



Universidade Estadual de Londrina

DANIELE CASSIANO FELICIANO

“ANÁLISE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Oncidium flexuosum* Sims, COLETADAS EM FRAGMENTOS FLORESTAIS”

**Londrina
2016**

Daniele Cassiano Feliciano

“ANÁLISE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Oncidium flexuosum* Sims, COLETADAS EM FRAGMENTOS FLORESTAIS”

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Paulo Maurício Ruas

**Londrina
2016**

RESUMO

FELICIANO, D. C. **ANÁLISE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Oncidium flexuosum* Sims, COLETADAS EM FRAGMENTOS FLORESTAIS**. Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, 2016.

A família Orchidaceae, é considerada a mais diversificada e a maior entre as Angiospermas, com aproximadamente 35.000 espécies que totalizam cerca de 7% das plantas ornamentais do planeta (YEW e HEW, 2000; ALTAFIN et al., 2003). O gênero *Oncidium* foi estabelecido por Olof Swartz em 1800. Trata-se de um gênero amplamente distribuído na América Tropical (DRESSLER, 1993). Das 315 espécies do gênero, 100 são encontradas no Brasil, considerado seu centro de diversidade (SENGHAS, 1998, 2000). As inflorescências podem ser em cachos ou panículas multiflorais ou uma única flor. São geralmente amarelas, com marcas castanho-oliváceas ou castanho-avermelhadas, ou castanhas com manchas amarelas, ou até, mais raramente, brancas, rosas ou lilases (FARIA, 2004). A estrutura genética de uma população de plantas está diretamente relacionada à fatores como tamanho efetivo da população, dispersão de pólen e sementes e sistema reprodutivo estes, representam efeitos significativos sobre elas (NYBOM e BARTISH, 2000). A espécie *O. flexuosum*, como a maioria das orquídeas são alógamas, polinizadas por animais. As alógamas são mais variáveis do que as autógamias. A variabilidade genética é de importância fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie. A perda da variabilidade genética pode então, conduzir uma espécie à extinção (BOUZAT, 2001; SHARMA, 2001; SHARMA et al., 2000). Marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados em estudos de genética populacional, diversidade e diferenciação genética, mapeamento e análises de similaridade e como ajuda na classificação das espécies de orquídeas e gêneros (TSAI et al., 2002; OBARA-OKEYO e KAKO, de 1998; WILLIAMS et al., 2001).

SUMÁRIO

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO	2
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVOS GERAIS	3
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
4.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE – GENEROONCIDIUM	4
4.2 ESPÉCIE <i>Oncidium flexuosum</i>	5
4.3 MARCADORES MOLECULARES.....	5
4.4 CONSERVAÇÃO.....	6
5. MATERIAL E MÉTODOS	7
5.1 AMOSTRAGEM	7
5.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	7
5.3 EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISES.....	8
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9

1- IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Nome do Aluno: Daniele Cassiano Feliciano

Telefone:

Celular (43) 9922-7350

E-Mail: daniele.uenp@gmail.com

Endereço Residencial: Rua: Laura Atizano Landgraf, 219 – São Silvestre – Cornélio Procopio-PR.

Endereço Comercial: Rod. Celso Garcia Cid PR 445 - Campus Universitário Londrina-PR

CPF: 066.382.889-97

R.G.: 10.226.927-6/ SSP-PR

Instituição de Ensino: Universidade Estadual de Londrina – UEL (Departamento de Biologia Geral – CCB)

Programa: Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas

Co-Orientador: Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira

Título do Projeto: Análise Genética de Populações de *Oncidium flexuosum*, coletadas em fragmentos florestais

Linha de pesquisa do Programa: Diversidade Genética

2. JUSTIFICATIVA

A estrutura genética de uma população de plantas está diretamente relacionada à fatores como tamanho efetivo da população, dispersão de pólen e sementes e sistema reprodutivo estes, representam efeitos significativos sobre elas. A espécie *O. flexuosum*, como a maioria das orquídeas são alógamas, polinizadas por animais. A família Orchidaceae embora seja polinizada por diversos grupos de insetos (Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera) e de aves, os Hymenoptera, principalmente as abelhas, são os mais importantes polinizadores de suas flores. Existem poucas informações sobre os polinizadores da espécie, dados que poderiam auxiliar a entender como é a biologia reprodutiva desta espécie que são autoincompatíveis.

Por isso, à necessidade de avaliar os índices de diversidade genética neste estudo para verificar como se comportam dentro das populações. Se apresentarem baixos índices podemos inferir fenômenos tais como a fragmentação de habitat e de alta pressão de coleta, que provoca gargalos genéticos e fluxo de genes limitado entre as populações. Por essas razões, as orquídeas estão entre as plantas mais seriamente ameaçadas.

3. OBJETIVO GERAL

Considerando que a variabilidade genética é de importância fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie, a fragmentação de uma população pode também expor as espécie à efeitos da endogamia e deriva genética, processos que ocorrem naturalmente em qualquer população. Populações isoladas e pequenas estão mais sujeitas a estes efeitos, apresentando normalmente menor variabilidade genética. O presente estudo visa entender o processo evolutivo que esta ocorrendo e com isso correlacionar à conservação da espécie, principalmente a necessidade de preservar e conservar os fragmentos florestais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises moleculares que permitam quantificar a variabilidade genética;
- Construir um conjunto ordenado de sequências do genoma para análises mais específicas de diversidade;

- Disponibilizar as sequências identificadas para futuras comparações e buscas em bancos de dados de sequências juntamente com informações sobre a espécie utilizada;
- Relacionar a presença da espécie e sua diversidade genética aos diferentes tipos de Habitat em que foram encontradas.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE – GÊNERO ONCIDIUM

A família Orchidaceae é considerada uma das maiores e mais diversificada entre as Angiospermas, composta por aproximadamente 35.000 espécies totalizando 7% das plantas ornamentais do planeta (ALTAFIN et al., 2003; YEW e HEW, 2000) e entre 8% e 10% de todas as plantas com flores (BUZATTO et al, 2007). Cerca de 2.500 espécies são encontradas no Brasil (MENDONÇA et al., 2008). Constitui uma família contemporânea, com desenvolvimento lento, numerosas subfamílias, englobando aproximadamente 850 gêneros (LUER, 2002; DRESSLER, 1981). Podem ser perenes, epífitas, terrestres, rupestres ou saprófitas; o arranjo das estruturas das flores é bastante uniforme na maioria das espécies (DRESSLER, 1993), apresentando formas, cores e tamanhos muito variáveis e elevada complexidade (PABST e DUNGS, 1975, 1977; PINHEIRO et al., 2004). O fruto deiscente é constituído por uma cápsula que abriga as mais de 80.000 sementes, que quando madura, expõe-nas aos variados dispersores (PIERIK, 1997; BACH e CASTRO, 2004). Geralmente cultivadas por sua beleza, exotismo e fragrância das flores, a indústria hoje envolve centenas de milhões de dólares em todo mundo por ano. Algumas orquídeas tem uso na alimentação humana, como a baunilha, a mais conhecida do gênero *Vanilla* que são utilizadas na aromatização de alimentos, e o Salepo que é um líquido rico em mucilagem com sabor adocicado extraído das raízes de algumas espécies (TOSCANO e MORAES, 2002). Além disso, as espécies da família vêm sendo utilizadas na medicina tradicional, para o tratamento de inflamações, abscessos, feridas, sangramentos externos, e pele gretada (WARD, 1936).

O gênero *Oncidium* é amplamente distribuído na América Tropical e compreende aproximadamente 400 espécies, e aproximadamente 100 são encontradas no Brasil. São comumente epífitas, mas algumas são facultativas ou exclusivamente terrestres (FARIA, 2004). Em sua maioria, possuem pseudobulbos com duas ou três folhas apicais, inflorescência racemosa ou paniculada, ocasionalmente uniflora. As

flores são pequenas e bastante admiráveis (GARAY e STACY, 1974) com coloração amarela em algumas espécies fazendo com que sejam conhecidas popularmente por chuva-de-ouro. A coloração frequentemente se encontra associada à tons castanhos, resultando em belo aspecto visual, fazendo dos gênero orquídeas populares entre amadores e profissionais (BRITO e CRIBB, 2005).

4.2 ESPÉCIE *Oncidium flexuosum* Sims

Oncidium flexuosum Sims, popularmente conhecida como a "orquídea bailarina", é uma das espécies mais importantes do gênero *Oncidium* no Brasil (JOLY, 1993; RAVEN, 2001). É uma planta epífita, que sua inflorescência pode atingir 1m de altura e possui um grande número de flores que formam inflorescências ramificadas com atraentes flores de tamanho aproximado de 2,5 cm. As sépalas e pétalas são de cor amarela, com manchas marrom-avermelhadas, e o labelo é destacado com pequenos pontos vermelhos (PABST, 1972; GARAY e STACY, 1974).



4.3 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores dominantes são aqueles que detectam o polimorfismo genético de natureza binária, baseados em presença ou ausência do segmento amplificado, não distinguindo indivíduos homozigotos dominantes e heterozigoto para um determinado locus. Estão entre eles, os marcadores AFLP e RAPD (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores AFLP se destacam pelo grande número de fragmentos detectados em um único gel, tornando-os muito eficientes na amostragem do genoma. O grande poder de detecção de variabilidade genética advém da exploração simultânea da presença e da ausência de sítios de restrição, a exemplo dos marcadores “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) e da ocorrência de amplificação de sequências arbitrárias, como nos marcadores “random amplified polymorphic DNA” (RAPD). A utilização de iniciadores mais longos no AFLP, na fase de “polymerase

chain reaction” (PCR), aumenta a especificidade da amplificação e evita a competição que ocorre durante a PCR na análise RAPD (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A riqueza de informações no genoma não teria nenhuma utilidade para os ecologistas moleculares se elas não pudessem ser acessadas e quantificadas. Isso se tornou possível a partir de 1985, graças a Kary Mullis, que elaborou um método conhecido como reação de cadeia polimerase (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987). Este foi um avanço fenomenal que permitiu aos pesquisadores isolar e amplificar regiões específicas do DNA de genomas grandes e complexos. De fato, a PCR é de grande importância para as diversas disciplinas da biologia, incluindo a ecologia molecular, genética de populações e evolução (FREELAND, 2005; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995) marcador molecular define-se como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

De acordo com Sodré e al., (2002) AFLPs, RAPDs, SSRs, são exemplos dos muitos marcadores baseados em PCR, que abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização para a análise dos polimorfismos encontrados na molécula de DNA (BEEBEE; ROWE, 2008). Marcadores moleculares como microssatélites, RAPD, RFLP e DNA mitocondrial, permitem a identificação e interferências de parentesco, distâncias genéticas relativas, fundadores de novas populações, indivíduos não identificados, estrutura das populações e tamanho populacional efetivo (SOLE-CAVA, 2001).

4.4. CONSERVAÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas mais seriamente ameaçadas, e a vulnerabilidade resulta de várias razões, como por possuir ciclo de vida altamente especializado, sementes com pouca ou nenhuma reserva, sendo estas dependentes da associação com fungos micorrízicos, e a ação do homem por meio da destruição do habitat, derrubando árvores e florestas, além da sua coleta indiscriminada na natureza (FERREIRA e SUZUKI 2008). Acredita-se que em até 50 anos plantas vasculares terão 25% de suas espécies extintas devido à muitos fatores envolvidos como a destruição de habitats e consequente fragmentação de populações (KALA, 2000; MAMATOCQ e VILLABLANCA, 2001).

Como as plantas apresentam grande diversidade de sistemas reprodutivos, o fluxo de genes, tanto dentro como entre populações dependerá da sua estrutura

reprodutiva, estando praticamente impedida no caso de populações que se reproduzem assexuadamente e ocorrendo em diferentes modos e graus no caso de populações com reprodução sexuada. Portanto, o conhecimento da composição genética de uma espécie e de como ela está organizada é de fundamental importância para ações de manejo e conservação, permitindo assim entender a realidade atual de ecossistemas, possibilitando melhor direcionamento dos esforços de conservação (FRANKHAM et al., 2010).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Serão amostrados, cerca de 25 indivíduos da espécie, caso ocorram nos fragmentos florestais listados abaixo, para o estudo.

16-Estação Ecológica do Caiuá
31-Parque Estadual da Ilha do Mel
38-Parque Estadual de Vila Velha
40-Parque Estadual do Cerrado
41-Parque Estadual do Guartelá
42-Parque Estadual do Lago Azul
45-Parque Estadual do Penhasco Verde
46-Parque Estadual do Vale Do Codó
48-Parque Estadual Mata dos Godoy
49-Parque Estadual Mata São Francisco
59-Parque Estadual de Ibiporã
65-Reserva Florestal do Saltinho
66-Horto Florestal de Jacarezinho
Parque Nacional do Iguaçu

5.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As coletas serão realizadas no decorrer do ano de 2016/17 de outubro de 2016 a outubro de 2017, contudo podem haver mais coletas dependendo do sucesso das mesmas. As amostras serão coletadas ao acaso, de plantas distintas, de cada uma das populações, sendo estas de folhas jovens (porção bem pequena), de cada Unidade de Conservação ou Fragmentos Florestais conservados.

5.3 EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISES

O DNA será extraído das folhas coletadas das vinte e cinco plantas, seguindo a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1987), 300 mg de material biológico; as folhas ou plântulas serão maceradas em 1000µl de tampão extração com a utilização de nitrogênio líquido. O DNA será ressuspenso em 50µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) , e armazenado a -20°C. Para o teste de integridade do DNA foi utilizado gel de Agarose a 1%. A quantificação será realizada em espectrofotômetro. O DNA foi diluído em TE para 20 ng/µL e armazenado a -20°C, para ser utilizado nas reações de amplificação. Os componentes das reações de amplificação do DNA serão: Tampão 1x; dNTP 0,2mM; MgCl₂ 3,5mM; Primer 0,4mM DNA polimerase 1U e DNA 20ng e água estéril para completar o volume de 15µL.

O programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005) foi empregado na análise da AMOVA (Análise da Variância Molecular), usado para estimar a partição da variação genética dentro e entre as populações. A partir da AMOVA também foi calculada a diferenciação genética entre as populações (Excoffier et al., 1992), utilizando o índice Φ_{ST} (análogo de F_{ST}) (Weir & Cockerham, 1984), nas comparações par a par dos dados de RAPD. As estimativas de significância foram conduzidas com base em 10.000 permutações.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Durante o desenvolvimento do projeto serão desenvolvidas as seguintes atividades:

- Revisão bibliográfica referente a assuntos abordados no projeto;
- Extração de DNA das amostras;
- Sequenciamento dos fragmentos;
- Análise dos dados obtidos;
- Qualificação;
- Redação da dissertação e artigo científico;

Cronograma de atividades no período de 12/07/2016 à 17/07/2018

Atividade	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Processamento Do Material Biológico				X	X	X	X					
Extração de DNA									X	X	X	X
Sequenciamento COI								X	X	X	X	X
Análise dos Resultados								X	X	X	X	X

Atividade	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro
Análise de Dados		X	X	X								
Elaboração Dissertação					X	X	X	X	X	X	X	X
Qualificação									X			
Defesa da Dissertação		X*										
Envio do Manuscrito Para publicação		X*										

X* mês do ano de 2018

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAFIN, R.L.M. et al. Semeadura in vitro de orquídeas para propagação massal. Espírito Santo do Pinhal, SP: Unipinhal, 2003. (Boletim técnico, n.7).
- BACH, E. E., CASTRO, O. L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp (Orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. Arq. Inst. Biol. São Paulo, v. 71 (supl.), p. 1-749, 2004.
- BOUZAT, J.L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in na agricultural landscape. *Biological Conservation*, v.99, p.277-284, 2001.
- BRITO, A.L.V.T. e CRIBB, P. Orquídeas da Chapada Diamantina. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 2005
- BUZATTO et al. Levantamento da família Orchidaceae ocorrentes na Fazenda São Maximiano, município de Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; 5(2/3):19-25.
- CHANG, D.C.N. & CHOU, L.C. Seed germination of *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and the use of mycorrhizae. *Symbiosis*, 30:29-40, 2001
- DOYLE, J.J. and DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19, 11-15.
- DRESSLER, R. L. The orchids: natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press, 1981. 332 p
- DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, OR. 314p 1993.
- FARIA, A. D. Sistemática filogenética e delimitação dos gêneros da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) endêmicos do Brasil: *Baptistonia*, *Gomesa*, *Ornithophora*, *Rodrigueziella*, *Rodrigueziopsis* e *Oncidium* pro parte. 2004. 119 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.
- Ferreira, W.M. & Suzuki, R.M. 2008. O cultivo in vitro de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: M.I.B. Loiola, I.G. Baseia & J.E. Lichston (org.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Imagem Gráfica, Natal, pp. 67-68
- FISHER, R.A. The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon Press 1930. 272p.
- FLEISHMAN, E.; LAUNER, A.E.; SWITKY, K.R. et al. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus*

palmatus and its implications for management planning. *Biological Conservation*, v.98, p45-53, 2001.

FRANKHAM, R.; BALLOU, L.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos da genética da conservação. Tradução de M. R. Francisco; L.P.Farias. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 262p.

GARAY, L. A. and STACY, J. E. Synopsis of the genus *Oncidium*, Bradea, vol. 1, no. 40, pp. 393–427, 1974.

JOLY, A. B. Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal, Companhia Editora Nacional, 11th edition, 1993

LUER, C.A. A systematic method of classification of the Pleurothallidinae versus a strictly phylogenetic method. *Selbyana* ;23(1):57-110. 2002

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGEIRA, P. E.; FAGG, C. W. 2008. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. Cerrado ecologia e flora. v. 2. Brasília: Embrapa Cerrados, 1279 p.

OBARA-OKEYO, P. and KAKO, S. 1998. Genetic diversity and identification of cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 99, 95-101.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. *Orchidaceae Brasilienses*. Hildesheim: Kurt Schmiersow, 1975. v. 1. 408 p. PABST, G. F. J.; DUNGS, F. Hildesheim: Kurt Schmiersow, 1977. v. 2. 418 p.

PABST, G.F.J. 1972. Estudos no gênero *Oncidium* Sw. (Orchidaceae) - IV. *Bradea* 1 (15) :137-143

PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. 1a ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997.

PINHEIRO, F.; BARROS, F.; LOURENÇO, R. A. O que é uma orquídea? In: BARROS, F.; KERBAUY, G. B. (Org.). *Orquidologia sulamericana: uma compilação científica*. São Paulo:Secretaria do Meio Ambiente, 2004. cap. 1, p. 11-33. RAVEN, P. H., R. F. Everest, and S. E. Eichhorn, *Biologia Vegetal*, Guanabara Koogan, 6th edition, 2001.

SHARMA, I.K. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in an endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria bauerlenii*, and its implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.29, p.681-695, 2001.

SHARMA, I.K.; CLEMENTS, M.A.; JONES, D.L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae) *Biochemical Systematics and Ecology*, v.28, p.651-663, 2000.

TOSCANO, L. A. de B. & MORAES, M. M. de. Saiba mais sobre orquídeas. Acesso em: 25/10/2013. Disponível em: <http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas/autorescitacao.htm>. 2002

TSAI, C. C., HUANG, S.C., HUANG P.L., CHEN, Y.S. and CHOU, C. (2002), H..Phenetic relationship and identification of subtribe Oncidiinae genotypes by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Scientia Horticulturae*, 96, 303-312.

WARD, H. *Herbal Manual: The Medicinal, Toilet, Culinary and other Uses of 130 of the most Commonly Used Herbs*, LN Fowler & Co, London, UK, 1936.

WANG, C.L.; CHU, J.N.; CHEN, C.Y. & CHAO, Y.C. Influence of orchid mycorrhizal fungi *Rhizoctonia* spp. on the growth of *Oncidium Goldiana* X *Onc. Guiana* Gold seedlings. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA*, 3., Taichung, 2000. *Anais. Taiwan, International Society of Plant Pathology (Rhizoctonia Committee)*, 2000

WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research* 18, pag. 6531-6535

WILLIAMS, N.H.; CHASE, M.W. and WHITTEN, M. 2001. Phylogenetic positions of *Miltoniopsis*, *Caucaea*, a new genus, *Cyrtochiloides*, and *Oncidium phymatochilum* (Orchidaceae: Oncidiinae) based on nuclear and plastid DNA sequence data. *Lindleyana*, 16, 272-285.