

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

EMANOELE CRISTINA WEISS

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE *Dendrobium nobile* Lindl.
(ORCHIDACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2018

EMANOELE CRISTINA WEISS

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE *Dendrobium nobile* Lindl.
(ORCHIDACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ**

Projeto para trabalho de conclusão do Curso Superior em Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2.

Orientadora: Profa. Dra. Betty Cristiane Kuhn
Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Morini Küpper Cardoso

DOIS VIZINHOS
2018

ANEXO 10



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Coordenação do Curso Ciências Biológicas



TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº 2

Análise da diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) no estado do Paraná.

por

Emanoele Cristina Weiss

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 19 horas do dia 26 de novembro de 2018, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Profa. Dra Juliana Morini Kupper Cardoso
Perseguini
UTFPR-Dois Vizinhos

Profa. Dra. Betty Cristiane Kuhn
Orientador
UTFPR – Dois Vizinhos

Mestranda Hilda Vanessa Poquioma
Hernández
UTFPR-Dois Vizinhos

Profa. Dra. Marcele Filippi
Coordenadora do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR – Dois Vizinhos

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

- Á toda a minha família em especial minha mãe Marlides Wilmes Weiss, meu pai Volnei Weiss e meus irmãos Ana Paula Weiss e Elvionei Weiss, pelo incentivo em toda a graduação.
- Á minha orientadora Dra. Betty Cristiane Kuhn, pela paciência, cuidado, amizade e por todos os ensinamentos, sendo meu exemplo de profissional.
- Á minha Co-orientadora Juliana Morini Küpper Cardoso, pela paciência, dedicação, amizade e todos os ensinamentos.
- Aos meus amigos Carmen, Ernani, Felipe, André, Laila, Andressa, Kevyn, Ana Claudia, Vanessa, que sempre estiveram do meu lado me dando amparo, principalmente nos longos dias de laboratório.
- As minhas amigas Renata e Amanda, por sempre cuidarem e me protegerem, as quais eu agradeço imensamente todos os dias.
- A Camila por ser minha terapeuta e amiga
- Ao meu amigo Francisco Antônio Piran Filho, que me ajudou a realizar todas as coletas e esteve do meu lado por muitos meses.
- A cada pessoa que doou as mudas para o experimento.
- Ao Marcos pela parceria e amor diário, por me incentivar e me fortalecer.
- A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, por todo o suporte durante os quatro anos de graduação.
- A Deus e todos os meus guias espirituais por me colocarem nesse caminho cheio de graças e bênçãos.

EPIGRAFE

“Só é possível brilhar quando trabalhamos para que o outro também brilhe; só é possível se curar, quando trabalhamos para que todos se curem; só é possível realizar o nosso propósito quando trabalhamos para a realização do propósito do outro. Quando amamos de verdade, estamos exalando a fragrância do ser”.

Sri Prem Baba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA ORCHIDACEAE	9
3.1.1 Aspectos botânicos e ecológicos	9
3.1.2 Aspecto econômico	10
3.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	10
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Dendrobium</i>	11
3.3.1 <i>Dendrobium nobile</i> Lindl. (Orchidaceae)	12
3.4 DIVERSIDADE GENÉTICA	14
3.5 MARCADORES MOLECULARES	15
3.5.1 Marcador SSR	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 LOCALIZAÇÃO	17
4.2 MATERIAL VEGETAL	17
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	17
4.5 SELEÇÃO DE PRIMERS E PCR	18
4.6 ANÁLISE DOS DADOS	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA DA ESPÉCIE <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	21
5.2 PADRONIZAÇÃO DA PCR	22
5.2 GENOTIPAGEM COM OS MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSRs)	22
5.3 Diversidade Genética	27
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

WEISS, E. C. Análise de diversidade genética da espécie *dendrobium nobile* lindl. (orchidaceae) no estado do Paraná. 40p. Monografia. Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos. 2018.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo analisar a diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) em quatro regiões do Paraná. O experimento foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus Dois Vizinhos, PR, onde foram utilizados 40 exemplares da espécie *D. nobile*, os quais foram coletados nas quatro regiões do estado do Paraná, Norte, Sul, Leste, Oeste, sendo respectivamente as cidades Maringá e Cianorte, Dois Vizinhos e Mangueirinha, Guaramiranga e Ponta Grossa, Serranópolis e Matelândia sendo cinco orquídeas pra cada cidade, após a coleta as exemplares foram levados para o laboratório para a extração de DNA com o Kit Wizard® da Promega, em seguida foi realizada a PCR e a genotipagem dos primers SSR. Os microsatélites foram analisados pelo número de alelos por loco, pela frequência alélica e pelo conteúdo de polimorfismo (PIC). Os resultados obtidos mostram uma maior diversidade genética entre as populações do que dentro de cada população, também foi possível perceber que a um número de compartilhamento de alelos. O PIC para os primers foi ER30 (0.3725); ER45(0.3744) e ER59 (0.3047). Com o presente trabalho pode-se perceber a eficiência dos marcadores SSR para avaliar a diversidade genética da *D. nobile*. Porém é necessário a utilização de um número maior de primers para que o resultado seja mais concreto.

Palavras-chave: Orquídea. Marcador SSR. Polimorfismo. Diversidade Genética.

WEISS, E. C. **Genetic density analysis of dendrobium nobile lindl. (orchidaceae) in the state of Paraná.** 40p. Monografía Course of Degree in Biological Sciences - Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos campus. 2018

ABSTRACT

This search has been automatically translated for *Dendrobium nobile* Lindl. in four regions of Paraná. The experiment was carried out in the laboratory of Molecular Biology of the Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Dois Vizinhos campus, where 40 specimens of *D. nobile* were used, the two cities were Maringá and Cianorte, Dois Vizinhos and Mangueirinha, Guaramiranga and Ponta Grossa, Serranópolis and Matelândia, being five orchids for each city, after collection the specimens were taken to the laboratory for DNA extraction with the Wizard Kit from Promega, followed by PCR and genotyping of SSR primers. Microsatellites were analyzed by number of alleles per locus, allele frequency and polymorphism content (PIC). The obtained results show a greater genetic diversity among the populations than within the population, it was also possible to perceive that a number of allele sharing. The PIC for the primers was ER30 (0.3725); ER45 (0.3744) and ER59 (0.3047). With the present work we can see the efficiency of SSR markers for *D. nobile*. However, it is necessary to use a larger number of primers in order for the result to be more concrete.

Keywords: Orchid. SSR dialer. Polymorphism. Genetical diversity.

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, ordem Asparagales, sendo a maior entre as plantas superiores representando cerca de 7% de todas as plantas do planeta levando em conta as plantas já catalogadas. Além disso, são consideradas as plantas mais cobiçadas pelas pessoas devido a sua exuberância, variedades, formas e cores (ALTAFIN et al., 2003). Devido a suas particularidades as orquídeas se destacam entre as outras flores, elas possuem uma pétala modificada chamada de labelo tendo como função principal a atração dos polinizadores e conseqüentemente tornando a flor mais exuberante (ARAUJO, 2009). Ademais as orquídeas são classificadas conforme seus hábitos vegetativos, sendo eles: terrestre, rupícola, epífita, saprófita, dentre outros (SILVA; MILANEZE-GUTIERRE, 2004).

A grande exuberância das orquídeas fez crescer não só as vendas, mas também o extrativismo das espécies naturais levando diversas espécies ao risco de extinção, como é o caso de algumas espécies do gênero *Dendrobium*, devido seu uso para fins medicinais as espécies estão ameaçadas de extinção em seu ambiente natural principalmente na China e o Himalaia (SHAW; WANG, 2007). Por causa desses fatores se tornou indispensável o estudo da diversidade genética das espécies do gênero *Dendrobium* especialmente a espécie *Dendrobium nobile* Lindl. principal componente para a produção da “Herba Dendrobii” que é fabricada a partir das hastas da espécie.

Para realizar estudos de diversidade genética são muito utilizados marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*). Esses marcadores apresentam um alto grau de polimorfismo, codominância e não sofrem interferência ambiental, sendo analisado apenas o genótipo para mensuração da diversidade genética (OLIVEIRA et al., 2006). Os marcadores microsatélites são unidades de repetição de 2 até 6 nucleotídeos e são amplamente encontrados no genoma (GRIFFITHS et al., 2008).

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) coletadas no estado do Paraná, utilizando os marcadores SSR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) no estado do Paraná, utilizando os marcadores SSR.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Padronizar os protocolos de extração e amplificação de DNA para a espécie *Dendrobium nobile*
- Determina o grau de polimorfismo através da diferença dos fragmentos amplificados pelo marcador molecular SSR
- Comparar a variabilidade genética da espécie *Dendrobium nobile* entre as regiões do Paraná
- Testar a eficiência dos marcadores moleculares para a espécie *Dendrobium nobile*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA ORCHIDACEAE

As orquídeas são plantas vasculares herbáceas e perenes, sendo provavelmente a maior família entre as plantas superiores. Estão descritas aproximadamente 35.000 espécies distribuídas em 2.500 gêneros representam cerca de 7% de todas as plantas do planeta se levado em conta as que já foram catalogadas, além de possuírem 2 subfamílias, 2 divisões, 5 tribos, 2 séries, 2 subséries, 85 subtribos e inúmeros híbridos (ALTAFIN, 2003). Mas, essa classificação vem sofrendo mudanças constantes devido às pesquisas de filogenéticas.

As orquídeas são amplamente valorizadas devido a sua fantástica gama de variedades de espécies e híbridos, as suas flores geralmente são duradouras com diferentes formas, tamanhos e cores o que as tornam muito atraentes (BHATTACHARYYA et al., 2014).

3.1.1 Aspectos botânicos e ecológicos

As flores das orquídeas apresentam três sépalas, sendo uma dorsal e duas laterais, três pétalas, uma é chamada de labelo a qual é modificada, pois é onde ocorreu a fusão dos estames e carpelos, próximos a essa estrutura nota-se a presença da antera onde ficam agrupado os grãos de pólen, abaixo da antera se localiza o estigma, na sequencia encontra-se o ovário, órgão muito importante, pois é nele que após a fecundação se desenvolve a capsula das sementes, podendo abrigar milhares de sementes que possuem um tamanho extremamente pequeno (ALTAFIN, 2003).

O labelo é um órgão muito importante nas orquídeas, pois ele tem a função de atrair os polinizadores (moscas, abelhas, pássaros, borboletas, mariposas, beija-flores e morcegos), geralmente o labelo é parte mais interessante da flor, as margens desse órgão podem ser lisas ou apresentarem alguma protuberância, ele apresenta lóbulos e muitas vezes os laterais se dobram em cima da coluna, formando um tubo que é conhecido como garganta (ARAÚJO, 2009).

A família *orchidaceae* possui uma extensa distribuição ecológica por todo o mundo, sendo encontradas pelo menos quatro espécies no Norte do Círculo Ártico e variadas espécimes são detectadas em pradarias, pântanos, florestas entre outros, além de tolerar condições desérticas que é o caso de duas espécies de *Oncidium* e uma de *Brassia* epifitando os cactos (DODSON, 2017).

Na região da mata atlântica no Brasil, pode-se verificar a incidências de diversas orquídeas endêmicas devido a predominância de arborização é possível notar muitas espécies epífitas como a *Maxillaria*, *Strelis*, *Shophronitis*, *Bulbophyllum*, além de variadas microorquídeas (TINTI; CIOLINI, 2011).

3.1.2 Aspecto econômico

Segundo Reis (2011), as orquídeas juntamente com as rosas são as plantas com maior representatividade para os consumidores, devido ao fato de possuírem uma grande variedade de coloração e diversidade morfológica, ela vem ganhando cada dia mais o mercado da floricultura, além disso, o mesmo autor cita que com o passar dos anos o cultivo das orquídeas vem deixando de ser apenas um hobby e se destaca como uma atividade econômica em diversas regiões do Brasil, em especial no estado de São Paulo.

No ano de 2009 o mercado de exportação de orquídeas rendeu um valor de US\$ 219,86 mil, os destinos principais foram: Japão (53,08%), Alemanha (21,74%), EUA (12,27) e Holanda com (8,08%). O mercado brasileiro de exportação de orquídeas está baseado em plantas nativas e seus híbridos, tendo como principal destinação os colecionadores, diferindo do mercado tradicional no qual é caracterizado por plantas com cachos longos e flores maiores e atrativas (JUNQUEIRA; PEETZ, 2009).

Reis (2011) afirma que no ano de 2010 os estados brasileiros apresentaram os maiores volumes de exportações de orquídeas foram Mato Grosso do Sul sendo o principal com 51,11%, Espírito Santo (14,64%), Rio de Janeiro (13,86%) Santa Catarina (13,02%) Rio Grande do Sul (7,37), já as regiões sul e sudeste destacam-se pelos grandes estabelecimentos e também pela grande porcentagem de consumidores.

3.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O Paraná se destaca por ser a 5ª economia do Brasil, com 399 municípios totalizando 11.242.720 milhões de habitantes, representando 5% da população nacional (IPARDS, 2016, IBGE, 2016). As formações rochosas formam divisões distintas, tendo um prolongado intervalo geológico, com idades variando de 2,8 bilhões de anos até o presente. No primeiro planalto há a presença de rochas magmáticas e metamórficas que são mais antigas, o segundo planalto é constituído do aparecimento dos sedimentos paleozoicos da Bacia do Paraná. O terceiro planalto recoberto por sedimentos cretáceos (ITCG, 2016). O Paraná possui 16 bacias

hidrográficas (ÁGUAS PARANÁ, 2007). O clima do estado é dividido em subtropical e tropical (SIMEPAR, 2016). Segundo a classificação de KÖPPEN-GEIGER (1928), no Paraná o clima que é dominante é o tipo Mesotérmico seguido de tropical chuvoso.

Em uma estimativa geral todas as distribuições vegetais brasileiras abrigam as orquídeas, porém foi catalogado o maior número de espécies para essa família em biomas com florestas úmidas, como é o caso da Mata Atlântica abrangendo cerca de 1.257 espécies, divididas em 176 gêneros, das quais 791 são endêmicas, além disso, nas florestas ombrófilas a família *orchidaceae* se destacou e se tornou a família mais bem representada no domínio Mata Atlântica constituindo um total de 8% de todas as espécies, podendo dar um ênfase aos gêneros: *Acianthera*, *Habenaria*, *Epidendrum*, *Octomeria* e *Anathallis* possuindo mais de 50 representantes cada (STANCIK; GOLDEBERG BARROS, 2009).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Dendrobium*

A primeira referência encontrada foi feita por Sheng Nung, imperador chinês, quando deu alguns conselhos sobre a aplicação de *Dendrobium* em uso médico (ARAUJO, 2009).

O nome "*Dendrobium*" é de origem grega, dendron ("árvore") e bios ("vida"), que significa "algo que vive em árvores", ou, mais especificamente, "epífita" (LAVARACK et al., 2000). A uma discordância quanto ao número de espécies desse gênero, alguns autores afirmam que são 1500 espécies pertencentes ao gênero *Dendrobium* (LORENZI; SOUZA, 2001; BAKER, 1996).

Originárias da China e do Himalaia (LORENZI; SOUZA, 2001), Birmânia, Índia, Tailândia e Indochina (SILVA, 1986). As *Dendrobium* são litófitas e se adaptaram a diversos habitats, onde as mesmas desenvolveram pseudobubos e inflorescências axilares, os caules são bulbosos ou do tipo cana com reserva, a distribuição foliar é alternada e em algumas espécies as folhas permanecem o ano inteiro, porém em outras são renovadas, soltando-se geralmente um tempo antes da floração (LAVARACK; HARRIS; STOCKER, 2000).

As flores podem ser solitárias ou agrupadas, tendo hastes arqueadas ou não, com um porte médio para longo, as flores variam de comprimentos extremamente pequenos até maiores que 10 cm de diâmetro e podem transportar de 1 a 4 flores que é o caso da *Dendrobium nobile* ou até 100 como a *Dendrobium speciosum* (SCHULTZ-SOARES et al., 2014). Após o florescimento acontece à queda das flores, então acontece à formação das brotações que são denominadas keikes, que quando retirados geram uma nova muda (LAVARACK; HARRIS; STOCKER, 2000).

Há alguns anos descobriu-se que as espécies de *Dendrobium* possuem diversos efeitos farmacológicos, como anticancerígenos, antioxidantes e provocam vasodilatação (BULPITT et al., 2007; BAO et al., 2001). As espécies *D. nobile*, *D. fimbriatum* e *D. officinale* estão presentes na Farmacopeia da República Popular da China (Comitê de Farmacopeia da China, 2005). Atualmente, ainda há pouco conhecimento sobre a genética das espécies do gênero *Dendrobium*, porém é de extrema importância para melhorar a propagação e conservação dessas plantas (PRICE, 2006).

É difícil encontrar uma população familiar típica devido à polinização externa com elevadas taxas de heterozigosidade e pouca endogamia, dificultando as populações de F2 (CARNEIRO et al., 2002; PORTIS et al., 2009).

3.3.1 *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)

D. nobile é uma orquídea epífita, sendo uma das 1184 espécies de *Dendrobium* que são encontradas em todo mundo (LEITCH et al., 2009). A *D. nobile* é conhecida pelas suas flores da cor violeta e branca (Figura 1) (MARTIM; MADASSERY; 2006; BHATTACHARYYA et al., 2014). A espécie caracteriza-se por possuir pseudobulbos eretos de até 40 cm de altura, com inflorescências com até três flores nos nós de suas metades superiores. Em média as flores possuem 3 cm de diâmetro a sua matriz é cor-de-rosa purpúreo na base do labelo, devido a essa característica a espécie é conhecida popularmente como “Olho de Boneca” (VICHATO et al., 2007).

A propagação da espécie, tradicionalmente acontece pela separação do rizoma ou por meio de pseudobulbos extraídos, resultando em uma baixa taxa de proliferação (NAYAK et al., 2002). A semeadura *in vitro* é a mais indicada (MORAES; CAVALCANTI; FARIA, 2002), pois produz plantas saudáveis, com maior rapidez de crescimento quando comparados a outros métodos, utilizando menor espaço físico e possibilitando maior produção, além da obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos (SANTOS et al., 2007).

Figura 1: *Dendrobium nobile* Lindl.



Fonte: Gustavo Denarde Nogueira

A orquídea *D. nobile* é estimada por suas flores atraente sendo uma orquídea ornamental consideravelmente popular. Além disso, é usada tradicionalmente nas preparações de remédios à base de plantas medicinais (YE; QIN; ZHAO, 2002). Dois Bibenzil (Gigantol e Moscatilin) e um alcalóide (Dendrobine) são compostos que foram descritos em *D. nobile* (MIYAZAWA et al., 1997; ZHAO et al., 2001), ambos os compostos demonstraram ter um forte potencial antimutagênico, sendo eles encontrados como anti carcinogênicos contra o carcinoma pulmonar, o adenocarcinoma de ovário e leucemia promielocítica (LEE et al., 1995). Outras qualidades específicas dos efeitos curativos estão descritas, como a remoção de materiais tóxicos acumulados nos tecidos humanos, o aumento da imunidade humana, a redução dos níveis de açúcar no sangue e o prolongamento da vida (ZHENG et al., 2006).

Singh (2001) afirma que devido a grande importância medicinal e ornamental da espécie *D. nobile* essa planta se tornou ameaçada de extinção em seu habitat natural como é o caso da China e do Himalaia. Em razão de a espécie ser o principal constituinte da “Herba Dendrobii”, a demanda por hastes secas de *D. nobile* subiu consideravelmente aumentando os riscos de extinção da espécie em alguns pais já citados (SHAW; WANG, 2007).

3.4 DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética é o polimorfismo entre dois ou mais fragmentos de DNA, em marcadores codominantes é identificado conforme o tamanho das bandas presentes, já em marcadores dominantes pela ausência e presença de bandas (RAMALHO, 2012)

Para descrição da diversidade genética, tradicionalmente são utilizados os marcadores morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos, além disso, os marcadores moleculares podem ser utilizados para a análise em todos os estágios de desenvolvimento da planta (KAMADA et al., 2009).

Na análise de diversidade genética a similaridade e a dissimilaridade genética equivalem ao parentesco, sendo considerado como base na amostra dos locos entre os indivíduos e não na origem dos alelos nos locos, sendo assim os marcadores moleculares tem sido muito utilizados para os estudos de diversidade genética, pois fornecem com maior precisão em relação ao grau de polimorfismo e números de locos que podem ser amostrados, estabilidade ambiental, natureza genotípica e simplicidade pratica (RAMALHO, 2012)

A variabilidade genética das espécies vegetais tem uma alta diversidade tanto dentro como entre as populações, cada espécie pode possuir centenas de milhares de variantes, por isso é de extrema importância salientar que em uma coleção de germoplasma é contido apenas uma pequena amostra da porção total de cada espécie (NASS, 2007).

Pesquisadores analisaram a diversidade genética das mudas *Cattleya forbesii* Lindl., obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* com marcadores moleculares RAPD, sendo o polimorfismo entre os exemplares de *C. forbesii* foram de 89,19%, além disso os pesquisadores ressaltaram que o menor polimorfismo foi o OPM02 com 64,28% com 14 bandas das quais Cinco foram monomórficos já o OPC02 gerou um número maior de fragmentos (17), e para OPC02, OPC07, OPC08, OPC19 e OPM03 todos mostraram 100% de bandas polimórficas (KUNH et al., 2011).

Ueno (2013) analisou a diversidade genética da espécie *Oenceoclades maculata* Lindl. utilizando 13 iniciadores ISSR para 125 indivíduos da espécie provenientes de três estados brasileiros (São Paulo, Mato Grosso e Paraná) em seu estudo o autor observou um baixo índice de diversidade intrapopulacional, com estimativas do índice de Shannon (I) de 0,0094 a 0,1054 e estimativas da diversidade Nei (He) variando de 0,0054 a 0,0668, porém quando avaliado em conjuntos apresentam uma estimativa de diversidade mais alta (I=0,3869; He=0,2556), além

disso, a análise de variância (AMOVA) indicou que a maior parte da diversidade encontra entre as populações com 0,993.

Pesquisadores como Bhattacharyya e Kumaria (2015) utilizaram o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e DAMD (*Directed Amplification of Minisatellite-region DNA*) para avaliar os fatores genéticos e as atividades fitoquímica da espécie *D. nobile* no nordeste da Índia. Esse estudo revela uma alta taxa de diversidade genética, mostrando também um maior grau de significância de variação genética e fitoquímica entre as populações do que dentro das populações.

3.5 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares podem ser conceituados como que vai marcar ou etiquetar algo, ou seja, eles são usados para marcar alelos que sejam de difícil identificação (RAMALHO, 2012). Os marcadores moleculares permitiram a análise de diversidade genética dentro e entre as espécies, além disso, eles possibilitam a caracterização de um grande número de genótipo através de procedimentos relativamente simples, como também contribuem na identificação de marcadores para genes específicos conforme o interesse de cada pesquisador (BERED; NETO; CARVALHO, 1997).

3.5.1 Marcador SSRs

Os marcadores codominantes vêm sendo muito utilizados para análises de diversidade genética, e outros estudos que estão ligados com a genética de populações, principalmente na determinação de padrões de sistema reprodutivo e fluxo gênico (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; SEBBENN et al., 2011).

Os marcadores que são baseados em uma Sequência Simples Repetitiva (SSR) ou microssatélite, estão entre os marcadores que mais se aproximam do ideal para experimentos com genética de população, possuindo como principais vantagens a abundância e a distribuição uniforme no genoma, além de ser codominantes e multialélicos apresentam um alto grau de polimorfismo (KALIA et al., 2011). Uma pequena quantidade de DNA já é suficiente para a análise com esses marcadores, apresentando um ótimo resultado (HEDRICK, 1999). Os microssatélites apresentam o maior conteúdo informativo por locus gênicos entre as outras classes de marcadores moleculares, que podem ser relativamente fáceis de se obter a partir da reação da polimerase em cadeia (PCR) (NAZARENO; ZUCCHI; REIS, 2011).

Pesquisadores como LU et al (2012), desenvolveram pesquisas com marcadores microssatélites para as espécies *Dendrobium moniliforme* e *Dendrobium Officinale*, utilizando um total de 66 microssatélites, os autores utilizaram as duas espécies citadas a cima para desenvolver mapas de ligação entre as espécies do gênero *Dendrobium*, eles obtiveram como resultado: O mapa de *D. moniliforme* era 1127,9 cM em comprimento total com 165 loci marcadores distribuídos em 17 grupos de ligação; e o mapa de *D. officinale* consistiu de 19 grupos de ligação genética com um comprimento total de 1210,9 cM posicionado por 169 locos marcadores.

LU et al. (2013) realizou um estudo com marcadores moleculares microssatélites com a espécie *Dendrobium nobile* para estimar a análise da filogenia da espécie. os resultados mostraram uma arquitetura genética complexa entre diferentes seções, bem como ampla diferenciação genética dentro da seção *Dendrobium*. Esses marcadores microssatélites enriquecem o recurso atual de marcadores moleculares, o que facilitaria estudos posteriores de evolução e diversidade genética, avaliação de germoplasma, mapeamento genético e melhoramento molecular de *D. nobile* e outras espécies congêneres.

FENG et al (2014) em seu estudo desenvolveram marcadores microssatélites para estipular a diversidade genética do gênero *Dendrobium*. No total foram utilizados 320 marcadores SSR, nos quais 190 apresentaram um alto grau de polimorfismo uma média de (86,91%) mostrando a eficiência desse tipo de marcador para o gênero *Dendrobium*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, tendo a finalidade de avaliar a diversidade genética da espécie *D. nobile* nas quatro regiões do Paraná.

4.2 MATERIAL VEGETAL

Foram coletados 40 exemplares da espécie *D. nobile* nas quatro regiões geográficas do Paraná. As cidades representantes de região norte, sul, leste, oeste são respectivamente Maringá (31-35) e Cianorte (36-40), Dois Vizinhos (6-10) e Mangueirinha (1-5), Guaramiranga (21-25) e Ponta Grossa (26-30), Serranópolis (11-15) e Matelândia (16-20). Para cada região foram escolhidas duas cidades totalmente ao acaso, onde foram coletadas cinco amostras em diferentes pontos de cada cidade.

Para a coleta das plantas foi solicitada doações para as pessoas de cada cidade. Ao extrair a muda das árvores todos os cuidados foram tomados para que a matriz não fosse danificada, assim não causando nenhum prejuízo aos doadores. É importante ressaltar que foi retirada apenas uma pequena muda. Depois de coletadas as plantas foram transferidas para vasos de polietileno, com uma camada de rocha basáltica em fragmentos conhecidas popularmente como "pedras brita" para que possa fazer a aeração e evitar o encharcamento da muda durante as regas, em seguida foi adicionado o substrato próprio para orquídeas o qual é composto de casca de pinus, carvão vegetal, e isopor onde a planta será plantada com todas as raízes enterradas.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a extração de DNA da espécie *D. nobile* foi utilizado o Kit Wizard® da Promega, com algumas modificações no procedimento conforme melhor se encaixa com a espécie.

Para a padronização do protocolo para a espécie *D. nobile*, foram primeiramente maceradas as folhas jovens em 1000 µl de Cel Lysis Solution até homogeneizar, adicionando mais 1000 Cel Lysis Solution, após misturar bem o conteúdo adicionou-se 300µl em cada eppendorf de 2 ml do homogeneizado mais 500 µl de Cel Lysis Solution, em seguida adicionou-se 600 µl de Nuclei Solution e foi levado ao vortex 1-3 segundos para homogeneizar, depois

foi incubado a 65°C por 15 minutos em banho maria, após o tempo de incubação foi adicionado 3µl de RNase Solution no tecido celular e incubado por mais 15 minutos na temperatura de 37°C, em seguida foi deixado 5 minutos na temperatura ambiente antes de prosseguir a extração, passado o tempo foi adicionado 200 µl de Protein Precipitation Solution, e levado ao vortex por 20 segundos, e posteriormente foi centrifugado por 5 minutos de 13.000- 16.000xg. onde as proteínas precipitadas formam um pelet, cuidadosamente foi removido 200 µl do sobrenadante contendo o DNA (deixando o pelet de proteína que foi transferido para um tubo de 1,5 ml contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, gentilmente foram invertidos os tubos até os filamentos de DNA formarem uma massa visível, em seguida foram centrifugadas a 13.000-16.000xg. por 2 minutos e descartado o sobrenadante, adicionando 600 µl de etanol absoluto e invertido o tubo várias vezes para que o DNA possa ser bem lavado, após o procedimento foi levado a centrifuga 13.000-16.000xg. por 1 minuto, em seguida foi aspirado com uma micropipeta e invertido o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixado secar por 1 hora, por fim foram adicionados 100 µl de DNA Rehydration Solution e levado a geladeira por 1 dia e em seguida estocado na temperatura de -20°C

Após a extração de DNA foram realizadas as quantificações através de eletroforese em gel de agarose 1,2% com tampão TBE 10X (Tris/Borato/EDTA). O gel foi corado com solução de GelRed contendo 0,3µg/ml. As imagens foram capturadas com *Ultraviolet Transilluminador* utilizando o programa LPix Image STi.

4.5 SELEÇÃO DE PRIMERS E PCR

Foram testados 3 primers SSR (tabela 1) para a amplificação da PCR, onde se utilizou 4 µL de DNA purificado, 0,3 µL de Taq-DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) 1.0 µL de cada primer F e primer R, 0,9 µL de dNTP, 0,9 µL de MgCl₂, 1.5 µL de tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8) e água mili-Q para um volume final de 15 µL de solução, conforme procedimento descrito por Pepineli et al (2014) com algumas modificações conforme as exigências da espécie *D. nobile*. O programa utilizado para a PCR teve uma extensão inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 32 ciclos com extensão a 94°C por 40 segundos, anelamento a 55-55.5°C (dependendo do primer, ver tabela 1) por 40 segundos e amplificação a 72°C por 90 segundos, seguida por uma amplificação final a 72°C por 10 minutos e 15°C por 20 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,8% com tampão TBE 10X (Tris/Borato/EDTA). O gel foi corado com solução

de GelRed contendo 0,3 µg/ML. As imagens foram capturadas com *Ultraviolet Transilluminador* utilizando o programa LPix Image STi.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os microssatélites foram analisados pelo número de alelos por loco, pela frequência alélica por loco e pelo conteúdo de polimorfismo (PIC) dado pela expressão:

$$1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Onde p_i é a frequência do i -ésimo alelo para uma dada marca, somado ao longo dos n alelos (Lynch e Walsh 1998). O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, considerando o número de alelos que são expressos e também as frequências relativas destes alelos. A leitura das bandas polimórficas será realizada de acordo com o peso molecular de cada alelo. As distâncias genéticas e a análise de agrupamento foram feitas pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with ArithmeticalAverages/ Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Médias Aritméticas) utilizando o programa DARWIN (RHOLF, 1993).

Os parâmetros genéticos foram mensurados com o auxílio do programa GDA (Lewis, 2000). A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para estimar as diferenças dentro de cada procedência e entre as procedências das 40 orquídeas. As análises foram realizadas com o programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Com base na estatística bayesiana, o programa Structure (Pritchard et al.,2000) foi utilizado para inferir o número de grupos (K). Nesta análise utilizou-se um arquivo com dados de genotipagem com 10 arquivos de parâmetros, com valores de K=2 a K=10. Foram realizadas cinco repetições para cada 20 valor de K, usando o modelo admixture com 200.000 períodos de burn e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeia de Markov (MCMC). Onde verificou-se que o K:3 foi o mais adequado para inferir os agrupamentos, em seguida foi calculada a razão de verossimilhança (LnPD) de acordo com os critérios propostos por Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. (2005).

Tabela 1 – Primers SSR para amplificação de DNA da espécie *Dendrobium nobile* Lind. com suas respectivas sequências de nucleotídeos e temperatura de anelamento.

Primers (SSR)	Sequência 5'-3'	Motivo	Tm (°C)
ER30	F: TTAAGTGCCTTGCTTTTCCC	(GGC)3	55
	R: AATTAAATGCCCCATACAAA	(GAA)3	
ER38	F: ATCCGCAACTCTACCACCAT	(CAG)5	55
	R: ACATCCTCATCAGCCTTCAT	(CAG)5	
ER45	F: ACTACGCGATCAGGTCTGTG	(CCT)5	55.5
	R: CTCTGGTGCTTACTACAATGCT	(CCT)5	
ER59	F: AATCATTTCTGGCATTTCG	(CTT)5	55.5
	R: GGTACTGCGTTTCTGTACTCC	(CTT)5	
ER94	F: AGGATGTATGGCACTGAGGA	(GAT)4	55.5
	R: AGGGAGCAGATGATGAACAA	(GAT)4	

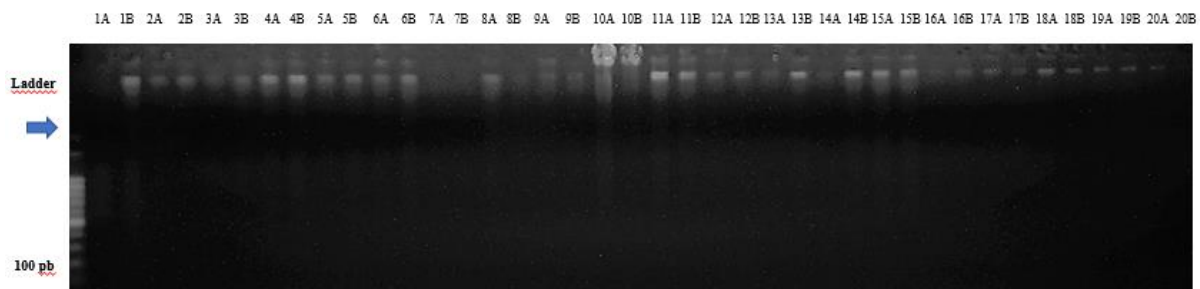
Fonte: LU et al. (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA DA ESPÉCIE *Dendrobrium nobile* Lindl.

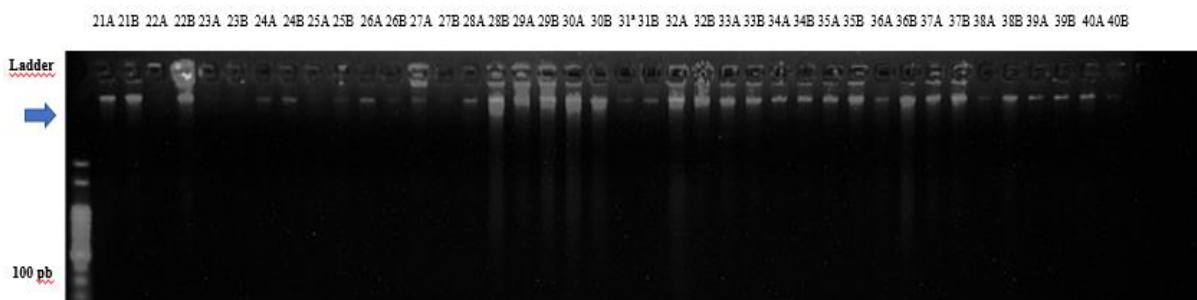
A partir da comparação visual do gel de agarose 1,2% pode-se perceber que o protocolo de extração de DNA para a espécie *D. nobile* foi eficiente, onde apresentou poucas falhas. Conforme a intensidade das bandas de DNA das amostras da progênie é possível estimar que a concentração de DNA variou de 50 a 100 ng/ μ l, conforme é possível perceber na imagem 2 e 3. Resultados parecidos foram encontrados pela autora Kuhn (2011) que realizou seus estudos com *C. forbesii*, usando um protocolo de extração de DNA similar ao que foi utilizado no presente trabalho, todas as extrações ocorreram com sucesso variado a concentração de DNA de 30 a 250 ng/ μ L.

Figura 2: Extração de DNA em gel 1,2% de agarose com as amostras em duplicata de 1a a 20b, provenientes das cidades: Dois Vizinhos (6-10) e Mangueirinha (1-5), Serranópolis (11-15) e Matelândia (16-20).



Fonte: O autor, 2018

Figura 3: Extração de DNA em gel 1,2% de agarose com as amostras em duplicata de 21a a 40b provenientes das cidades: Maringá (31-35) e Cianorte (36-40), Guaramiranga (21-25) e Ponta Grossa (26-30).

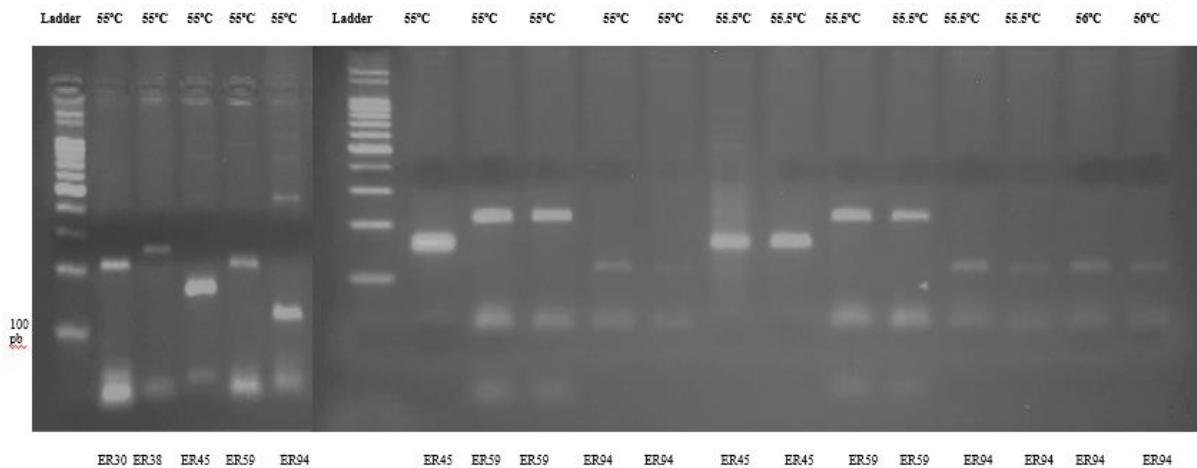


Fonte: O autor, 2018

5.2 PADRONIZAÇÃO DA PCR.

Para a padronização da PCR foi utilizado como referência o trabalho de Lu et al. (2012), que forneceu resultados de desenho dos primers e a padronização da PCR detalhando o programa utilizado no experimento. Foi realizado um teste de gradiente para checar a temperatura que proporcionou o melhor anelamento, conforme a imagem 4, pode-se perceber que para os primers ER30, ER38 a temperatura ideal ficou em 55°C enquanto os primers ER45; ER59; ER94 a temperatura ideal foi de 55,5°C.

Figura 4: Gradiente realizado com as temperaturas 55°C a 56°, utilizando os primers ER30, ER38, ER45, ER59, ER94 em gel 2,8% de agarose .

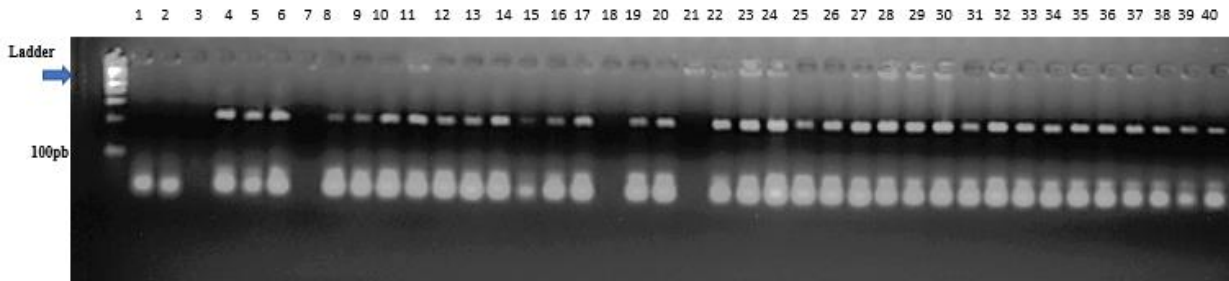


Fonte: O autor, 2018

5.2 GENOTIPAGEM COM OS MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSRs)

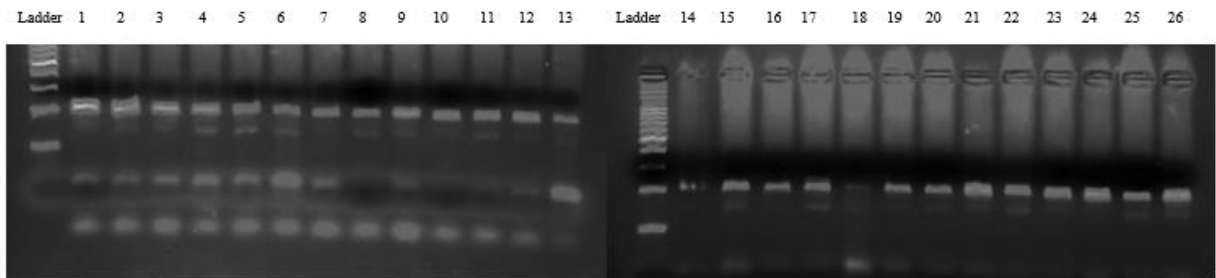
A genotipagem dos três microsatélites foi realizada por meio de análises com gel de agarose 2,8%, corado com GelRed. Para redução dos gastos os géis foram reutilizados por até quatro vezes. No gel foi aplicado no primeiro pocinho o "Ladder" de 100pb e em seguida os produtos de PCR.

figura 5: Genotipagem do primer ER38 com as amostras de Maringá (31-35) e Cianorte (36-40), Dois Vizinhos (6-10) e Mangueirinha (1-5), Guaramiranga (21-25) e Ponta Grossa (26-30), Serranópolis (11-15) e Matelândia (16-20) em gel 2,8% de agarose



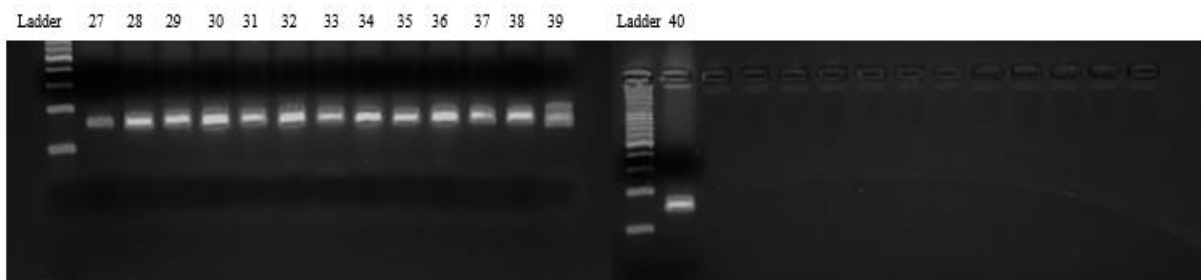
Fonte: O autor, 2018

Figura 6: Genotipagem do primer ER45, com as amostras de Dois Vizinhos (6-10) e Mangueirinha (1-5), Serranópolis (11-15) e Matelândia (16-20), Guaramiranga (21-25) e Ponta Grossa (26) em gel 2,8% de agarose.



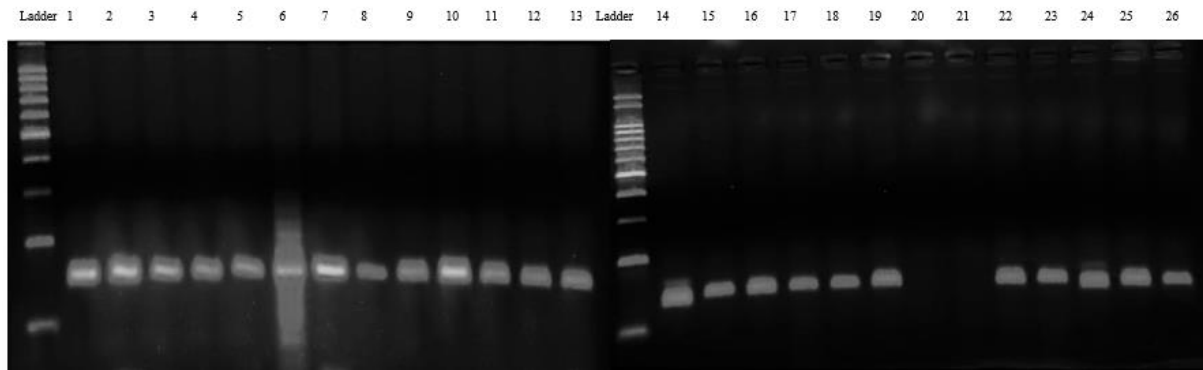
Fonte: O autor, 2018

Figura 7: Genotipagem do primer ER45, com as amostras de Ponta Grossa (27-30), Maringá (31-35) e Cianorte (36-40) em gel 2,8% de agarose



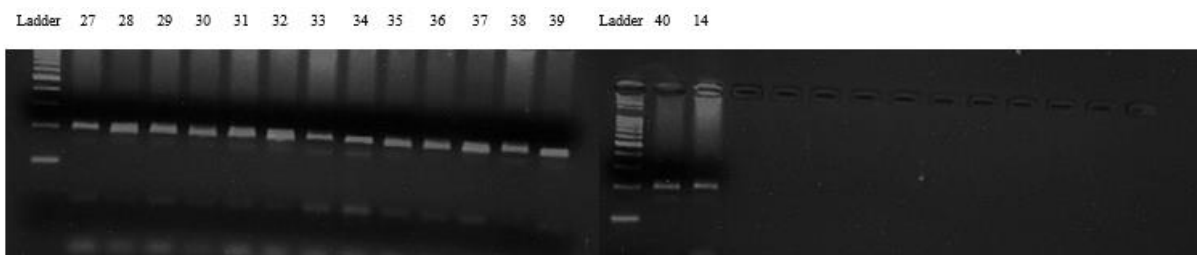
Fonte: O autor, 2018

Figura 8: Genotipagem do primer ER59, com as amostras de Dois Vizinhos (6-10) e Mangueirinha (1-5) Serranópolis (11-15) e Matelândia (16-20), Guaramiranga (21-25) e Ponta Grossa (26) em gel 2,8% de agarose



Fonte: O autor, 2018

Figura 9: Genotipagem do primer ER59, com as amostras de Ponta Grossa (27-30), Maringá (31-35) e Cianorte (36-40) em gel 2,8% de agarose.



Fonte: O autor, 2018

Os três microssatélites utilizados apresentaram polimorfismo, gerando um total de 6 bandas polimórficas. O número de alelos variou de 1 a 2. A espécie *D. nobile* não é considerada uma planta modelo e não possui sequencias genômicas conhecidas, e atualmente os dados que existem ainda são limitados sobre os recursos de marcadores moleculares para a espécie (GU et al., 2007; LU et al., 2012a, b; XIE et al., 2010). Autores como Ye et al. (2015) estudaram a diversidade genética da espécie *Dendrobium moniliforme* com marcadores do tipo AFLP, em seu trabalho eles conseguiram obter um total de 1189 bandas AFLP, as quais foram obtidas de 160 plantas individuais pertencentes a 15 populações de *D. moniliforme* e foram pontuados utilizando cinco combinações de iniciadores AFLP, sendo encontrado bandas polimórficas em todos os primers. Os PICs para os marcadores foram ER30 (0.3725), ER45 (0.3744), ER59 (0.3047) conforme é possível ver na (tabela 2). Bhattacharyya; Kumaria; Tandon (2015) relatam que o PIC para os primers ISSR de *Dendrobium nobile*, foi de (0,58), já os marcadores do tipo DAMD foi de (0,54), e os marcadores ISSR+DAMD apresentaram o PIC de (0,56). Quando comparado com o presente trabalho é possível notar uma pequena variação, mas a mesma pode

ser explicada pelos marcadores ser do tipo dominante diferindo-se dos marcadores que foram utilizados nesse trabalho que são do tipo codominantes. Lu et al (2013) encontraram em seu estudo com marcadores do tipo SSRs para *D. nobile* o valor do PIC bem amplo variando entre intervalo de 0 (DNeSSR83) a 0,891 (DNeSSR65) com uma média de 0,65

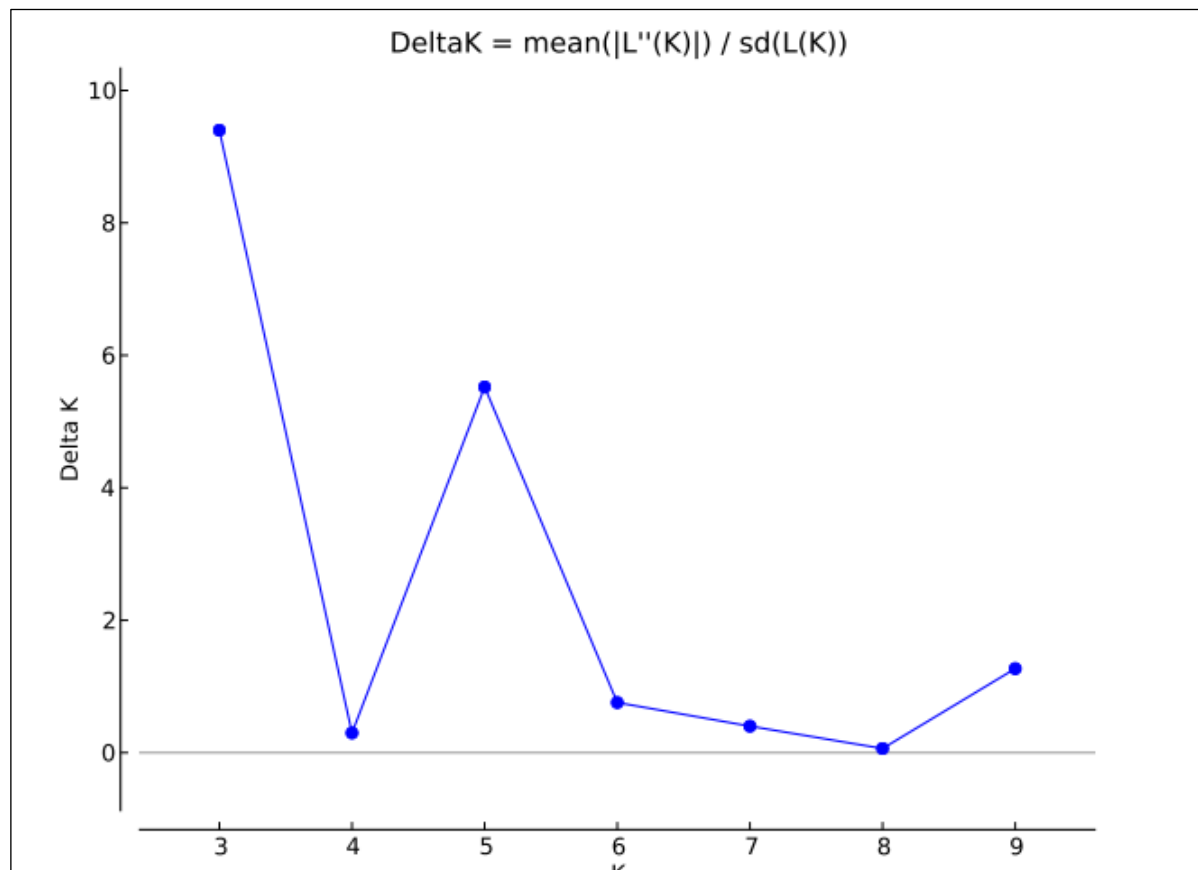
Tabela 2: Dados dos três microssatélites que foram utilizados para genotipar os 40 acessos de *Dendrobium nobile*. Ta: Temperatura de anelamento; PIC: Conteúdo de Informação de Polimorfismo.

Nº	Nomenclatura dos SSRs	Motivos	Ta	Tamanho dos fragmentos amplificados	Alelos	PIC
1	ER30	(GGC)3	55°C	200-203	2	0.3725
2	ER45	(CCT)5	55.5°C	180-183	2	0.3744
3	ER59	(CTT)5	55.5°C	200-203	2	0.3047

Fonte: Lu et al. (2013)

Através dos resultados obtidos pela análise realizada pelo programa Structure com os dados obtidos com a genotipagem dos primers SSRs (figura11), foi possível dividir os 40 acessos em 03 grupos (K=03; figura 10).

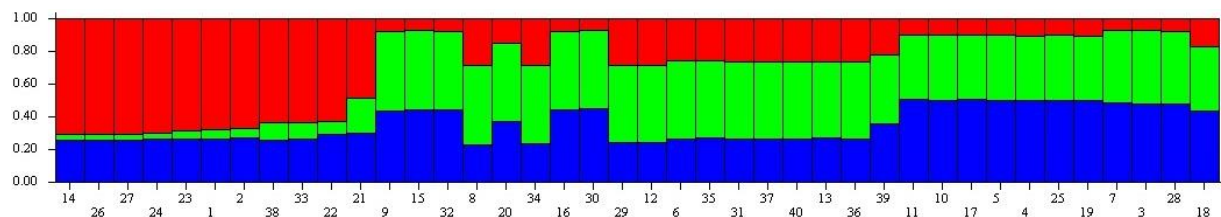
Figura 10: Gráfico gerado pelo programa Structure, mostrando o melhor k (K:3)



Fonte: Structure, 2018

Alguns relatos em literatura de trabalhos que realizam estudos de variabilidade genética têm utilizado o programa Structure para verificar se a formação dos grupos gerados por dendrogramas são de fato robustos (CARDOSO, 2009). Ye et al (2015) realizou as análises com o programa Structere para a espécie *D. moniliforme*, de todas as 15 deu o maior apoio a $K = 2$, sugerindo que todos os indivíduos caíram em dois grupos. A maioria dos indivíduos em populações RL, GS, LB e LG, todos do sudoeste da China, foram categorizados como o primeiro cluster, enquanto a maioria dos indivíduos nas outras populações pertencia ao segundo cluster. O estrutura genética de todas as populações de *D. moniliforme* para $K = 3$ exibidas que todos os indivíduos foram divididos em três grupos, assemelhando-se assim com o presente estudo que obteve o $K: 3$.

Figura 11: Representação dos 40 genótipos de *Dendrobium nobile*, de acordo com a análise bayesiana do programa Structure. Os acessos avaliados foram divididos em 3 grupos ($K=03$). Os acessos estão representados pelas barras coloridas. A mesma cor em acesso



Fonte: Structure, 2018

As diferenças na estrutura genética da população é um importante componente para a estipulação da diversidade genética (QU et al., 2004). Ye et al. (2015) após realizar sua análise no Structure para a espécie *Dendrobium moniliforme* compreendeu três agrupamentos com padrões geográficos distintos, indicando que a estrutura genética dessas populações estava conectada com sua distribuição geográfica. Além disso, a análise de agrupamento do trabalho mostrou que alguns indivíduos em um agrupamento foram agrupados em outro, implicando a mistura genética e as origens comuns compartilhadas por essas populações. Os dados encontrados pelo presente autor confirmam os resultados que foram obtidos no presente trabalho, tanto para o melhor k que ficou ($K:3$) para os dois trabalhos, quanto para a mistura genética e compartilhamento de informações entre as populações. A análise das estruturas genéticas das populações pode revelar as interações de vários processos evolutivos, como fragmentação de habitats, isolamento populacional. e fluxo gênico (GE et al., 1998).

Portanto, o fluxo gênico frequente através de sementes, pólen e seres humanos um papel vital na adaptação de orquídeas a habitats cada vez mais fragmentados. Numerosos estudos também encontraram baixos graus de diferenciação genética entre populações de orquídeas (SWARTS E DIXON, 2009; SWARTS et al., 2009)

5.3 Diversidade Genética

Apesar de ser uma das orquídeas mais importantes medicinalmente, a disponibilidade de informações sobre a diversidade genética de *D. nobile* é muito limitada. A população de plantas emprega seu sistema genético como uma ferramenta para persistir ao longo de gerações em um ambiente em constante mudança (HATTEMER E MELCHIOR, 1993). Em vista disso, é necessário avaliar a diversidade genética das espécies vegetais que enfrentam ameaças de super exploração. A abordagem do uso do sistema de marcadores moleculares tem sido amplamente utilizada para analisar a diversidade genética em intrapopulações, bem como níveis interpopulacionais em muitas espécies de plantas, incluindo orquídeas (MANNERS et al., 2013; YAO et al., 2007).

No presente trabalho foram submetidas as 40 amostras para análise de diversidade genética, porém devido a alguns problemas referentes ao tempo, foram submetidas a genotipagem de apenas três primers, tendo em vista os problemas que foram enfrentados durante o experimento os seguintes resultados são apenas uma hipótese referente a diversidade genética da espécie, no próximos meses serão realizados novas análises utilizando um número maior de marcadores, podendo assim afirmar com certeza a diversidade da espécie. Vários trabalhos sugerem que estimativas precisas da diversidade genética são muito importantes para a conservação de plantas ameaçadas em extinção (NONGRUM et al., 2012; ZHANG et al., 2005b). As análises variam desde graus mais baixos de diversidade até graus mais altos, isso em várias espécies de orquídeas ameaçadas de extinção tais como: *Changnienia amoena*, *Gastrodia elata*, *Goodyera procera* e *V. coerulea* (LI e GE, 2006; MANNERS et al., 2013; WONG; SUN, 1999; WU et al., 2006).

Diante dos resultados obtidos conforme o programa Darwin (figura12), é possível notar que a diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile* no estado do Paraná apresenta-se alta, porém ainda é possível perceber que há uma grande similaridade entre as plantas possuindo um compartilhamento grande de alelos. Autores como Bhattacharyya; Kumaria; Tandon (2015) realizaram a análise da diversidade genética de uma população de *D. nobile* no nordeste da Índia, utilizando marcadores do tipo DAMD e ISSR, eles puderam concluir conforme os resultados obtidos em seu trabalho que a um alto grau de variação genética e fitoquímica existente entre as populações em relação às localizações bioclimáticas e geográficas das populações. Os resultados estabeleceram que a abordagem do marcador cumulativo pode ser eficiente para avaliar as relações genéticas com alta precisão entre distintos acessos de *D. nobile*.

Avaliando os resultados obtidos foi possível perceber que a diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile* no estado do Paraná é alta, no entanto, como foram usados apenas três marcadores microssatélites, não é possível afirmar de forma concreta que a diversidade genética é alta, ainda serão realizados mais testes com um número maior de marcadores moleculares. Segundo determinados autores algumas orquídeas raras como *D. Nobile* (BHATTACHARYYA et al., 2013), *D. officinale* (DING et al., 2008; LI et al., 2008), e *Calanthe tsoongiana*. (QIAN et al. 2013) apresentam níveis mais altos de diversidade genética. Na maioria dos casos, espécies difusas tendem a possuir alta diversidade genética (YU et al., 2011).

Conforme análise do dendograma (figura 12) podemos observar que o grupo composto pelas plantas 27, 26, 24, 23 e 14 apresentaram-se diferentes das demais plantas, formando um grupo monofilético mostrando que elas sofreram algumas alterações genéticas, porém ainda se mantem conservadas dentro do grupo da cidade de Ponta Grossa (região geográfica leste do Paraná), apenas a planta 14 é da cidade de Serranópolis do Iguaçu (região geográfica oeste do Paraná). Quando levamos em consideração a altitude da região leste do Paraná, principalmente a região de Ponta Grossa, ela se encontra entre 850 a 1.188 metros de altitude, sendo a mais alta de todo o estado (ITCG, 2016). Além desse fator a região leste apresenta as temperaturas mais baixas do estado, ajudando assim na diversificação e conservação do grupo das populações que foram coletadas em Ponta Grossa (SIMEPAR, 2018).

Os próximos seis grupos formados no dendograma, grupo 2 (38;33); grupo 3 (amostras 32; 30; 16 e 15), grupo 4 (amostras 40; 37; 36; 35; 31; 13 e 6); grupo 5 (amostras 34; 29 e 12) grupo 6 (amostras 7 e 3) grupo 7 (25; 19; 17; 11; 10; 5 e 4) são bem distintos entre eles, mostrando uma grande diversidade genética, porém dentro de cada grupo os indivíduos são bem parecidos, geneticamente idênticos levando em consideração os 3 primers utilizados na genotipagem, supondo a possibilidade de indivíduos clones, pratica essa que é muito conhecida para a espécie, porém que precisa ser confirmada com a utilização de maior número de primers para análise de uma gama maior de alelos. As demais amostras 39; 28; 22; 21; 20; 18; 2 e 1 se apresentam em grupos separados, mostrando serem diferentes de todos os outros grupos inclusive entre elas. Em estudos com *Dendrobium moniliforme* constatou-se um alto grau de polimorfismo genético, porém foi obtido um número baixo de diversidade genética dentro do mesmo grupo de populações e um alto grau de diversidade entre as populações (MEIRONG et al., 2015)

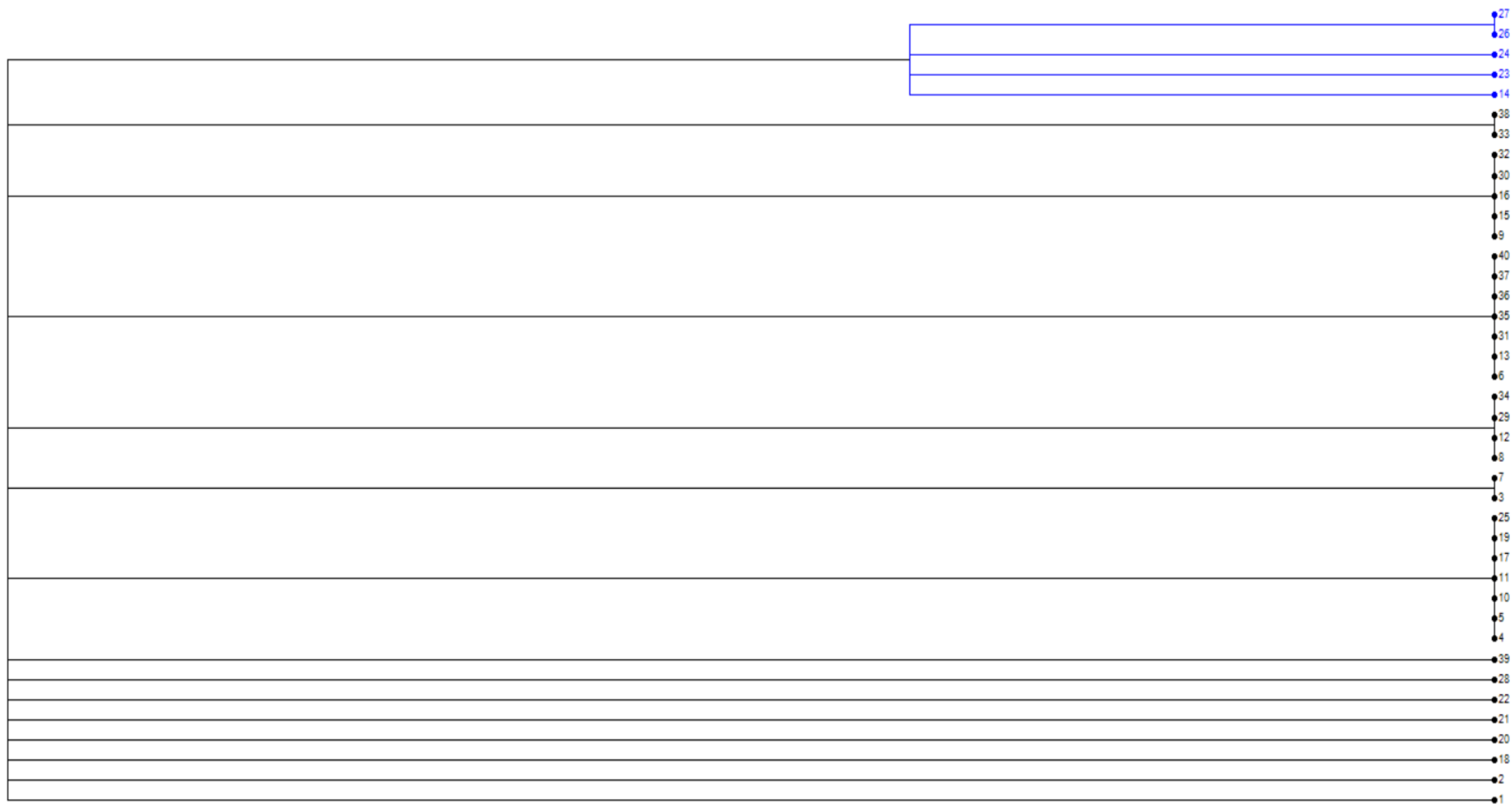


Figura 12: Dendrograma de diversidade genética da espécie *Dendrobium nobile*. Amostras: Maringá (31-35) e Cianorte (36-40), Dois Vizinhos (6-10) e Mangueirinha (1-5), Guaramiranga (21-25) e Ponta Grossa (26-30), Serranópolis (11-15) e Matelândia (16-20).

Cai et al (2011) analisaram com o marcador molecular SRAP, 25 populações de *Dendrobium londgesii* 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 diversidade genética é parte essencial da diversidade biológica, que reflete a capacidade de uma determinada espécie de se adaptar ao ambiente e o potencial de sobrevivência e evolução a longo prazo sob contínuas mudanças ambientais (TRIPATHI et al., 2012; CHEN et al., 2013). Geralmente, a diversidade genética média da população, a aptidão média e o tamanho da população estão positivamente correlacionados (RAOAND; HODGKIN, 2002). No entanto, as orquídeas mostraram-se exclusivas em relação a essas características. Por exemplo, enquanto plantas raras e ameaçadas geralmente apresentam baixos níveis de diversidade genética (SWENSEN et al., 1995).

Bhattacharyya et al (2017) em seu estudo com marcadores AFLP para estipulação da diversidade genética de *D. thyrsiflorum*. Utilizaram os métodos UPGMA e a análise bayesiana de Structure revelou padrões de agrupamento idênticos. Uma análise comparativa dos dados de desvio padrão obtidos ajuda definir a estrutura genotípica e o número de grupos (EVANNO et al., 2005). Os mesmos resultados foram encontrados para *D. nobile* (BHATTACHARYYA et al., 2013). Nos dois trabalhos os autores registraram um maior grau de variabilidade genética entre as populações do que dentro das populações, resultado esse que se assemelha com o do presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

Apesar da utilização de um número baixo de primers microssatélites, é possível perceber que a uma diversidade genética alta para a espécie *Dendobrium nobile* no estado do Paraná. Principalmente entre as regiões geográficas analisadas, porém dentro da mesma região eles se encontram bem conservadas apenas com algumas exceções.

Os marcadores microssatélites se mostraram eficientes para acessar a diversidade genética existentes entre as amostras de *Dendobrium nobile*.

REFERÊNCIAS

- ÁGUAS PARANÁ - Instituto das Águas do Paraná. **Bacias Hidrográficas do Paraná**. Curitiba. 2007. Disponível em: <<http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=80>>. Acesso em: ago. 2017.
- 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). Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/266507986_SEMEADURA_IN_VITRO_DE_ORQUIDEAS_PARA_PROPAGACAO_MASSAL>.
- ARAÚJO, D. **Brasilian orchids**. <<http://www.delfinadearaujo.com/generos/cattleya/cat01.htm>>. Acesso em: Agosto de 2017>. Acesso em : ago. 2017.
- BAO, X. S.; SHUN, Q. S.; CHEN, L. Z. **The medicinal plants of *Dendrobium* (Shihu) in China**. Shanghai Medicinal University Press and Fudan University Press, Shanghai, China. 2001.
- BAKER, M.L. **Orchid Species Culture: *Dendrobium***. Timber Press, Portland. 1996.
- BERED.F; NETO. J.F.B; CARVALHO. F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n.3, p. 513, 1997.
- BHATT. I.D; DAUTHAL.P; GAIRA. K. S; JUGRAN. A; RAWAL. R.S; DHAR. U. Characterization of essential oil composition, phenolic content, and antioxidant properties in wild and planted individuals of *Valeriana jatamansi* Jones. **Scientia Horticulturae**, v. 136, n.1, p. 61-68, 2012.
- BHATTACHARYYA, P. et al. Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. **Gene**, v. 529, n. 1, p. 21–26, 2013.
- BHATTACHARYYA, P. et al. Genetic stability and phytochemical analysis of the in vitro regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. **Meta Gene**, v. 2, p. 489–504, 2014.
- BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Applicability of ISSR and DAMD markers for phyto-molecular characterization and association with some important biochemical traits of *Dendrobium nobile*, an endangered medicinal orchid. **Phytochemistry**, v. 117, p. 306–316, 2015.
- BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; TANDON, P. High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile*: A model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species. **South African Journal of Botany**, v. 104, p. 232–243, 2016.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern

Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580, 2007.

BULPITT, C.J.; LI, Y., BULPITT, P.F.; WANG, J. The use of orchids in Chinese medicine. **Journal of the Society of Medicine**, 100, 558–563. 2007.

CARDOSO, Juliana Morini Küpper. **Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo Carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares**. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-tropical) - Pós-Graduação - IAC.

CARNEIRO, M. S. et al. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, v. 45, n. 4, p. 670–678, 2002.

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMITTEE OF PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. **The Pharmacopoeia of the People's Republic of China**, vol. 1. Chemical Industry Press, Beijing, China. 2005.

DINIZ, I.B.; TINTI, S.; NOGUEIRA, M.F. **O mundo das orquídeas**. São Paulo 2011.

DODSON. C.H. **Orchid**. Encyclopedia Britannica. Disponível em: <https://www.britannica.com/plant/orchid> Acesso em: agosto de 2017.

EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi EL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.2611-2620, jul. 2005.

FENG, Shang-Guo et al. Molecular phylogeny analysis and species identification of *Dendrobium* (Orchidaceae) in China. **Biochemical genetics**, v. 52, n. 3-4, p. 127-136, 2014.

GE, Song et al. Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 159, n. 2, p. 351-357, 1998.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à Genética**. Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

GU, S., DING, X.Y., WANG, Y., ZHOU, Q., DING, G., LI, X., QIAN, L. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Dendrobium officinale*, an endangered herb endemic to China. **Mol. Ecol. Notes** 7, 1166–1168. 2007.

HATTEMER, H. H.; MELCHIOR, G. H. Genetics and its application to tropical forestry. 1993.

HEDRICK, Philip W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, 1999.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa da população**. Paraná: IBGE, 2016. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pr&tema=estimativa2016>> Acesso em: agosto. 2017

IPARDES – INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICA E SOCIAL. 1995. **Paraná em números**. Curitiba: IPARDES. Disponível em:

<http://www.ipardes.pr.gov.br/pr_numeros/index_pr_numeros_pt.htm> Acesso em: agosto de 2017

ITCG- INSTITUTO DE TERRAS, CARTOGRAFIA E GEOLOGIA DO PARANÁ.

Potencialidades e fragilidades das rochas do estado do Paraná. 2006. Curitiba. ITCG. Disponível em:

<http://www.itcg.pr.gov.br/arquivos/File/Contribuicoes_ZEE/Mineropar_2006.pdf> Acesso em: agosto de 2017

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. D. S. Panorama socioeconômico da floricultura no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 17, n. 2, p. 101, 2011.

KALIA, R.K., RAI, M.K., KALIA, S., SINGH, R., DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica** 177, 309–334. 2010.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F.; OTONI, W. C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm

KUHN, B.C. **Análise de diversidade genética em *Cattleya forbesii* (Lindley) (Orchidaceae) propagadas in vitro**. 2011.41p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Estadual de Maringá-UEM. 2011.

LAU, D.T.W., SHAW, P.C., WANG, J., BUT, P.P.H. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. **Planta Med**. 67, 456–460. 2001.

LAVARACK, B; HARRIS, W; STOCKER, G. ***Dendrobium and Its Relatives***. Timber Press, Portland/USA.2000.

LEE, Y. H. et al. In Vitro and In Vivo Antitumoral Phenanthrenes from the Aerial Parts of *Dendrobium nob ile*. **Planta Med**, v. 61, p. 180–182, 1995.

LEITCH, I. J. et al. Genome size diversity in orchids: Consequences and evolution. **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 469–481, 2009.

LIU, K., MUSE, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics** 21, 2128–2129. 2005.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. p.151

LU, J.J., GAO, L., KANG, J.Y., FENG, S.G., HE, R.F., WANG, H.Z. Thirteen novel polymorphic microsatellite markers for endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale*. *Conserv. Genet. Resour.* 2012a.

LU, J.J., SUO, N.N., HU, X., WANG, S., LIU, J.J., WANG, H.Z. Development and characterization of 110 novel EST-SSR markers for *Dendrobium officinale* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 99, e415–e420. 2012b

LU, J. J. et al. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, v. 137, p. 1-10, 2012.

LU. X; WANG. H. LIU. B; XIANG. J. Three EST-SSR Markers Associated with QTL for the Growth of the Clam *Meretrix meretrix* Revealed by Selective Genotyping. *Marine biotechnology*, v. 15. p 16-25, 2013.

NASS, L.L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Embrapa. 2007

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, v. 94, n. 1–2, p. 107–116, 2002.

NAZARENO, Alison G.; ZUCCHI, Maria I.; REIS, Mauricio S. dos. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brazil. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 7, p. e198-e200, 2011.

MA, J.Q., MA, C.L., YAO, M.Z., JIN, J.Q., WANG, Z.L., WANG, X.C., CHEN, L., Microsatellite markers from tea plant expressed sequence tags (ESTs) and their applicability for cross-species/genera amplification and genetic mapping. *Sci. Hortic.* 134, 167–175. 2012

MANNERS, Viki; KUMARIA, Suman; TANDON, Pramod. SPAR methods revealed high genetic diversity within populations and high gene flow of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl (Blue Vanda), an endangered orchid species. *Gene*, v. 519, n. 1, p. 91-97, 2013.

MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae*, v. 108, n. 1, p. 95–99, 2006.

MORAES, M. M.; CAVALCANTI, L. C. D.; FARIA, R. T. **Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas in vitro**. *Acta Scientiarum, Maringá*, v.24, n.5, p 1397-1400, 2002.

MIYAZAWA, M. et al. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 8, p. 2849–2853, 1997.

OLIVEIRA, E. J., PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R., & VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29(2), 294-307, 2006.

PORTIS, E. et al. Construction of a reference molecular linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 1, p. 59–70, 2009.

PRICE, A. L. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature genetics**, v. 38, n. 8, p. 904, 2006.

QU, Z. HARTZELL. C. Determinants of anion permeation in the second transmembrane domain of the mouse bestrophin-2 chloride channel. **The Journal of general physiology**, v. 124, n. 4, p. 371-382, 2004.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012.

REDDY, M.P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17, 2002.

REIS. J.N.P. **Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar**. IX Encontro da Sociedade Brasileira de Economia e Ecologia. Distrito Federal, Brasília. 2011.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1., New York, USA, 2000.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas in vitro de orquídeas. **Cesumar**, v. 9, p. 7-12, 2007.

SEBBENN, A. M. et al. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 134, 2011.

SCHULTZ SOARES, J. et al. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, 2014

SHAW, P.C;WANG, I. Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2–3, p. 297–298, 2003.

SILVA, C.I; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Caracterização morfológica das sementes e das primeiras fases do ciclo de vida de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Arq. Apadec**, 8(2): 22-26, 2004.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1986. 96p.

SINGH, D.K. **Orchid diversity in India: an overview**. In: Pathak, P., Sehgal, R.N., Shekhar, N., Sharma, M., Sood, A., (Eds.), BSMPS Orchid. Sci. Commer. Dehra Dun, pp. 35–65. 2001.

- SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.3, p.495-503, 2015.
- STANCIK. J.F; GOLDEBERG.R; BARROS.F. O gênero *Epidendrum* L.(Orchidaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n.3, São Paulo. 2009.
- SWARTS, Nigel D.; DIXON, Kingsley W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of botany**, v. 104, n. 3, p. 543-556, 2009.
- UENO,S. **Diversidade e estrutura genética da população de *Oeceoclades maculata* Lindl.** 2013. 76p. Dissertação (Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade de São Paulo-USP. 2013.
- VICHIATO. M.R.M; VICHIATO.M. CASTRO. D.M; DUTRA.LF; PASQUAL. M. Alongamento de plantas de *dendrobium nobile* lindl. com pulverização de ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, vol.31, n.1, Lavras. 2007.
- TINTI.S; CILIONI.J.R. **O mundo das orquídeas**. São Paulo 2011.
- WANG, H.Z., FENG, S.G., LU, J.J., SHI, N.N., LIU, J.J., Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Sci. Hortic.** 122, 440–447. 2009.
- WANG, Y., LI, Z.J., PENG, H.M. **The Dendrobium**. Science Press, Beijing. 1999
- WANG, Z., LI, J., LUO, Z., HUANG, L., CHEN, X., FANG, B., LI, Y., CHEN, J., ZHANG, X. Characterization and development of EST-derived SSR markers in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **BMC Plant Biol.** 11, 139. 2011
- WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzymology**, v.395, p. 134-44, 2005.
- XIE, M.L., HOU, B.W., HAN, L., MA, Y.H., DING, X.Y. Development of microsatellites of *Dendrobium officinale* and its application in purity identification of germplasm. **Yao Xue Xue Bao** 45, 667–672. 2010.
- YE, Q; QIN, G; ZHAO, W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 885–890, 2002.
- YU, J.K., DAKE, T.M., SINGH, S., BENSCHER, D., LI, W., GILL, B., SORRELLS, M.E. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. **Genome** 47, 805–818. 2004.
- YUE, G.H., LAM-CHAN, L.T., HONG, Y. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. **Mol. Ecol. Notes** 6, 832–834. 2006.
- ZHAO, W. et al. Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with

immunomodulatory activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 9, p. 1196–1200, 2001

ZHENG, R.P; ZHENG, Q; YU, J.Y; ZHANG, Y; FAN, W.F. Hybridization breeding and AFLP analysis of relative relationship of Nobile-type *Dendrobium*. **Journal Zhejiang Forest Coll.** Volume 26, Issue 1, Pages 137-141. 2006.

ZIETKIEWICZ, E; RAFALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183. 1994.