2002.

JIMENÉZ, J. F. et al. Genetic variability in a narrow endemic snapdragon (*Anthirrhinum subbaeticum*, Scrophulariaceae), using RAPD markers. **Heredity**. v. 89, p. 387-393, 2002.

JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v. 77, n. 2, p. 230-240, 1999.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds.

American Orchid Society Bulletin, v. 15, p. 214-217, 1946.

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

KNUDSON, L. Nutrient solutions for orchid seed germination. **American Orchid Society Bulletin**, v. 12, p. 77-79, 1943.

LACERDA, K. G. et al. **Brazilian Orchids**. Sodo Publishing, 1995. p. 301-305,.

LI, A.; GE, S. Genetic variation and conservation of *Changnienia amoena*, an endangered orchid endemic to China. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, p. 251-260, 2006.

LIM, S. H. et al. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 83, p. 193-196, 1999.

LIU, B.H. **Statistical genomics**. New York: CRC, 1998. p. 610.

LIU, Z. J. et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 174, p. 59-68, 1999.

LU, Y. et al. Genetic variability is correlated with population size and reproduction in american wild-rice (*Zizania palustris* var. *palustris*, Poaceae) populations. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 6, p. 990–997, 2005.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; van OOIJEN, J. W. Linkages analysis in a full-sibs family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetics Research**, v. 70, p. 237-250, 1997.

NASS. **Floriculture Crops: 2007 Summary**. USDA. 2008. 71 p.

NICOLOSI, E. et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

OLIVEIRA, R. P; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de *Citrus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A frequência de híbridos em cruzamentos entre tangerina – ‘Cravo’ e laranja ‘Pera’: Análise de Marcadores Morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1895-1903, 2000.

PRESSOIR, G.; BERTHAUD, J. Patterns of population structure in maize landraces from the central valleys of Oaxaca in Mexico. **Heredity**, v. 92, p. 88-94, 2004.

RICK, C. M.; YODER, J. I. Classical and molecular genetics of tomato highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 281-300, 1988.

ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0 user's guide. New York: Exeter Software, 1998. Disponível em: <<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsysguide.pdf>>. Acesso em: 10 março 2007.

SILVA, C. I.; GUTIERRE, M. A. M. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardener (*Orchidaceae*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 91-100, 2004.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L. et al. **Recursos genéticos e melhoramento –plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, Cap. 29, p. 939-966.

VAJRABHAYA, M.; VAJRABHAYA, T. The inheritance of albinism in *Dendrobium* orchids. **J. Sci. Soc.**, Thailand, v. 22, p. 173-180, 1996.

VIDAL, R. A. et al. Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Biddens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 1, 2006.

WILLIAMS, J. G. K et al. DNA polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WITHNER, C. L. **The Cattleyas and their Relatives**. Volume I The Cattleyas. Portland: Timber Press. 1988.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.

ANEXOS:



FIGURA 1 - *Cattleya walkeriana* cerúlea 'Blue City', utilizada como P₁ nesse estudo
(Fonte: <http://www.sanorchids.com/>)



FIGURA 2 - *Cattleya walkeriana* cerúlea 'Patrícia', utilizada como P₂ nesse estudo
(Fonte: <http://www.sanorchids.com/>)



FIGURA 3 - *Cattleya walkeriana* tipo, planta obtida na geração F₁

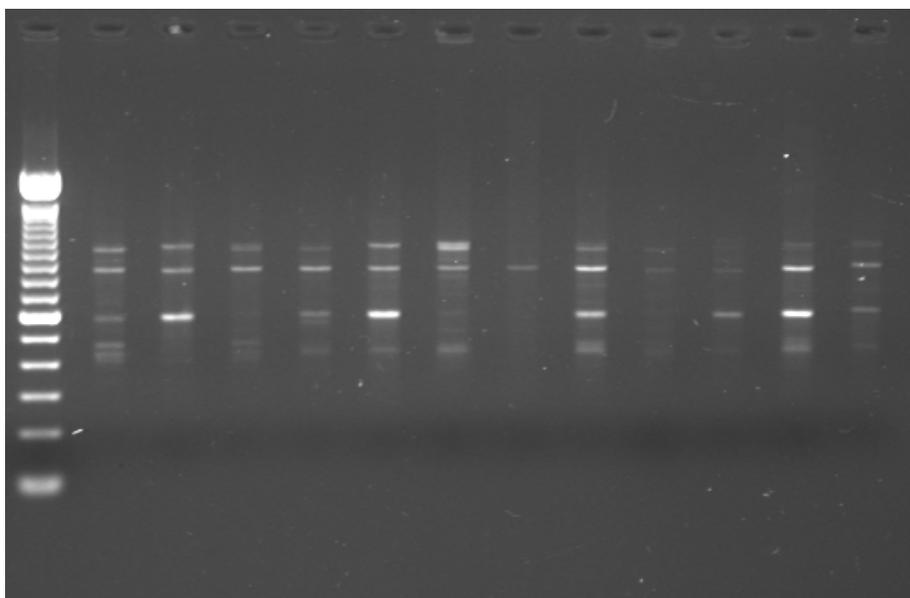


FIGURA 4 - Produtos de amplificação do DNA das amostras da progênie RC1 de *Cattleya walkeriana* obtidos com os iniciadores OP G11