

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (FINGERPRINT) DE GENÓTIPOS DE ANTÚRIO**José Dias de Souza Neto¹, Maristela Aparecida Dias², Pablo Diego Silva Cabral³, Diogo de Souza Alves¹, Franciele Barros de Souza¹, Taís Cristina Bastos Soares¹**¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Zootecnia, josedsneto@yahoo.com.br²Universidade Federal de Viçosa/Fitotecnia, diasmunizf@yahoo.com.br³Universidade Estadual Norte Fluminense (CCTA), pablodscabral@hotmail.com¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Zootecnia, diogosouzalves@hotmail.com¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Zootecnia, francielesouza@gmail.com.br¹Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES)/Zootecnia, tcbsoares@yahoo.com.br

Resumo- A atividade floriculturista no Brasil vem crescendo a cada ano, e uma das flores que mais se destacam nesta atividade é o antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.), planta pertencente a família das aráceas. A durabilidade e a beleza exótica desta flor fazem com que esta ocupe o segundo lugar nas exportações de flores tropicais. Uma das técnicas que possibilitarão a maior diversificação do produto é a aplicação de marcadores moleculares. Marcadores moleculares do tipo RAPD são hoje aplicados em estudos de divergência genética, podendo ser utilizados para seleção de cruzamentos favoráveis à melhoria da espécie. O presente trabalho avaliou a diversidade genética entre 20 cultivares de *Anthurium andraeanum* com utilização de 15 Primers RAPD tomados ao acaso. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,2% durante 3,5 horas sob voltagem de 110. Os fragmentos geraram uma matriz na qual, pelo programa genes foi possível a diferenciação entre os genótipos, sendo selecionados dois com maior divergência, comparados aos demais. Estes poderão ser implementados em futuros programas de melhoramento.

Palavras-chave: Antúrio, diversidade genética, marcadores moleculares, RAPD.**Área do Conhecimento:** Genética**Introdução**

A floricultura no Brasil vem se expandindo com taxas de crescimento de 20% ao ano (BUAINAIN e BATALHA, 2007), agregando nos últimos anos mais de cinco mil produtores, os quais cultivam uma área de 8.423 hectares, de flores e plantas com destino tanto para folhagens, como para ornamentação. (JUNQUEIRA e PEETZ, 2008). Dentre as plantas cultivadas, o antúrio é uma das flores tropicais que se destaca, ocupando o segundo lugar entre as mais exportadas, possuindo um dos maiores valores unitários segundo a CEAGESP (2009). Por apresentar grande beleza exótica e durabilidade, são ótimas opções em arranjos e decorações de interiores (JARDIM DE FLORES, 2010).

O antúrio pertence à família das Aráceas, incluindo-se no gênero mais de 600 espécies, muitas delas herbáceas tropicais, originárias das regiões quentes e centrais da América do Sul. Menos que um décimo dessas espécies encontra-se em cultivo. Do ponto de vista comercial, a principal espécie do gênero é o *Anthurium andraeanum* Lindl., utilizado como flor de corte e também como planta de vaso (TOMBOLATO, 2009).

Desde 1991, a área de cultivo do antúrio cresce continuamente, graças à evolução de sua tecnologia de cultivo, uniformidade de plantas e material básico livre de doenças e vírus. Tais características conseguidas através do uso da cultura de tecidos, pelo uso de variedades e tecnologias que contribuíram para o aumento da produtividade e expansão de mercado (VAN HERK et al., 1998). Uma das técnicas que contribuirão efetivamente para o sucesso do cultivo de antúrio é a utilização de marcadores moleculares. Marcadores moleculares são tidos como ferramentas úteis para detecção de variações no genoma, aumentando o poder de análise genética de plantas (CAIXETA et al., 2009).

Dentre as classes de marcadores moleculares disponíveis, o RAPD é um dos que podem ser utilizados para discriminação dos exemplares. Isto favorece a tomada de decisão em cruzamentos entre cultivares com objetivo de obter novos exemplares. Portanto a meta deste trabalho consiste na caracterização molecular de 20 genótipos de *Anthurium andraeanum* Lindl. com utilização de marcador molecular do tipo RAPD.

Metodologia

Foram utilizados 20 genótipos de antúrios pertencentes ao Horto Nuvem Azul localizado no município de Venda Nova do Imigrante, ES, sendo cultivados em vasos em casa de vegetação.

Para a realização da extração do DNA as folhas jovens de cada planta foram coletadas, sendo a extração realizada de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

O tampão de extração de DNA foi preparado, contendo 2% v/v de CTAB, 1,4 mol/L de NaCl, 20 mmol/L de EDTA, 100 mmol/L de Tris-HCl a pH 8,0; 2% m/v de Polivinilpirrolidona sólido e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol. Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N2 líquido, sendo pó resultante transferido para microtubos, aos quais foram adicionados, 700 μ L do tampão de extração. Os tubos foram agitados no vórtex por aproximadamente 20 segundos e incubados em banho-maria a 65° C por aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 14000 rpm em microcentrífuga e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Ao sobrenadante foram adicionados 700 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram invertidos suavemente e novamente centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. Em seguida a fase aquosa foi transferida para novos tubos, sendo adicionado isopropanol gelado (proporção de 1:1) e incubados -20° C por uma noite. Após centrifugação por 10 min a 14000 rpm, o precipitado resultante foi lavado uma vez com etanol 70%, e uma vez com etanol 95% e foi seco à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos. O DNA foi ressuscitado em TE (10 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA a pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 40 μ g/mL e incubado em banho-maria a 37 °C por uma hora e meia.

Na etapa de quantificação do DNA a concentração das amostras foi estimada por meio da comparação destas com bandas produzidas pelo DNA de fago lambda (marcador de concentração) em concentrações de 25, 50, 75 e 100 ng/ μ L. Foram pipetadas 2 μ L de DNA de cada amostra juntamente com o mesmo volume de corante tipo IV em cada canaleta do gel de agarose a 0,8% (m/v). As amostras de DNA dos antúrios foram diluídas para 10 ng/ μ L (μ M) depois de estimadas suas concentrações.

Para a análise de RAPD, as amostras de DNA dos cultivares foram amplificadas pela técnica de PCR com o uso de marcadores de DNA do tipo, de acordo com Alzate-Marin et al. (2001), utilizando primers RAPD da “Operon

Technologies” (Alameda, CA, EUA) tomados ao acaso.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Thechne TC 412) com um volume total de 25 μ L para cada amostra, contendo, Tris/KCl pH 8,3 (10mM/50mM), MgCl₂ (2,8 mM), dNTP (0,6 mM), 0,4 μ M do *primer*, 25 ng de DNA e 1 unidade de Taq-polimerase. O processo de amplificação foi realizado com um programa de 40 ciclos, sendo que em cada ciclo ocorre: desnaturação a 94° C por 2 minutos e 15 segundos, anelamento a 35° C por 30 segundos, alongação a 72 ° C por 1 minuto e ao final dos 40 ciclos uma extensão final a 72° C por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% imersos em tampão SB (Hidróxido de sódio, Ácido bórico e água destilada), a 100 volts durante 4 horas. Foram utilizados 15 primers RAPD (Tabela 1).

Tabela 1. Primers RAPD utilizados nos vinte genótipos de antúrio e suas sequência de nucleotídeos.

PRIMER	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (5'→3')
OPF 06	GGGAATTCGG
OPG 14	GGATGAGACC
OPG 18	GGCTCATGTG
OPH 11	CTTCCGCAGT
OPAI 08	AAGCCCCCA
OPAG 19	AGCCTCGGTT
OPAI 13	ACGCTGCGAC
OPAM 14	TGGTTGCGGA
OPAJ 16	TCTGGACCGA
OPF 04	GGTGATCAGG
OPE 12	TTATCGCCCC
OPAI 05	GTCGTAGCGG
OPAK 04	AGGGTCGGTC
OPAJ 11	GAACGCTGCC
OPAI03	GGGTCCAAAG

A avaliação das Distâncias Genéticas e Análise de Agrupamento foram obtidas por meio do registro de dados moleculares, feito a partir das bandas polimórficas detectadas nos géis entre os cultivares, gerando assim uma matriz de valores binários, onde a codificação (0) significara a ausência e (1) a presença da banda. As estimativas de dissimilaridade genética (*Dij*) foram

realizadas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973).

Os valores de dissimilaridade genética foram organizados em matrizes, para serem empregadas na análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo. As análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

Resultados

As bandas polimórficas foram contabilizadas e organizadas em matriz de acordo com a presença e ausência de bandas (0 e 1). Estimou-se a dissimilaridade entre os 20 genótipos utilizando o complemento do coeficiente de Jaccard. Assim, foram obtidas a matriz de dissimilaridade, que por meio dos cálculos de média entre cada genótipo gerou a tabela de médias de dissimilaridade, e a frequência desta dissimilaridade entre os genótipos. O método de agrupamento utilizado foi o UPGMA, adotando um valor de 75% para a linha de corte do dendograma com objetivo de agrupar indivíduos que apresentassem características morfológicas próximas entre si (Figura 1 e Tabela 3). Os 20 genótipos foram organizados em 10 grupos, como pode ser observado na tabela 2.

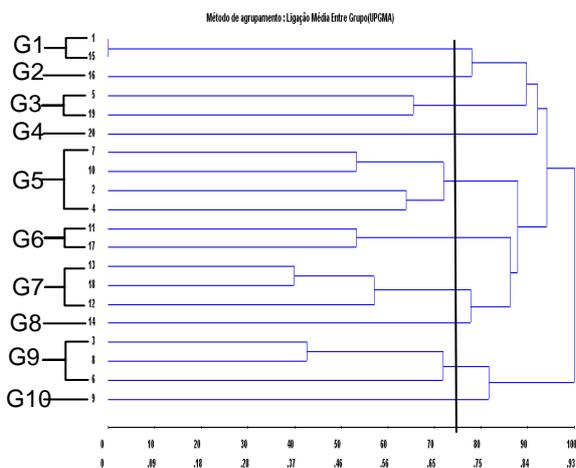


Figura1: Dendograma dos 20 genótipos de antúrio utilizados.

Tabela 2 - Agrupamento dos 20 genótipos de antúrio por meio do dendograma gerado a partir de marcadores RAPD com complemento do coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA.

GRUPO	GENÓTIPOS
G1	1, 15

G2	16
G3	5, 19
G4	20
G5	7, 10, 2, 4
G6	11, 17
G7	13, 18, 12
G8	14
G9	3, 8, 6
G10	9

Discussão

Pela análise da figura 1 percebe-se que o cruzamento entre os genótipos 15 e 1 é inviável, dentro do estudo realizado, devido a alta similaridade entre esses acessos ($d_{1-15} = 0$), assim como o cruzamento entre os genótipos de número 13 e 18, vista a baixa dissimilaridade entre estes ($d_{13-18} = 0.375$). Contudo os demais genótipos apresentam grande dissimilaridade entre si podendo ser considerados promissores em processos de melhoramento genético e possíveis genitores de novas variedades, sobressaltando os genótipos 9 e 14 por apresentarem maior dissimilaridade entre os demais genótipos. O genótipo 12 apresentou baixa dissimilaridade quando comparado aos demais genótipos, sendo um candidato improvável na obtenção de novas variedades a partir de seu cruzamento entre os demais indivíduos analisados, como pode ser verificado pela tabela 3.

Tabela 3. Valores das médias da dissimilaridade entre os acessos.

INDIVÍDUOS	MÉDIA ENTRE OS GENÓTIPOS
01	0.830278
02	0.803241
03	0.800834
04	0.814118
05	0.809116
06	0.884066
07	0.763665
08	0.813932
09	0.910834
10	0.755
11	0.78908
12	0.744945
13	0.784836
14	0.909524

15	0.82625
16	0.817121
17	0.829859
18	0.749207
19	0.806773
20	0.843094
MÉDIA DAS MÉDIAS DE DISSIMILARIDADE DOS GENÓTIPOS	0.814288

Anthurium andraeanum, mas o número de primers utilizados pode não ter sido suficiente para identificação das corretas distâncias entre cada genótipo devido ao baixo grau de especificação da técnica. No entanto existe variabilidade entre os genótipos de antúrio estudados confirmando que a utilização de marcadores do tipo RAPD é uma ferramenta importante para estudos moleculares de espécies cujos genomas não são conhecidos.

Analisando o dendograma (Figura 1) pode-se perceber que os 20 genótipos pesquisados foram agrupados em 10 grupos (Tabela 3), sendo que 4 grupos possuem um genótipo cada. O G1 possui genótipos com dissimilaridade igual a zero indicando que se trata de um mesmo indivíduo ou de indivíduos de carga genética muito semelhante, evidenciando que estes podem ter vindo de um mesmo ou até de genitores com características genóticas bem próximas. O cruzamento entre certos genótipos de antúrio que apresentem baixa dissimilaridade não é interessante para programas de melhoramento da espécie, devido à baixa heterogeneidade dos genótipos e conseqüente baixa probabilidade de ocorrerem novas variantes a partir deste cruzamento.

Os marcadores RAPD podem ser de grande auxílio em estudos de diversidade em *Anthurium*, uma vez que os genomas de espécies deste gênero ainda não são conhecidos, não permitindo, portanto, a utilização de marcadores específicos. Marques et al. (2004) utilizaram primers RAPD para estudos da variabilidade genética de *Heliconia bihai* e *H. rostrata*, obtendo bons resultados na diferenciação entre os grupos. Nowbuth et al. (2005) avaliaram as distâncias genéticas entre 24 cultivares de *Anthurium andraeanum* Hort com RAPD, constatando baixa divergência entre os cultivares. Estas informações possibilitaram aos autores indicar a busca por acessos genéticos que apresentassem maior variabilidade, com o intuito de obter genótipos portadores de características desejáveis. Wang et al. (1999) avaliaram 15 genótipos de *Anthurium*, que foram agrupados em três grupos, dos quais os dois primeiros pertencem a cultivares da espécie *Anthurium andraeanum*, e o terceiro formado pelo genótipo originado do cruzamento entre *Anthurium andraeanum* e *Anthurium amnicola*, sugerindo que marcadores RAPD são úteis na estimativa das semelhanças genéticas entre cultivares destas espécies.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo preliminar nos permitem concluir que a utilização dos 15 primers RAPD forneceu a distribuição dos acessos de

Referências

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G. DE; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p.265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; RAVA, C.; BARROS, E.G. DE; MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, p.125-133, 2001.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Minas Gerais: Ed. Folha de Viçosa, 2009.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. Cadeias produtivas de flores e mel. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.
- CEAGESP, Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/cotacoes>. Acesso em: 01 de maio de 2009
- CRUZ, C.D. **GENES** – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- JARDIM DE FLORES. Antúrio. Disponível em: < <http://www.jardimdeflores.com.br/A14anturio.htm> >. Acesso em: 11 de julho de 2010.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, V. 14, n. 1, p. 37-52, 2008c. Disponível em: < <http://www.hortica.com.br/artigos/HORTORNAME>

NTALMercado.pdf >. Acesso em: 20 de junho 2008.

-MARQUES, J. M.; COELHO, P. J. A.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. DE S.; TORRES, A. C.; AMORIM, J. C. DE; BUSO, G. S. C. Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de populações de *Heliconia bihai* e *Heliconia rostrata*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 69). Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp069.pdf> >. Acesso em: 15 de julho de 2010.

-NOWBUTH, P.; KHITTOO, G.; BAHORUN, T.; VENKATASAMY, S. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using RAPD Markers. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4 (10), pp. 1189-1194, Oct. 2005. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2005/Oct/Nowbuth%20et%20al.pdf> >. Acesso em : 14 de junho de 2010.

-SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 573p. 1973.

-TOMBOLATO, A.F.C. Seleção de variedades de antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.) para flor de corte no Instituto Agrônômico. Disponível em: <http://www.portaldoagrovit.com.br/agro/seminario_internacional_de_cultivo_protegido/mg_anturio.pdf >. Acesso em: 01 de maio de 2009.

- VAN HERK, M. V. et al. **Cultivation Guide Anthurium**: global know-how for growers around the Globe. 1st. ed. Holanda: Anthura B.V., 140p. 1998.

-WANG, JAU-YUEH; CHUANG, KENG-CHANG; FAN; MING-JEN. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Identification and Genetic Diversity Analysis of *Anthurium* Cultivars. **Journal of Agricultural Research of China** V. 48, NO. 4. p 52-63, Dec. 1999. Disponível em: <<http://www.tari.gov.tw/tarie/modules/icontent/index.php?page=166> >. Acesso em: 17 de julho de 2010.