

Uso de técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em *Anthurium* Use of molecular techniques in the *Anthurium* genetic diversity study

ANA CECÍLIA RIBEIRO DE CASTRO^{1,2}, LUCIANE VILELA RESENDE²,
WALMA NOGUEIRA RAMOS GUIMARÃES² e VIVIAN LOGES²

Entre as plantas tropicais, os antúrios destacam-se por sua beleza e exuberância. Pertencem ao gênero *Anthurium* Schott. (Araceae) e todas as suas espécies (mais de 800) são ornamentais. O *A. andraeanum*, é originário da Colômbia e, desde 1876, tem sido intensamente hibridado, a origem de variedades cultivadas começou com a introdução do *A. scherzerianum* da Costa Rica em 1857, *A. andraeanum* e outras espécies da família na Europa. Como consequência, os genótipos atualmente encontrados no comércio são diferentes da espécie nativa.

O *Anthurium andraeanum*, uma das espécies mais cultivadas, é largamente utilizada na floricultura e paisagismo, sendo entre as flores tropicais a segunda mais comercializada no mundo, superada apenas pelas orquídeas. O cultivo de antúrios é realizado em todo mundo e no Brasil vem se intensificando nas últimas décadas. Atualmente, agregam variedades de diferentes procedências, melhoradas no Brasil e Europa, além de materiais oriundos de coleções particulares. Esta é uma atividade promissora que deve ser incrementada através de estudos científicos e programas de melhoramento ainda escassos e restritos a algumas regiões.

Um dos problemas relacionados ao cultivo é o da caracterização do *Anthurium andraeanum*, já que esta espécie congrega diferentes tipos de materiais genéticos, muitos dos quais híbridos interespecíficos, dificultando o uso de descritores morfológicos para tal caracterização. Novas variedades de *Anthurium* têm sido continuamente introduzidas em cultivo e a identifica-

ção destas plantas tem se tornado um problema, visto serem identificadas especialmente através de caracteres morfológicos como cor de flor e descrições de folhas e flores (Kobayashi et al., 1987). Neste caso, cultivares diferentes apresentam descritores morfológicos semelhantes. Apesar da caracterização morfológica ser muito importante, pois fornece dados básicos para introdução e troca de genótipos, além de ter papel fundamental nos programas de melhoramento, muitas vezes deve ser assessorada por outros recursos disponíveis.

Deve-se ressaltar que a obtenção, preservação e catalogação da diversidade genética existente nas variedades de uma cultura é algo de real e notória importância no que diz respeito à proteção de linhagens e cultivares, sendo estes os aspectos de maior relevância como perspectiva futura. O grande número de polimorfismos que podem ser obtidos com a utilização de marcadores de DNA é um grande atrativo, além de que estes não sofrem influência do ambiente. Apesar de serem bastante empregados em diversas culturas, inclusive ornamentais, existem poucos trabalhos com marcadores moleculares em antúrios.

Uma das ferramentas mais modernas utilizadas para auxiliar no estabelecimento do grau de similaridade entre cultivares ou entre e dentro de populações naturais, dar subsídio à proteção legal, bem como associar genes à estresses bióticos e abióticos, avaliar e caracterizar

¹Embrapa Agroindústria Tropical, ² Universidade Federal Rural de Pernambuco.

germoplasma, enfim auxiliar no melhoramento genético como um todo, são os marcadores genéticos ou moleculares.

Na década de 70 surgiu um campo de pesquisa chamado “biologia molecular ou genética molecular”, sendo um dos mais marcantes desenvolvimentos genéticos e que, ainda hoje, continua tendo impacto revolucionário. A partir de então se tornou possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores genéticos. Os marcadores moleculares apresentam varias vantagens sobre os marcadores morfológicos por fornecer um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma e por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa dos genótipos em estádios iniciais do desenvolvimento através de procedimentos relativamente simples e rápidos (Lanza et al., 2000). O avanço das técnicas moleculares tem sido acompanhado de perto pelo grande desenvolvimento nas áreas de bioinformática e da genética quantitativa tem contribuído de forma sinérgica para o atual nível de conhecimentos sobre a estrutura genética de varias espécies cultivadas e silvestres (Lanza et al., 2000).

O uso de marcadores moleculares representa uma ferramenta adicional em programas de melhoramento genético em plantas oferecendo novas possibilidades no manejo de uma coleção permitindo a comparação entre indivíduos, identificando duplicatas bem como uma ferramenta de seleção para novos esforços no desenvolvimento de cultivares ornamentais e na exploração da diversidade nas espécies (Engelborhs et al., 1998), além de possibilitar a classificação do germoplasma em grupos de interesse para os diferentes programas de melhoramento. Permite, também, determinar a presença ou ausência de gene(s) ligados a características específicas para fins de melhoramento, com a vantagem de se fazer as análises

antes do material ir para o campo. Com isso, diminui-se o volume de material que necessitaria de cuidados como adubação, capina, irrigação, etc., havendo redução no número de gerações de melhoramento necessárias no desenvolvimento de variedades.

Atualmente há inúmeros tipos de marcadores moleculares diferenciando-se quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998). São comumente divididos em dois grandes grupos: marcadores protéicos ou isoenzimáticos e os marcadores moleculares ou de DNA. Os marcadores protéicos são assim designados por estarem associados à proteínas de reserva. São marcadores interessantes para estudos genéticos por serem produto primário de genes estruturais (Brammer et al., 2002). Embora em número limitado, vários locos isoenzimáticos podem ser analisados rápida e simultaneamente (Brammer et al., 2002). Kobayashi et al. (1987) utilizaram a técnica de eletroforese de isoenzimas como possível ferramenta para identificação de cultivares de *Anthurium andraeanum*, obtendo resultados positivos, além de investigar procedimentos para extração de enzimas ativas desta planta. Ribeiro (1999) observou que as isoenzimas dos sistemas esterases e peroxidases apresentaram maior polimorfismo, sendo utilizadas na identificação de 12 genótipos de *Anthurium andraeanum*.

Já os marcadores moleculares surgiram da necessidade de acessar o polimorfismo genético diretamente no DNA. É definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Conforme Milach (1998), são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. O fingerprinting do DNA (caracterização molecular de um organismo) tem sido usado em teste de identidade de cul-

tivares, determinação da relação de parentesco e da variação genética, análise de populações e de pedigree, localização de locos para doenças e epidemiologia.

Os principais tipos de marcadores moleculares são RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), que envolve hibridização ou amplificação e aqueles revelados por amplificação como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), Microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) e STS (Sequence Tagged Site). Descreveremos a seguir os de usos mais corriqueiros.

O RFLP (Bostein et al., 1980), detecta variações em seqüências de DNA de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas por enzimas de restrição. Estas enzimas são capazes de clivar o DNA por reconhecimento em sítios específicos, gerando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos entre os indivíduos. Estes fragmentos são hibridizados com seqüências homólogas (sondas) marcadas com radioatividade ou compostos que geram luminescência possibilitando a visualização. Os RFLPs são marcadores co-dominantes e dependendo do tipo de sonda usada, cobre todo o genoma, aumentando significativamente a associação de marcadores à características agrônômicas. Esta é uma técnica cara, estando hoje restrita ao mapeamento comparativo entre diferentes espécies.

Os demais marcadores se baseiam no princípio da PCR, utilizando uma enzima, DNA polimerase, termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento imprimiram grande automatização à síntese *in vitro* de um segmento de DNA. A técnica de PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA, que pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores párea

a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA. As reações ocorrem em ciclos alternados de temperatura, sendo cada ciclo do PCR envolve três etapas. Na primeira, ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA, posteriormente, os *primers* pareiam-se com as seqüências complementares específicas que flanqueiam o sítio-alvo, e então a nova fita de DNA é sintetizada a partir das extremidades 3-OH livres dos primers por meio da enzima *DNA polimerase*. Como cada ciclo é repetido varias vezes, a amplificação do DNA-alvo ocorre em progressão geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de DNA-molde (Lanza et al, 2000).

A técnica de RAPD (Williams et al., 1990) utiliza oligonucleotídeos decâmeros (*primers*) de seqüência arbitrária para a amplificação do DNA, gerando uma grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA espalhados pelo genoma. O nível de polimorfismo obtido varia grandemente em função da espécie em estudo. Esta técnica não requer conhecimento prévio da seqüência do DNA-alvo nem de *primers* espécie-específicos. Cada primer pode amplificar diferentes locos do genoma (Devos e Galé, 1992). Tem sido utilizada em vegetais, no estudo de identificação e caracterização de variedades, no estudo da diversidade genética, no mapeamento de características agrônômicas de interesse (como resistência à doenças). Além de que esta técnica é eficiente em tempo e mão-de-obra, não requer o desenvolvimento de uma biblioteca de sondas e um conjunto de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Porém apresenta como desvantagem à baixa repetibilidade. No entanto, se bem padronizada tem importante aplicação em espécies pouco estudadas molecularmente como é o caso dos antúrios.

Os microssatélites ou SSR (Litt e Luty, 1989), são seqüências de um a quatro pares

de base repetidas em tandem, distribuídas abundantemente no genoma das espécies. São multialélicas e codominantes. Os SSR utilizam primers específicos que amplificam regiões do DNA repetitivo. Dentre os marcadores são os que apresentam o maior conteúdo de informações de polimorfismo, amplificando locos contendo seqüências de um a cinco pares de bases que se repetem em série e em número variável. Este tipo de marcador tem eliminado a necessidade de cruzamentos distantes para maximizar o polimorfismo molecular, ou seja qualquer cruzamento é potencialmente informativo para mapeamento molecular, principalmente porque apresenta elevada variabilidade quanto ao conteúdo de informações polimórficas, sendo possível identificar variações alélicas entre indivíduos e conseqüentemente distingui-los dentro de uma população (Brammer e Milach, 2002), O desenvolvimento de primers de SSR é um processo elaborado e caro, no entanto, uma vez disponíveis o custo assemelha-se ao RAPD.

Uma das técnicas mais recente e mais utilizada atualmente é o AFLP (Vós et al, 1995) que combina as vantagens do RFLP e do RAPD. Estes marcadores estão distribuídos por todo o genoma de eucariotos e procariotos. Baseia-se na amplificação através de PCR de fragmentos gerados por enzimas de restrição específicas e oligonucleotídeos adaptadores de poucas bases. Este método gera um amplo número de bandas de fragmentos de restrição facilitando a detecção de polimorfismos. Possibilita a análise de um grande número de locos em um único gel, fazendo com que apesar de ser um marcador dominante seja possível analisar o maior número de locos em um único gel em relação a outros marcadores. O polimorfismo obtido com AFLP está baseado em diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial dos fragmentos.

Wang-Jau et al. (2001), compararam a similaridade genética entre 30 cultivares de *Anthurium andraeanum*, mediante as técnicas de RAPD e Microssatélites, observaram que os coeficientes de similaridade genética foram de 57% e 52,9% respectivamente e que estes são eficientes em programas de melhoramento desta espécie.

Apesar das diferentes classes de marcadores apresentadas acima, estudos mostram que em ornamentais, os AFLPs e os microssatélites são mais freqüentemente utilizados por sua alta reprodutibilidade e grande quantidade de informação (Escandón, 2004). Em rosa, que como flor de corte é uma das ornamentais mais cultivadas do mundo, mediante a técnica de AFLP estudos vem sendo realizados a fim de se obter o mapa genético desta espécie, com objetivo a longo prazo de obter os genes envolvidos na produção da fragrância e de resistência à mancha negra causada pelo fungo *Diplocarpon rosae* (Arus, 2000; Escandón, 2004).

Outra tecnologia que vem sendo amplamente empregada no melhoramento de plantas ornamentais é a engenharia genética. Neste caso, o interesse é de se incorporar características como resistência à insetos, à doenças fúngicas e virais, tolerância à herbicidas. Características específicas para a floricultura como a modificação de cor e forma das flores, da fragrância, o controle da floração, a eficiência de enraizamento, modificação dos pigmentos das pétalas, são as mais almejadas no mercado nacional e internacional.

Do ponto de vista econômico, os organismos geneticamente modificados (OGMs) ornamentais não geram as mesmas controvérsias que provocam os OGMs ligados ao consumo alimentar humano como os cereais e as oleaginosas (Escandón, 2004).

Fure-Chyi et al. (1996), conseguiram efetuar através da técnica de transformação por

Agrobacterium tumefaciens duas plantas de híbridos de antúrio. O primeiro antúrio transgênico foi obtido por transformação mediante *Agrobacterium tumefaciens*, resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *Dieffenbachiae*. Resistência a bacteriose (*Xanthomonas Campestris* pv. *Dieffenbachiae*) (Chen e Kuehnle, 1996); Chen e Kuehnle e Sugii, 1997)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

- Boltstein, D. White, R.L.; Skolnick, M. Davis, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- Brammer, S.P.; Milach, S.C.K. Marcadores genéticos usados em plantas. In: Brammer, S.P.; Iorczeski, E.J.(eds). **Atualização em técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Embrapa, Passo Fundo, 2002.p.167-182.
- Chen, F.C.; Kuehnle, A. R. (1996). Obtaining transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolated internodes. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 121(1): 47-51.
- Chen, F.C.; Kuehnle, A. R. ; Sugii, N. (1997) *Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, vol. 49, no. 1, p. 71-74
- Devos, K.M.; Galé, M.D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p. 567-572, 1992.
- Engelborghs, I., Swennen, R., Van Campenhout, S. Capacidad del AFLP para detectar diferencias genéticas y variantes somaclonales en *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v.76, n.2, p.3-6, 1998
- Escandón, A. Biotecnología en el cultivo de especies ornamentales. IN: Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2004
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa, Brasília, 1995. 220p.
- Fure-Chyi, C., Kuehnle, A. R. Obtaining transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolated internodes. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 121 (1): 47-51. 1996.
- Kobayashi, R. S. Brewbaker, J. L. E Kamemoto, H. Identification of *Anthurium andraeanum* cultivars by gel electrophoresis. **Journal of American Society of Horticulture Science**. V. 112(1), p. 164-167, 1987.
- Lanza, M. A.; Guimarães, C. T.; Schuster, I. Aplicação de Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético. **Informe Agropecuário EPAMIG**, v. 21, n. 204, p. 97-108. 2000.
- Litt, M.; Luty, J.A. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- Milach, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. UFRGS, Porto Alegre. 1998. 140p.
- Ribeiro, A. C. L. **Caracterização Genético-bioquímica de *Anthurium andraeanum* Linden cultivado em Pernambuco**. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Vós, P. ; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414; 1995.