

Caracterização molecular e morfológica de espécies de Helicônias.

Beck, Ana Paula Araujo¹; Vivian Loges²; Guimarães, Walma Nogueira Ramos³; Luciane Vilela Resende⁴.

¹ Aluna de graduação em Agronomia, estagiária do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agronomia (DEPA) UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP Recife, Pernambuco, fone (81) 3320-6247, e-mail: titabeck@bol.com.br; ² Professora Adjunta DEPA/UFRPE, Laboratório de Floricultura, e-mail: vloges@yahoo.com; ³ Bolsista de Pré-Doutorado/FACEPE do Laboratório de Floricultura, e-mail: walmalano@gmail.com; ⁴ Professora Adjunta DEPA/UFRPE, Laboratório de Biotecnologia, e-mail: luciane@ufrpe.br

INTRODUÇÃO

Entre as estratégias utilizadas para caracterização de materiais vegetais está a utilização de marcadores moleculares. De acordo com Milach (2004), as informações disponibilizadas a partir de marcadores moleculares em um programa de melhoramento possibilitam dentre outras aplicações, a identificação e discriminação de genótipos superiores para uma determinada característica e a quantificação da variabilidade genética existente ao nível de DNA.

Muitas espécies de helicônias são identificadas a partir de diferenças morfológicas, como porte, e coloração de suas flores e brácteas. Essas características podem ser influenciadas por isolamento geográfico e características ambientais, como luz e nutrientes (Kumar et al., 1998). Por exemplo, clones de *H. psittacorum* cultivados próximos podem variar quanto ao florescimento, tamanho e cor das brácteas, e durabilidade pós-colheita (Donselman & Broschat, 1986). Nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares, os quais permitem acessar a variabilidade ao nível do DNA, juntamente com avaliações de caracteres morfológicos de interesse agrônomo, surgem como uma alternativa eficiente para caracterização das espécies.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar 22 espécies presentes na Coleção Germoplasma de Helicônias da Universidade Federal Rural de Pernambuco, utilizando marcadores moleculares e morfológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizados 22 genótipos (Tabela 1), provenientes da Coleção de Germoplasma de Helicônias da UFRPE.

Tabela 1. Relação dos genótipos da Coleção Germoplasma de Helicônias da UFRPE. Recife - PE, 2007.

Denominação	Genótipos*
1	<i>H. psittacorum</i> L.f x <i>H. spathorcircinata</i> Aristeguieta 'Golden Torch Adrian'
2	<i>H. psittacorum</i> L.f x <i>H. spathorcircinata</i> Aristeguieta 'Alan Carle'
3	<i>H. psittacorum</i> L.f. 'Strawberries & Cream'
4	<i>H. psittacorum</i> L.f. 'Suriname Sassy'
5	<i>H. psittacorum</i> L.f. 'Red Opal'
6	<i>H. pseudoaemygdiana</i> L. Emygdio & E. Santos
7	<i>H. psittacorum</i> L.f. 'Red Gold'
8	<i>Heliconia</i> x <i>nickeriensis</i> Maas & de Rooij
9	<i>H. latispatha</i> Bentham 'Red-Yellow Gyro'
10	<i>H. orthotricha</i> 'She'
13	<i>H. rostrata</i> Ruiz & Pávon (10 dias de durabilidade pós-colheita)
14	<i>H. rostrata</i> Ruiz & Pávon (3 dias de durabilidade pós-colheita)
15	<i>H. wagneriana</i> Peters
16	<i>H. bihai</i> (L.) L. 'Kamehameha'
18	<i>H. stricta</i> Huber 'Fire Bird'
20	<i>H. episcopalis</i> Vellozo

21	<i>H. collinsiana</i> Griggs
22	<i>H. rostrata</i> Ruiz & Pávon
23	<i>H. caribaea</i> Lamark x <i>H. bihai</i> (L.) L. 'Carib Flame'
24	<i>H. stricta</i> 'Huber'
25	<i>H. psittacorum</i> L.f x <i>H. spathorcircinata</i> 'Golden Torch'
26	<i>H. bihai</i>

*Identificação dos genótipos baseada em Berry & Kress (1991).

O DNA genômico foi extraído de folhas, utilizando o protocolo de Glazebrook (1998) com algumas modificações. Um conjunto de 37 primers foi testado, e 10 selecionados para as análises (Tabela 2). As reações de ISSR foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo a solução-tampão da enzima Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl e 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 25 µM de primer; 20 ng de DNA e 1,5 unidade da enzima Taq DNA polimerase.

As amplificações foram feitas em um termociclador PTC100 MJ Research, seguindo uma etapa de desnaturação de 95 °C por 15 minutos, 30 segundos a 94 °C, 45 segundos, onde a temperatura de anelamento variou para cada primer (Tabela 2), 2 minutos a 72 °C, por 30 ou 35 ciclos seguido de uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados em Syber Gold (Invitrogen) e visualizados em transluminador UV. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados utilizando-se o sistema de Fotodocumentação Vilber Lourmart, comparando-se com o padrão de peso molecular de 100 pares de base (DNA Ladder, Invitrogen™).

Tabela 2. Seqüência dos 10 primers selecionados, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados nas reações de amplificação dos genótipos da Coleção de Germoplasma de Helicônias da UFRPE. Recife - PE, 2007.

Primer	Seqüência*	Temperatura de Anelamento	Número de Ciclos
003	CTC TCT CTC TCT CTC TG	50°C	35
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	55°C	30
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	55°C	35
820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	50°C	35
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50°C	35
845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	50°C	35
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	50°C	30
881	GGG TGG GGT GGG GTG	50°C	35
888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	50°C	30
890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	50°C	35

*Degeneração de acordo com a IUPAC (Macvetor, 2007).

A análise dos dados foi feita de acordo com o sistema binário, usando (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas, sendo que bandas muito fracas e de difícil resolução não foram incluídas. Nas análises, a similaridade genética entre os genótipos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard. Para agrupamento dos dados e construção do dendrograma foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA – Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means), com o auxílio do programa NTSYSp versão 2.1 (Rohlf, 2000).

Foram estudados os seguintes caracteres morfológicos: Hábito de crescimento agrupado, com touceiras menores que 2.25 m²; Pêlos na folhas; Pêlos nas inflorescências; Cerosidade nas folhas; Cerosidade nas inflorescências; Folha verde escura; Perfilhamento interno; Inflorescência ereta; Inflorescência pendente. Tais caracteres foram obtidos aos 520 dias após o plantio. Para análise dos dados morfológicos foi gerada uma matriz binária (1) para presença e (0) para ausência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos trinta e sete primers testados, foram selecionados 10 (Tabela 2), os quais geraram produtos de amplificação consistentes. Foram obtidos um total de 67 bandas, com

tamanhos que variaram de 410 a 2070 pares de base. O número de fragmentos polimórficos consistentes por primer variou de 3 (primer 862) a 10 (primer 834).

Por meio do dendrograma construído a partir da análise dos dados moleculares verificou-se a formação de cinco grupos, e similaridade média de 21% (Figura 1). Os agrupamentos são justificados pelo material biológico utilizado, o qual envolveu espécies distintas, híbridos interespecíficos e cultivares da mesma espécie. O fato deste material não ser ainda totalmente domesticado, ou seja, não participar de programas de melhoramento, que envolvam cruzamentos, justifica a baixa similaridade.

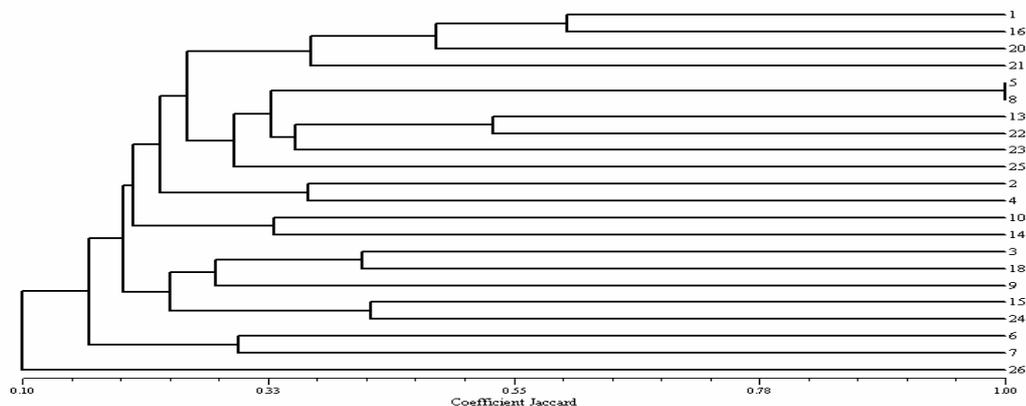


Figura 1. Similaridade entre 22 genótipos de Helicônias da Coleção de Germoplasma da UFRPE, utilizando marcadores de ISSR.

Na Figura 2, encontra-se o agrupamento das espécies estudadas, referente aos caracteres morfológicos. Considerando a similaridade média de 44%, houve a formação de dois grandes grupos. O grupo um está dividido em quatro subgrupos. O primeiro subgrupo formado pelos acessos 1, 2, 7, 26, 16, 10, 15, 23, os quais apresentam semelhantes o hábito de crescimento agrupado. No segundo subgrupo os acessos 3, 5 e 25, são cultivares e híbridos de *H. psittacorum*, os quais, apresentam como principal semelhança o perfilhamento interno e inflorescência ereta. O terceiro subgrupo onde estão presentes os acessos 9, 24, 20 e 18 são semelhantes quanto ao hábito de crescimento agrupado e inflorescência ereta. O acesso 6 presente no quarto subgrupo, apresenta o mesmo hábito de crescimento, diferindo por não apresentar folhas verde escura.

O segundo grupo apresentou dois subgrupos, o primeiro formado pelos acessos 13, 14, 22 que são semelhantes por apresentarem inflorescências pendentes e pêlos nas inflorescências, sendo estes, indivíduos de *H. rostrata*. O segundo subgrupo (acesso 21), constando apenas de um genótipo de *H. collinsiana*, apesar de apresentar o mesmo tipo de inflorescência, diferiu por apresentar cerosidade nas folhas.

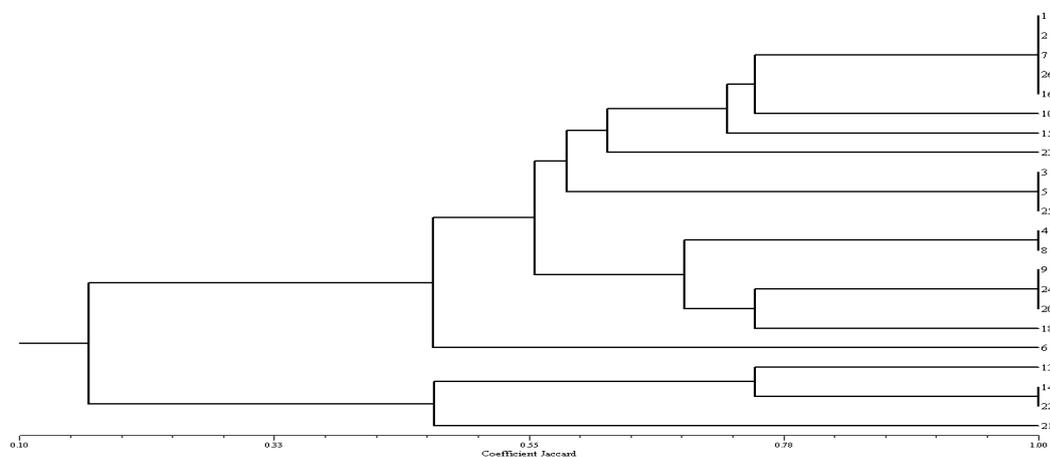


Figura 2. Similaridade entre 22 genótipos de Helicônias da Coleção de Germoplasma da UFRPE, utilizando marcadores morfológicos.

Portanto, pode-se dizer que não houve correlação entre os dados moleculares e morfológicos, a não ser por um acesso, que se repetiu em ambos os dendrogramas, sendo uma cultivar de *H. psittacorum* com *H. x nickeriensis*, segundo Berry & Kress (1991), justificando-se por se tratar de um cruzamento entre *H. psittacorum* x *H. marginata*.

CONCLUSÕES

A partir dos dados moleculares observou-se uma alta variabilidade genética, e a formação de muitos ramos no dendrograma, esses nem sempre constando de espécies afins. Porém, quando se trata dos dados morfológicos, o não agrupamento de híbridos e cultivares da mesma espécie, justificando-se pela natureza dos dados, os quais levam em consideração caracteres de importância agrônômica, gerando agrupamentos independentemente da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERRY, F.; KRESS, W. J. 1991. **Heliconia An Identification Guide**. 334p.

DONSELMAN, H.; BROCHAT, T. K. 1986. Production of *Heliconia psittacorum* for cut flowers in South Florida. **Bulletin Heliconia Society International**, 1(4): 4-6.

GLAZEBROOK, J.; DRENKARD, E.; PREUSS, D.; AUSUBEL, F. M. 1998. Use of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) as genetic markers in *Arabidopsis thaliana*. In: MARTINEZ-ZAPATER, J.; SALINAS, J. (Eds.). **Methods in Molecular Biology: Arabidopsis Protocols**, v. 82. Humana Press, Totowa, NJ, pp 173–182.

KUMAR, P. P.; YAU, J. C. K.; GOH, C. J. 1998. Genetic analyses of *Heliconia* species and cultivars with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Journal of America Society of Horticultural Science**, n. 123, v. 1, p. 91-97.

MACVECTOR, Inc. 2007 [Online]. Testing Ambiguous Primers With Degenerate Target Sequences: <http://www.macvector.com/KnowledgeBase/testingambiguousprimers.html>.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 141 p. 2004.

ROHLF, F. J. 2000. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Port Jefferson Applied Biostatistics, 38p.

PALAVRAS-CHAVE

Heliconia, caracterização, ISSR, marcadores morfológicos.

¹ AGRADECIMENTOS

¹ Os autores agradecem aos produtores da RECIFLORA, FACEPE/PROMATA e ao BANCO DO NORDESTE, pela doação do material vegetal e recursos financeiros para execução do trabalho.