

MARCELO DE ATAÍDE SILVA FILHO

Aplicação do marcador molecular RAPD para análise de variabilidade genética em
mudas de *Heliconia bihai* oriundas de cultivo de embrião e de propagação
vegetativa

Recife - PE
Fevereiro - 2006

MARCELO DE ATAÍDE SILVA FILHO

Aplicação do marcador molecular RAPD para análise de variabilidade genética em mudas de *Heliconia bihai* oriundas de cultivo de embrião e de propagação vegetativa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Planta.

Orientadora: Dra. Lilia Willadino
Conselheiros: Dra. Luíza Suely Sêmen Martins
Dra. Márcia Vanusa da Silva

Recife - PE
Fevereiro - 2006

Aplicação do marcador molecular RAPD para análise de variabilidade genética em mudas de *Heliconia bihai* oriundas de cultivo de embrião e propagação vegetativa

Marcelo de Ataíde Silva Filho

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/____

Orientadora:

Dra. Lilia Willadino
UFRPE - DB

Examinadores:

Dra. Luíza Suely S. Martins
UFRPE – DB

Dra. Luciane Vilela Resende
UFRPE – DEPA

Dra. Marleide Magalhães Andrade Lima
EMBRAPA – CNPA

Recife - PE
Fevereiro - 2006

Aos meus pais, **Marcelo e Claudete**,
aos meus irmãos **Túlio e Tília** e
à minha esposa **Mirella**,
dedico esse trabalho, fruto do **apoio**.

À minha orientadora **Lilia** e
as minhas co-orientadoras **Luíza e Márcia**,
ofereço esse trabalho, fruto do **aprendizado**.

Agradecimentos

As professoras Dra. Luíza Suely S. Martins, Dra. Luciane Vilela Resende, Dra. Marleide Magalhães de Andrade Lima, membros da pré-banca e/ou banca, pela disponibilidade em contribuir na revisão desse trabalho e pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula.

Aos amigos de Aldeia, da UFRPE e colegas de turma, em especial, Érik, Vaubam e Onildo, nos quais sempre encontrei alegria e descontração para olhar para o cotidiano de forma mais tranqüila e divertida.

Aos colegas do Laboratório de Genoma do IPA, pelas proveitosas conversas, pelos conselhos, pelas experiências trocadas, pela preciosa ajuda na condução dos experimentos. É um prazer trabalhar com vocês.

Aos meus familiares, em Maceió, que, mesmo à distância, sempre se preocuparam com o andamento das minhas atividades, além de também se orgulharem delas.

Às instituições, CAPES e CNPq, que possibilitaram a realização desse trabalho, financiando, de uma forma ou de outra, nossos projetos de pesquisa.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – e mais especificamente ao

Departamento de Agronomia, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Agradecimentos especiais

No trabalho...

A Francinete Carla e Marta Ribeiro, pela ajuda nos trabalhos de RAPD, perdendo alguns fins de semanas para a conclusão deste trabalho.

As minhas co-orientadoras Drs. Luíza Suely Sêmen Martins e Márcia Vanusa da Silva , com quem venho aprendendo que a Genética também requer cuidadosa abordagem estatística e que, além disso, me ensinou a ver com mais tranqüilidade alguns aspectos da “vida de pesquisador”.

São admiráveis o vigor como administram e a competência e alegria com que nos ensina a lidar com a ciência.

e na vida pessoal...

À minha esposa Mirella, pelo companheirismo, pelo apoio incondicional, pela torcida, por me ouvir em horas de tristeza e por me ajudar a buscar as melhores saídas.

Aos meus irmãos Túlio e Tília, que sempre se orgulham de ter um irmão “pós-graduando”.

Imagino que vocês não saibam o quanto isso é importante para mim.

Aos meus pais, Marcelo e Claudete. O mestrado não teria nenhum valor para mim se eu não pudesse ver a satisfação de vocês com essa conquista. Se eu não tivesse recebido os importantes valores morais que vocês me deram, certamente não teria concluído esse trabalho. Obrigado por acreditarem nos meus sonhos.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS CAPÍTULO II

- Tabela 1** – Identificação dos 19 indivíduos de *H. bihai* de diferentes métodos de propagação. **51**
- Tabela 2** - Seqüências dos Oligonucleotídeos de RAPD, número e tamanho dos fragmentos amplificados e polimorfismo produzido. **51**
- Tabela 3** – Matriz de similaridade do marcador RAPD: (PV-4 e PV-5 com 0,93; PV-8 e PV-5 com 0,93); (CE-7 e PV-1 com 0,49) e (CE-3 e PV-9 com 0,82). **52**
- Figura 1** – Análise de agrupamento, do marcador molecular RAPD, dos 19 indivíduos de *H. bihai*, obtida através do programa Treeview, usando o UPGMA. **53**

RESUMO

O mercado internacional da floricultura apresenta-se em constante crescimento. No Brasil o ramo da floricultura cresce a cada ano. Um dos entraves desta expansão é a comercialização de mudas com patógenos. O cultivo de embrião possibilita a produção de propágulos vegetais livres de doenças, com plantios mais uniformes e com maior precocidade. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de mudas de *Heliconia bihai* provenientes de cultivo embriões (CE) comparadas às mudas de propagação vegetativa (PV), utilizando o marcador molecular do tipo RAPD. O DNA foi extraído de 19 diferentes indivíduos, sendo dez provenientes de propagação vegetativa e nove de cultivo de embrião. Estes foram analisados e amplificados com seis oligonucleotídeos de RAPD. Os oligonucleotídeos de RAPD, utilizados demonstraram-se eficientes no estudo da variabilidade em *H. bihai*, pois amplificaram com eficácia e detectaram bastante polimorfismo. O dendrograma mostrou que houve a formação de dois grupos, sendo em um destes a separação de dois subgrupos pelo tipo de propagação. Os agrupamentos mostraram-se bastante próximos quando são considerados os coeficientes de similaridade genética. Os dados gerados por meio de RAPD demonstraram uma alta similaridade dos materiais propagados por cultivo de embrião com os indivíduos propagados vegetativamente (81%), não inviabilizando a propagação por cultivo de embriões *in vitro*. Nossos resultados sugerem, que para estudo de variabilidade genética em *H. bihai*, dados gerados através da técnica RAPD foram bastante satisfatórios. O coeficiente desta variação genética é essencial para o desenvolvimento de estratégias de propagação em escala comercial do material vegetal estudado.

Palavras-chave: Helicônia, polimorfismo, escala comercial, variação genética.

ABSTRACT**Application of molecular marker RAPD for analysis of genetic variability in deriving changes of *Heliconia bihai* of embryo culture and vegetative propagation**

The international market of the floriculture is presented in constant growth. In Brazil the branch of the floriculture grows to each year. One of the impediments of this expansion is the commercialization of dumb with illnesses. The embryo culture makes possible the production of free vegetal parts of illnesses, with plantations more uniform and bigger precocity. The objective of this work was to analyze the genetic variability of changes of *Heliconia bihai* proceeding from culture embryos (CE) compared with the changes of vegetative propagation (PV), using the molecular marker of type RAPD. The DNA was extracted of 19 different individuals, having been ten proceeding ones from vegetative propagation and nine of embryo culture. These had been analyzed and amplified with six oligonucleotídeos of RAPD. The oligonucleotídeos of RAPD, used had demonstrated efficient in the study of the variability in *H. bihai*, therefore they had amplified with effectiveness and they had detected polymorphism sufficiently. The dendrograma showed that it had the formation of two groups, being in the one of this separation of two sub-groups for the type of propagation. The groupings had revealed sufficiently next when the coefficients of genetic similarity are considered. The data generated by means of RAPD had vegetative demonstrated one high similarity of the materials propagated for culture of embryo with the propagated individuals (81%), not making impracticable the propagation for culture of embryos in vitro. Our results suggest that for study of genetic variability in *H. bihai*, data generated through technique RAPD had been sufficiently satisfactory. The coefficient of this genetic variation is essential for the development of strategies of propagation in commercial scale of the studied vegetal material.

Keyword: Helicônia, polymorphism, scale commercial, genetic variation.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS CAPÍTULO II	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Situação da floricultura	14
1.2 Origem	16
1.3 Descrição Botânica	16
1.4 Descrição Morfológica e Propagação	17
1.5. Cultivo de Embrião	19
1.6. Marcadores Moleculares	21
1.6.1. Marcador RAPD	23
2. LITERATURA CITADA	25
CAPÍTULO II – Marcador molecular do tipo RAPD na detecção de variabilidade genética em <i>Helicônia</i> obtidas por meio de cultivo de embrião e propagação vegetativa	34
RESUMO	34
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAIS E MÉTODOS	39
<i>Material Vegetal</i>	39
<i>Extração de DNA</i>	39
<i>Eletroforese e Quantificação do DNA</i>	40
<i>Ensaio de RAPD</i>	40
<i>Análises dos dados de RAPD</i>	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	44
AGRADECIMENTOS	45
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	45

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

1.1 Situação da floricultura

O mercado internacional da floricultura apresenta um crescimento anual em torno de 10%, gerando uma receita de aproximadamente US\$ 94 bilhões (Ribeiro et al., 2002). No Brasil, de acordo com Florabrazilis 2002, o faturamento mensal do varejo foi da ordem de R\$ 13,8 milhões, valor obtido a partir de levantamento realizado em 53 principais cidades de 12 estados, entre abril e outubro de 2002 (Aki & Perosa, 2002). Historicamente, o balanço de importação e exportação brasileiras de flores de corte e plantas ornamentais foi superavitário. Em 2003, o comércio exterior brasileiro de produtos da floricultura teve um desempenho favorável, com um aumento de 30% no valor total exportado em relação ao ano anterior, atingindo o patamar inédito de US\$ 20 milhões em vendas para o exterior. Holanda, Estados Unidos, Itália e Japão continuaram em 2003 sendo os principais países de destino dos produtos da floricultura brasileira (Kiyuna, 2004).

O setor de floricultura no Brasil vem se expandindo e se destacando como uma nova alternativa de geração de emprego e renda no agronegócio nacional. No mercado doméstico, segundo dados do Ibraflor, o setor movimentou, anualmente, algo em torno de US\$ 750 a 800 milhões. O consumo doméstico é de aproximadamente US\$ 4,7 per capita, que se apresenta em declínio. Entre 1994 e 1998, o consumo chegou a US\$ 6,0 per capita, porém longe dos padrões mundiais. Na Suíça e na Noruega, por exemplo, o consumo per capita chega a US\$ 170 e US\$ 143, respectivamente. Na Alemanha, US\$ 137, nos EUA, US\$ 36 e na Argentina, US\$ 25 (Revista SEBRAE, 2005).

O Brasil, por possuir características de clima e solo apropriados que favorecem a produção de flores temperadas e tropicais vem aumentando a sua área cultivada. Das 200 espécies de flores mais cultivadas no Brasil, cerca de 166 são consideradas tropicais (SEBRAE-PE, 2003).

De acordo com o Ministério da Agricultura, há 50 mil pessoas prestando serviços para 2.500 produtores do setor de flores, sendo que a maioria se encontra na categoria de pequenos e médios empresários (FLORES, 2001). Ao se considerar que há cerca de 15 pessoas, em média, por hectare, trabalhando na produção de flores e plantas ornamentais, estima-se que sejam gerados aproximadamente 72.750 empregos no Brasil, no setor de flores (Aki & Perosa, 2002).

Comparando-se o setor de flores com os demais setores, observa-se a sua maior capacidade de gerar empregos diretos e indiretos (respectivamente, 225,93 e 121,38). É importante ressaltar que o setor agropecuário que gera 107,17 de empregos diretos e 31,15 de empregos indiretos por R\$1 milhão produzido (Anefalos et al., 2003)

Novas políticas governamentais vêm estimulando o crescimento da floricultura no Brasil, incrementando e otimizando o desenvolvimento de toda cadeia produtiva de flores no país. Para maximizar a sua produção e reestruturar o setor, foi criado o Programa de Desenvolvimento Sustentado da Floricultura PROFLORES e FLORA BRASILIS, que visam aumentar a exportação de flores, sobretudo as tropicais (Aki & Perosa, 2002). Os principais Estados produtores de flores no Brasil são: São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pernambuco, Ceará e Alagoas.

O Estado de Pernambuco, pelas suas condições edafoclimáticas, tem o privilégio de poder abrigar tanto as flores de clima tropical quanto às de clima temperado. O calor e umidade do litoral e da Zona da Mata viabilizam o cultivo das flores tropicais; O micro-clima frio de altitude existente nas regiões serranas do agreste propiciam o desenvolvimento das flores de clima temperado (Teixeira & Zarzar, 2002).

Pernambuco vem se consolidando como o maior produtor de flores tropicais do país. Apesar das dificuldades, a produção das flores tropicais vem crescendo 20% ao ano (Andrade et al., 2003). Cerca de 90% das flores tropicais produzidas no Estado abastece o mercado nacional e

o restante destina-se aos compradores internacionais principalmente para o mercado europeu com destaque para Portugal, Inglaterra e Holanda. (Andrade et al., 2003).

1.2 Origem

As helicônias são plantas de origem tropical, encontradas nas Américas Central e do Sul desde o nível do mar até 2000m de altitude e nas ilhas do Pacífico Sul até 500m. Entre as plantas tropicais, a helicônia se destaca como resultado de seu cultivo e popularização, como flor de corte e planta para paisagismo. No Brasil, as helicônias estão distribuídas, principalmente, na Mata Atlântica e na região da Amazônia, com aproximadamente 40 espécies (Helicônias, 2005-http://www.sebrae-sc.com.br/noticias/mostrar_materia.asp?cd_noticia=10904(2005).

Em 1985, com a fundação da “Internacional Heliconia Society”, houve um maior interesse no estudo de vários aspectos sobre o gênero (Daniels, 1991). As helicônias por serem bastantes exóticas e despertarem um grande interesse para o comércio de flores de corte e paisagismo, nos tempos de hoje, são encontradas em diversos países do mundo em áreas tropicais como o Hawai e Ilhas Fiji, onde não são nativas (Berry & Kress, 1991). Elas são predominantemente de regiões úmidas, porém há espécies que ocorrem em áreas de secas periódicas. São encontradas a pleno sol ou em áreas sombreadas de florestas primárias (Criley & Broschat, 1992).

1.3 Descrição Botânica

As helicônias pertencem à ordem Zingiberales, anteriormente pertencente à família Musaceae, que recentemente passou a ser denominada Heliconiaceae (Castro, 1995b). A ordem Zingiberales é composta pelas famílias Musaceae (bananeiras), Strelitziaceae (ave-do-paraíso e árvore do viajante), Lowiaceae, Heliconiaceae (helicônias), Zingiberaceae (gengibres), Costaceae (costus); Cannaceae (cana da Índia) e Marantaceae (Castro, 1995b). O gênero *Heliconia* é o único na família Heliconiaceae (Berry & Kress, 1991) e possui entre 120 a 150 espécies. São plantas herbáceas, perenes com brácteas de cores muito variadas e por isso são muito apreciadas

para fins ornamentais (Criley & Broschat, 1992). Existem quatro subgêneros em Heliconiaceae: *Taeniostrobos* Kuntze (Griggs); *Griggsia* Andersson; *Stenochlamys* Baker e *Heliconia* (Andersson 1981; 1985; 1992). Os subgêneros *Stenochlamys* e *Heliconia* apresentam o maior número de espécies distribuídas no Brasil (Kress, 1990b; Andersson 1992).

Existe uma grande variedade de espécies de Helicônia e são identificadas de maneira geral, a partir de diferenças morfológicas, coloração das flores e brácteas e da durabilidade na pós-colheita, porém a diferença entre alguns cultivares nem sempre é muito fácil de visualizar (Kress, 1988).

Nas helicônias existe também uma variação fenotípica entre regiões, como por exemplo: as de determinadas regiões da Venezuela, da bacia Amazônica Central, da Costa Rica e do Panamá, possuem uma tendência ao polimorfismo, enquanto as helicônias de micro-climas como das florestas montanhosas da Venezuela, do sul do México a Honduras e da região nordeste dos Andes tendem a ter populações morfológicamente mais constantes (Criley & Broschat 1992).

1.4 Descrição Morfológica e Propagação

As inflorescências de Helicônia são tirsiformes e cada inflorescência parcial corresponde a um cincino (Dahlgren et al., 1985; Andersson, 1998). Nas espécies neotropicais os cincinos são envoltos por brácteas de coloração viva (Dahlgren et al., 1985; Berry & Kress, 1991; Andersson, 1998). As brácteas também protegem botões florais e frutos em desenvolvimento (Endress, 1994).

As helicônias são plantas perenes, herbáceas, rizomatosas, com caule ereto, aéreo, formado por bainhas de folhas sobrepostas denominado pseudocaulo (Criley & Broschat, 1992). Variam de 0,50 a 10,00 m de altura, e no ápice do pseudocaulo forma-se apenas uma inflorescência terminal, ereta ou pendente, com brácteas bastante coloridas (Berry & Kress, 1991).

Em *Helicônia* as brácteas podem ser cimbitiformes ou lanceolado-conduplicadas, sendo um dos caracteres importantes na separação dos sub-gêneros. Em *Helicônia*, Andersson (1985; 1992), utilizando a anatomia como ferramenta para a diferenciação dos subgêneros, mostrou que espécies com brácteas cimbitiformes geralmente apresentam canais de ar grandes e numerosos feixes de fibras próximos à superfície abaxial. Já as espécies com brácteas lanceoladas apresentam canais de ar pequenos e número reduzido de feixes de fibras próximos à superfície abaxial.

Quanto à disposição das folhas, as *helicônias* são classificadas como: musóides (maioria das espécies), folhas verticais em relação ao pseudocaulo; zingiberóide, folhas dispostas horizontalmente de pecíolos curtos; e canóide, pecíolo curto ou de médio comprimento, com posição oblíqua à haste (Berry & Kress, 1991)

As flores são hermafroditas com coloração que varia de amarelo a branco. As flores abrem seqüencialmente a cada um ou dois dias, antes da abscisão da última flor aberta, ou senescência, como observado na maioria das espécies (Broschat & Donselman, 1983). Cada flor permanece aberta somente por um dia, porém existem muitas flores por brácteas e muitas brácteas por inflorescência, o que prolonga a fase de florescimento (Berry & Kress, 1991).

Estudos feitos por Berry e Kress, (1991) mostraram que os principais polinizadores das *helicônias* nos Trópicos Americanos são os beija-flores e os morcegos. A vasta gama de cores das brácteas atraem os beija-flores a longas distâncias (Doorn, 1999). As flores, que estão alojadas nas brácteas, possuem dois picos de produção de néctar sendo o primeiro logo no início da manhã e o outro após o meio-dia (Abalo, 1999).

As *helicônias* podem ser propagadas por sementes ou rizomas. A propagação por sementes é pouco utilizada devido o tempo que a planta leva para florescer e porque, às vezes, são difíceis de germinar (Berry & Kress, 1991). Os pássaros, roedores e esquilos são

responsáveis pela dispersão das sementes quando os frutos ficam maduros (Abalo, 1999; Montgomery, 1986).

A propagação por rizoma, que é a forma mais utilizada pelos produtores de helicônias, favorece a disseminação de fitopatógenos entre as áreas de cultivo por gerações sucessivas. As helicônias ramificam bastante e emitem novas plantas, formando touceiras, que, de acordo com a espécie, são bastante densas (Chapman, 1995), sendo divididas para a obtenção de novas mudas. Uma mesma espécie pode apresentar grande variação quanto ao porte, dependendo da variedade, cultivar ou forma de condução (Berry & Kress, 1991).

O cultivo de embrião vem sendo utilizado na horticultura ornamental como um sistema rápido de multiplicação, possibilitando a produção de propágulos vegetais livres de doenças, com plantios mais uniformes e com maior precocidade (Sato et al. 1999).

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares de helicônia é freqüentemente prejudicado por contaminações endofíticas, conforme registrado por diversos autores (Nathan et al., 1992, Atehortua, et al, 1997, Dias & Rodrigues 2001). Portanto, torna-se necessária a avaliação de tipos de explantes, menos freqüentemente utilizados para micropropagação, para o estabelecimento dessa cultura *in vitro*.

1.5. Cultivo de Embrião

Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos oferecem aos melhoristas de plantas um método para aumentar a variabilidade genética e para transferir genes desejáveis entre espécies, principalmente das silvestres para as cultivadas. Em tais cruzamentos podem ocorrer barreiras tanto pré como pós-fertilização, resultando em sementes inviáveis e embriões abortivos. O uso de hibridação entre espécies diferentes é freqüentemente limitado por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com degeneração dos embriões antes que atinjam a maturidade. Embriões híbridos podem ser salvos se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em um meio nutritivo. Melhoristas de frutíferas têm tido sucesso no resgate de

embriões e posterior obtenção de plantas a partir de frutos sem sementes de videira (Emershad et al., 1989; Gribaudo et al., 1993).

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado sob condições assépticas em meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável e produzindo descendentes idênticos. Para a remoção do embrião, basta-se desinfestar apenas a superfície externa da semente, visto de que o embrião encontra-se alojado em região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo em relação aos demais explantes (Illg, 1986).

O meio de cultura adequado, tanto para propagação quanto para a cultivo de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Em estudos envolvendo meio de cultura para embriões, é utilizada amplamente a solução de Knop (Andreoli, 1986). Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962).

Em helicônias, para favorecer o desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro* até a formação de planta e, posteriormente, a multiplicação das mudas a partir de gemas laterais, se faz necessária a adequação da concentração dos sais do meio nutritivo, de fontes de carboidratos e de reguladores de crescimento que possibilitem a micropropagação a partir desse explante (Nathan et al., 1992).

Uma das desvantagens da utilização do cultivo de embrião *in vitro* é a segregação genética, sendo necessária a avaliação genética das plantas provenientes desse tipo de propagação (Hu & Ferreira 1998), para que essa técnica possa, ou não, ser aplicada no processo de propagação comercial em larga escala.

1.6. Marcadores Moleculares

Muitas características vegetativas são influenciadas por fatores ambientais, apresentam variação contínua, requerem muito tempo para serem completadas, deixam várias dúvidas

quando se trata de genótipos com características muito similares e não podem ser realizadas em qualquer período do ano ou ciclo da planta (Bianchi et al. 2003; Lima et al., 2001).

Devido ao desenvolvimento nos campos da biologia molecular e genética, uma grande variedade de técnicas para analisar polimorfismos genéticos tem sido disponibilizada. Os marcadores moleculares é um dos métodos mais eficazes para o estudo da diversidade genética (Laborda, 2003). Segundo Sakiyama (1993), utiliza-se o termo “marcador” para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênes. Marcadores moleculares são regiões do genoma passíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo, porém, a seqüência e a função dos nucleotídeos, na maioria das vezes são desconhecidas (Gostimsky et al., 1999).

Têm sido, portanto, utilizados em análises genéticas com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (Buso et al., 2003). Esses marcadores podem diferir com respeito a características importantes como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Os primeiros marcadores "modernos" foram as isoenzimas, seguidas cronologicamente pelo RFLP (Botsteins et al., 1980; Grodzicker et al., 1974; Solomon & Bodmer, 1979), pelo RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA- (Williams et al., 1990), por SSR (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May 1989), pelo AFLP (Vos et al., 1995), entre outros. Todos esses tipos de marcadores possuem grande potencial para estudos genéticos básicos e/ou aplicados, respeitando-se as limitações de cada um. Dentre esses estudos podem ser citados evolução, variabilidade genética, caracterização de germoplasma (proteção de cultivares, pureza genética,

monitoramento de fecundação cruzada, entre outros), seleção assistida por marcadores e mapeamento genético (Milach, 1998).

Com marcadores disponíveis adequados e distribuídos por todo o genoma, é possível avaliar todas as regiões cromossômicas quanto aos seus efeitos na manifestação de caracteres quantitativos (Stuber et al., 1987).

RLFPs, RAPDs, AFLPs, e SSRs revolucionaram a análise da variabilidade genética vegetal pois revelaram métodos mais confiáveis e mais práticos na obtenção de informações sobre diversidade genotípica. Apesar de serem vários os métodos de estudo da diversidade, nenhum deles mostra-se tão eficaz como os marcadores moleculares. Dados obtidos por meio de técnicas moleculares superam a maioria das limitações existentes nas demais formas de análise. Características como número de marcadores praticamente ilimitado, ausência da influência de fatores ambientais, grande quantidade de locos polimórficos, acesso indistinto à contribuição de ambos genitores e, principalmente, o fato de permitirem comparações entre genótipos, considerando-se o DNA propriamente dito, tornam esse tipo de marcador diferenciado no que diz respeito à estimativa de diversidade genética (Laborda, 2003).

“Um bom marcador” deve ser polimórfico entre os parentais e apresentar segregação mendeliana para essa população. Outros aspectos também são importantes tais como custo por unidade de genotipagem, neutralidade fenotípica e abundância dos marcadores moleculares no genoma (Tanksley, 1993). O sucesso de qualquer tecnologia de marcador é dependente da disponibilidade de um grande número de marcadores altamente polimórficos, de uma estreita relação de ligação entre o loco marcador e o caráter de interesse (Dudley, 1993) e da facilidade com que os marcadores podem ser utilizados (Senior et al., 1996).

O surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) na década de 80, desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de

biologia molecular, facilitando muito o trabalho do laboratório. Técnicas que fazem uso da PCR, têm acelerado o desenvolvimento de novos sistemas para obtenção de marcadores de DNA (Salla et al., 2002). São exemplos os AFLPs, RAPs, SSRs, que abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA.

Dentre os diversos tipos de marcadores atualmente disponíveis, os marcadores RAPD destacam-se pelas vantagens que apresentam em termos de simplicidade, por serem aplicáveis a um grande número de espécies, e por permitirem a análise de um grande número de locos. Os RAPDs consistem em um dos marcadores moleculares mais usados em estudos genéticos (Oliveira et al., 2001).

Segundo Lynch & Milligan (1994), o uso deste tipo de marcador possibilita, ainda, uma amostragem aleatória mais ampla do genoma do que aquelas proporcionadas por outras classes de marcadores. No entanto, o uso de marcadores dominantes tem sido muito limitado pela falta de informação genotípica do marcador, não sendo possível identificar o genótipo heterozigoto (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

1.6.1. Marcador RAPD

Entre os marcadores de DNA, o que primeiro se destacou foi à técnica do RAPD por possibilitar análise genômica, sem a necessidade do prévio conhecimento das seqüências do organismo sob estudo (Laborda, 2003). Marcadores RAPD são tecnicamente mais simples que outros tipos de marcadores, como SSR, RFLP, entre outros, facilitando o estudo de um grande número de locos, e fornecendo uma amostragem aleatória maior (Williams et al., 1990).

Os RAPDs são um dos marcadores moleculares mais usados em estudos genéticos (Oliveira et al., 2001). Essa técnica tem se mostrado eficiente na identificação da variabilidade genética em diversos grupos de plantas, pode ser usada como uma ferramenta auxiliar em programas de melhoramento, aplicada na obtenção de mapas genéticos e consiste em uma

poderosa ferramenta para a identificação de cultivares (Calixto, 2003; Obara-Okeyo & Kako, 1998).

Inúmeras são as vantagens dos marcadores RAPD, como exemplo: a técnica não utiliza radioatividade, não está sujeito a efeitos pleiotrópicos, epistáticos ou ambientais e pode ser utilizada em qualquer tipo de tecido ou estágio de desenvolvimento da planta (Nowbuth et al., 2005), não requer conhecimento prévio da seqüência alvo a ser amplificada, necessita de pequenas quantidades de DNA, além de ser aplicável a qualquer espécie. Aliados a estas vantagens estão o baixo custo, facilidade e rapidez no emprego da técnica. Embora haja poucos estudos comparando diretamente os diferentes tipos de marcadores, a maioria das comparações sugere que os marcadores RAPD e Isoenzimas revelam padrão similar de diversidade genética, mas os RAPDs tendem a fornecer marcas relativamente específicas de populações, raças ou espécies (Peakall et al., 1998).

O RAPD ainda é amplamente utilizado em diversas áreas do conhecimento. Na agricultura, tem sido usado no estudo da diversidade genética de plantas (Howell et al., 1994; Bhat & Jarret, 1995); mapeamento genético (Fauré et al., 1993; Williams et al., 1993), na identificação de variedades ornamentais, descrição de genótipos de cultivar e na proteção de cultivares (Williams et al., 1990; Camlin, 2001; Debener, 2001b).

Williams et al. (1990) consideram os polimorfismos do DNA amplificados, via iniciadores aleatórios, também chamados de “primers”, como excelentes marcadores genéticos. Essa técnica tem sido largamente empregada na geração de polimorfismo em algumas culturas, como, em rosas (Matsumoto & Fukui, 1996), *Cymbidium* (Obara-Okeyo & Kako, 1998), citrus (Schäfer et al., 2004), antúrio (Ranamukhaarachchi et al., 2001; Buldewo & Fakim, 2002; Nowbuth et al., 2005), ameixa (Bianchi et al., 2003) e maracujá (Viana et al., 2003).

Entretanto RAPD também tem limitações significantes quando comparados com marcadores codominantes. A dominância limita as inferências feitas com RAPDs, especialmente

em estudos de organismos diplóides, e podem fornecer algum viés em algumas características genéticas quando comparados a marcadores multialélicos e codominantes (Lynch & Milligan, 1994).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar geneticamente mudas de *H. bihai*, provenientes de embrião zigótico, com mudas propagadas vegetativamente, avaliando através de marcadores moleculares do tipo RAPD.

2. LITERATURA CITADA

ABALO, J.E. Heliconias for the ornamental industry. **Acta Horticulturae**, v.486, p.313-315, 1999.

African Journal of Biotechnology, v.4 n.10, p.1189-1194, 2005.

AKI, A.; PEROSA, J. M. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.8, n.1/2, p.13-23, 2002.

AKKAYA, M. S.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, v. 35, n. 5, p. 1439-1445, 1995.

AMARAL, A. T. J. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores rapd. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.3, p.489-493, 2003.

ANDERSSON, L. Heliconiaceae. p.226-230. In: K. Kubitzki (ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants. IV. Flowering Plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)**. Springer, Berlin, 1998.

ANDERSSON, L. Revision of *Heliconia* sect. *Heliconia* (Musaceae). **Nordic Journal of Botany**, v.1, n.6, p.759-784, 1981.

ANDERSSON, L. Revision of Heliconia subgen. Stenochlamys (Musaceae - Heliconioideae).

Opera Botanica, v.82, p.1-124, 1985.

ANDERSSON, L. Revision of Heliconia subgen. Taenistrobus and subgen. Heliconia (Musaceae - Heliconioideae). **Opera Botanica**, v.111, p.1-98, 1992.

ANDRADE, I. SEBRAE e FAEPE divulgam flores pernambucanas. **Jornal do comércio**, 2003.

ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, p.25-28, 1986.

ANEFALOS, L. C.; GUILHOTO J. J. M. **ESTRUTURA DO MERCADO BRASILEIRO DE FLORES E PLANTAS ORNAMENTAIS**. Agric. São Paulo, SP, v.50, n.2, p.41-63, 2003.

ATEHORTUA, L. Heliconias: A new challenge for the Colombian floricultural industry. **Biotechnology and Development Monitor**, v.31, p.2021, 1997.

BERRY, F.; KRESS, W.J. Heliconia: An identification guide. Smithsonian Institution Press. Washington and London, p. 334, 1991.

BHAT, K. V. ; JARRET, R. L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian Musa germplasm. **Genetic Resouces and Evolution**, Netherlands, v.42, n.2, p. 107-118. 1995.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W. RAPDs na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasuleira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.272-274, 2003.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.

BROSCHAT, T.K.; DONSELMAN, H.M. **Production and postharvest culture of Heliconia psittacorum flowers in south Florida**. FL. Lauderdale, USA, p.272-273, 1983.

BUELDEWO, S.; JAUFEEERALLY-FAKIM Y. F. Isolation of clean and PCR-Amplifiable DNA from *Anthurium andreanum*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.71a-71, 2002.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, 2003.

CALIXTO, M. C. **Hibridação somática entre *Citrus sinensis* e *C. grandis***. 2003. 99p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAMLIN M. S. Possible future roles for molecular techniques in the identification and registration of new plant cultivars. In: Doré C, Dosda F, Baril C (eds) *Molecular Markers For Characterising & Identifying Cultivars In Horticult*. Proc. Int. Symp. held at Montpellier, France. **Acta Horticulturae**. 546, ISHS 2001.

CASTRO, C.E.F. de. Inter-relação das famílias das Zingiberales. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.1, n.1, p.2-11, 1995b.

CHAPMAN, T.S. **Ornamental Gingers: a guide to the selection and cultivation**. Material impresso pelo próprio autor, p. 50, 1995.

CRILEY, R.A.; BROSCHAT, T.K. **Heliconia: botany and horticulturae of new floral crop**. Horticulturae Review, v.14, p.1-55, 1992.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocotyledons**. Springer-Verlag, Berlin, 1985.

DANIELS, G. S. Preface. In: BERRY, F.; KRESS, W.J. **Heliconia: an identification guide**. Smithsonian Institution Press, Washington and London, p. 335, 1991.

DEBENER T. Molecular markers as a tool for analyses of genetic relatedness and selection in ornamentals. **In:** Vainstein A (ed.) *Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London. 2001b.

DIAS, M.A.S.; RODRIGUES, P.H.V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de *Heliconia bihai* (HELICONIACEAE). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.7, p.165-168, 2001.

DOORN, W.G. VAN.; Water relations of cut flowers. II. Some species of tropical provenance. **Acta Horticulturae** (ISHS), v.482, p. 65-69, 1999.

DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Sciences**, v.33, p.660-668, 1993.

EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermocarpic genotypes of *Vitis vinifera*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.76, n.4, p.397-402, Apr. 1989.

ENDRESS, P.K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, 1994.

FAURÉ, S.; NOYER, J. L.; HERRY, J. P.; BAKRY, F.; LANAUD, C.; GONZÁLEZ, L. de. A. Molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). **Theoretical Applied Genetics**, v.87, p. 517-526, 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3^{ed}. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

FLORES E PLANTAS. *Agronegócios*, n. 35, 2001. (Disponível em: <www.bb.com.br/por/noticias/publicacoes/rce/pubRCEfichaartigo.asp>).

GOSTIMSKY, A. S.; KOKAEVA, Z. G.; BOBROVA, V. K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. **Research Journal of Genetics**, Moscow, v. 11, n. 35, p. 1538-1549, 1999.

GRIBAUDO, I.; ZANETTI, R.; BOTTA, R.; VALLANIA, R.; EYNARD, I. In óvulo embryo culture of stenospermocarpic grapes. **Vitis**, Siebeldingen, v.32, n.1, p.9-14, Jan. 1993.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v.39, p. 439-446, 1974.

HELICÔNIAS: charme tropical. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/>>. Acesso em: 10 de junho de 2005.

HOWELL, E.C.; NEWBURY, H. J.; SWENNEN, R. L.; WITHERS, L. A.; FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying. *Musa* germplas. **Genome**. v.37, n.2, p. 328-332, 1994.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, p.371-394, 1998.

ILLG, R.D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, p.45-47, 1986.

KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J. **Floricultura: Comportamento do comércio exterior brasileiro no primeiro trimestre de 2004**. Instituto de Economia Agrícola. Abril, 2004. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1352&PHPSESSID=> Acesso em 30 set. 2004.

KRESS, W.J. The diversity and distribution of *Heliconia* (Heliconiaceae) in Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, v.4, n.1, p.159-167, 1990b.

KRESS, W.J. The use of isoenzyme markers for the identification of *Heliconia* relatives. **Bulletin Heliconia Society International**, FL. Lauderdale, USA, v.3, n.4, p.11, 1988.

LABORDA, P. R. **Diversidade Genética entre Linhagens de Milho Tropical: Estudo com Base em Marcadores Moleculares**. 2003. 103p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LIMA, M. L. A.; GARCIA, A. A. F.; OLIVEIRA, M. K. M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA-JÚNIOR, C. L.; SOUZA, A. P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.) **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, 2001.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, n.3, p.91-99, 1994.

MATSUMOTO, M.; FUKUI, H. Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. **Scientia Horticulturae**, v.67, p.49–54, 1996.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, p.187, 1998.

MONTGOMERY, S.R. Propagation of *Heliconia* from seeds. *Bulletin Heliconia Society International*, FL. Lauderdale, USA, v.1, n.2, p. 6-7, 1986.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.55, p. 335-350, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.

NATHAN, M. J.; GOH, C. J.; KUMAR, P. P. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**, v.27, n.5, p.450-452, 1992.

NOWBUTH, P.; KHITTOO, G.; BAHORUN, T.; VENKATASAMY, S. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using RAPD Markers.

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

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. MARCADORES RAPD PARA MAPEAMENTO GENÉTICO E SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS. **Revista Brasuleira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.477-481, 2001.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A: **Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants.** Mol Biol Evol, v.15, p.1275-1287, 1998.

RANAMUKHAARACHCHI, D. G.; HENNY, R. J.; GUY, C. L.; LI, Q. B. DNA fingerprinting to identify nine *Anthurium* pot plant cultivars and examine their genetic relationship. **HortScience**, v.36 n.4, p.758-760, 2001.

Revista SEBRAE de Agronegócios [http://www.sebrae-sc.com.br/noticias/mostrar_materia.asp?cd_noticia=10904\(2005\)](http://www.sebrae-sc.com.br/noticias/mostrar_materia.asp?cd_noticia=10904(2005)).

RIBEIRO, T.R.; LOPES, G.G.O.; VIANA, F.D. **Produção de mudas e flores de plantas ornamentais tropicais.** EMBRAPA – CPATSA, Petrolina, PE. Circular Técnica, p.41, 2002.

SAKIYAMA, N.S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.11, n.2, p.204-206, 1993.

SALLA M. F. S.; RUAS C. F.; RUAS P. M.; PÍPOLO V. C. Uso de Marcadores Moleculares na análise a variabilidade genética em Acerola (*Malpighia Emarginata* D.C.). **Revista Brasuleira de Fruticultura**, vol.24, no.1, p.15-22, 2002

SATO, A.S. **Micropropagação e protocolo para transformação de Mandioca (*Manihot esculenta crantz*) via *Agrobacterium rhizogenes***. 1999. 90p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos cítricos. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1437-1442, 2004.

SEBRAE-PE. **Projeto Setorial Integrado de Promoção das Exportações de Flores e Folhagens de Corte de Pernambuco – PSI**. Recife, 2003.

SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, v.36, p.1676-1683, 1996.

SOLOMON, M.; BODMER, W. F. Evolution of sickle variant genes. **Lancet**, v.1, p.8122-8123, 1979.

STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker facilitates investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its components traits. **Crop Science**, v.27, p.639-648, 1987.

TANKSLEY, S. D. 1993. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v.17, n.16, p.6463- 6471, 1989.

TEIXEIRA, M. C.; ZARZAR, L. O mercado de ornamentais em Pernambuco. In: AKI, A. (Org). **Bússola da comercialização para produtores de ornamentais**. São Paulo: Heliza editora, 2002.

use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v.43, p.512-520, 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN, L. T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. **AFLP : a new tool for DNA finger-printing** **Nucleic Acids Res** v.23, p.4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J. G. K.; REITER, R. S.; YOUNG, R. M.; SCOLNIK, P.A. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. **Nucleic. Acids Research**, v.21, n.11, p. 2697-2702, 1993.

WILLIAMS, J. G.K.; KULBELIK, A.R.;LIVK, K.J.; REAFALSKI J.A.; TINGEY, S.V. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful asgenetic markers. **Nucleic. Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

CAPÍTULO II – Marcador molecular do tipo RAPD na detecção de variabilidade genética em *Helicônia* provenientes de cultivo de embrião e de propagação vegetativa

1 **Marcador molecular do tipo RAPD na detecção de variabilidade genética em *Heliconia***
2 **provenientes de cultivo de embrião e de propagação vegetativa¹**

3

4 **Marcelo de Ataíde Silva Filho²; Lilia Willadino²; Luíza Suely Semen Martins²;**
5 **Terezinha R. Câmara²; Francinete Carla Nunes Calvalcanti³; Marleide Magalhães de A.**
6 **Lima³; Márcia Vanusa da Silva³.**

7 ¹Parte da dissertação, do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
8 Melhoramento Genético de Plantas – UFRPE.

9 ²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Av. D. Manoel de Medeiros, s/n,
10 52171-900 Recife-PE, mataidef@yahoo.com.br, lilia@truenet.com.br, luiza@ufrpe.br ;

11 ³Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Av. Gal. San Martim, 1371, 50761-000,
12 Recife-PE, fr.cnc@ig.com.br, marleide@ipa.br, marciavanuza@yahoo.com.br.

13

14 **RESUMO**

15 O objetivo do trabalho foi analisar a variabilidade genética de mudas de *Heliconia bihai*
16 proveniente de cultivo de embriões *in vitro* (CE) comparados às mudas de propagação
17 vegetativa (PV), utilizando o marcador de polimorfismo de DNA amplificados ao acaso
18 (RAPD) para detectar a esta variabilidade genética. Os fragmentos de DNA gerados por
19 RAPD foram avaliados pela presença (1) ou ausência (0) de banda e gerada uma matriz
20 binária. Análises de agrupamentos foram realizadas para expressar, em forma de
21 dendrograma, a variabilidade genética entre e dentro desses dois tipos de propagação. A
22 técnica do tipo RAPD foi capaz de detectar polimorfismo em ambos os métodos de
23 propagação. Nossos resultados sugerem que, para estudo de variabilidade genética em *H.*
24 *bihai*, a utilização do marcador do tipo RAPD foi satisfatório. De acordo com os resultados do
25 RAPD, há bastante similaridade genética entre os dois tipos de propagação, abrindo portas
26 para outros tipos de propagação (cultivo de embrião) mais rápidos e seguros. O coeficiente de
27 variação genética é essencial para o desenvolvimento de estratégias de propagação em escala
28 comercial do material vegetal estudado.

29 **Palavras-chave:** *Heliconia bihai*, polimorfismo, variação genética.

30 **ABSTRACT**

31 **Molecular marker of type RAPD in the detection of genetic variability in *Heliconia***
32 **proceeding from culture of embryo and vegetative propagation**

33

34 The objective of the work was to analyze the genetic variability of changes of *Heliconia bihai*
35 proceeding from embryos culture *in vitro* (CE) compared with the changes of vegetative
36 propagation (PV), using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect this
37 genetic variability. The fragments of DNA generated for RAPD had been evaluated by the
38 presence (1) or absence (0) of band and generated a binary matrix. Analyses of groupings had
39 been carried through to express, in dendrograma form, the genetic variability inside enters and
40 of these two types of propagation. The technique of type RAPD was capable to detect
41 polymorphism in both the propagation methods. Our results suggest that, for study of genetic
42 variability in *H. bihai*, the use of the marker of type RAPD was satisfactory. In accordance
43 with the results of the RAPD, have sufficiently genetic similarity enter the two types of
44 propagation, opening doors for other types of propagation (embryo culture) faster e safe. The
45 coefficient of genetic variation is essential for the development of strategies of propagation in
46 commercial scale of the studied vegetal material.

47

48 **Keyword:** *Heliconia bihai*, polymorphism, genetic variation.

49

50

51

52

53

INTRODUÇÃO

54

55 A floricultura vem crescendo muito nos últimos anos, tanto em extensão como no
56 volume de comercialização. O volume do mercado internacional gira em torno dos US\$ 94
57 bilhões, tendo uma possibilidade de demanda do dobro deste valor (Ribeiro et al., 2002).

58 O setor de floricultura no Brasil vem se expandindo e se destacando como uma nova
59 alternativa de geração de emprego e renda no agronegócio nacional. No mercado doméstico,
60 segundo dados do Ibraflor, o setor movimentou, anualmente, algo em torno de US\$ 750 a 800
61 milhões (Revista SEBRAE, 2005).

62 No Nordeste, o Estado de Pernambuco tem se destacado como um dos maiores
63 produtores de helicônias (*Heliconia* spp.), além de ter sido o pioneiro em cultivos comerciais.
64 A região da Zona da Mata, particularmente, apresentou um aumento de mais de 1.000% na
65 área plantada nos últimos anos (Aki & Perosa, 2002; Junqueira & Peetz, 2002). As
66 exportações da floricultura tropical atualmente se concentram em flores frescas de corte.
67 Pernambuco se encontra na quarta colocação em termos de exportação de flores frescas, e tem
68 cerca de 1% de participação no mercado global brasileiro. O principal destino dessas
69 mercadorias continua sendo os países da Europa, como Portugal, Itália, Alemanha, Holanda,
70 entre outros (Aki & Perosa, 2002).

71 As helicônias são propagadas vegetativamente pelos produtores, o que favorece a
72 disseminação de fitopatógenos entre as áreas de cultivo por gerações sucessivas. O cultivo *in*
73 *vitro* vem sendo utilizado na horticultura ornamental como um sistema rápido de
74 multiplicação, produção de propágulos vegetais livres de doenças, possibilitando plantios
75 mais uniformes e com maior precocidade (Sato et al. 1999). Entretanto, em helicônias, os
76 explantes provenientes de cultura *in vitro* de ápices caulinares são freqüentemente
77 prejudicados por contaminações endofíticas, conforme registrado por diversos autores
78 (Nathan et al., 1992; Atehortua, 1997; Dias & Rodrigues, 2001). Portanto, torna-se necessária

79 a utilização de outros tipos de explantes para o estabelecimento dessa cultura *in vitro*, dentre
80 os quais destacam-se os embriões.

81 Segundo Hu & Ferreira (1998), entretanto um dos entraves para a utilização do
82 embrião zigótico como explante inicial para a micropropagação é a variabilidade existente,
83 sendo necessária a avaliação genética das plantas provenientes desse tipo de propagação.
84 Apesar de serem vários os métodos de estudo da diversidade genética, nenhum deles mostra-
85 se tão eficaz como os marcadores moleculares. Marcadores baseados em variações de
86 seqüências de DNA foi uma grande revolução nas metodologias moleculares e novas técnicas
87 começaram a ser aplicadas com objetivos de retratar com maior precisão a diversidade entre
88 genótipos vegetais (Laborda, 2003).

89 A técnica de RAPD se destacou inicialmente por possibilitar a análise genômica, sem
90 a necessidade do prévio conhecimento das seqüências do organismo em estudo (Jarret &
91 Gawel, 1995). Os oligonucleotídeos modificados por um simples nucleotídeo produzem
92 diferentes perfis de bandas, de forma que a técnica RAPD pode gerar polimorfismo entre
93 genótipos muito próximos. E, devido a usar pouco material e poder ser visualizado em gel de
94 agarose, torna possível selecionar rapidamente elevadas quantidades de materiais (Deng et al.,
95 1995).

96 Assim, os marcadores de RAPD foram extensivamente utilizados para distinguir a
97 variação genética intraspecífica em plantas ornamentais e na detecção de clones (Collins et
98 al., 2003; Arus, 2000; Debener, 2001). A técnica de RAPD tem sido largamente empregada na
99 detecção de polimorfismo em algumas culturas (Obara-Okeyo & Kako, 1998), tais como,
100 rosas (Matsumoto & Fukui, 1996), *Cymbidium* (Obara-Okeyo & Kako, 1998), citrus (Oliveira
101 et al., 2001), antúrio (Ranamukhaarachchi et o al., 2001; Buldewo & Jaufeerally-Fakim, 2002;
102 Nowbuth et al., 2005), ameixa (Bianchi et al., 2003) e maracujá (Viana et al., 2003).

103 O objetivo do trabalho foi estudar a variabilidade genética de mudas de *Heliconia*
104 *bihai*, provenientes do cultivo de embriões (CE) e de propagação vegetativa (PV) utilizando
105 os marcadores moleculares do tipo RAPD.

106

107

MATERIAIS E MÉTODOS

108 *Material Vegetal*

109 Foram coletadas 19 amostras, de diferentes touceiras de *H. bihai*. Destas, dez oriundas
110 de propagação vegetativa (PV) e nove oriundas de cultivo de embrião (CE) (Tabela 1).

111 *Extração de DNA*

112 O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1990) com
113 modificações. Folhas frescas (1g) foram homogeneizadas, em cadinho com o auxílio de
114 pistilo, em nitrogênio líquido. Após a obtenção de um pó fino, este foi transferido para tubos
115 de microcentrífuga (2,0 mL) contendo 700 µL de tampão de extração [1%
116 polyvinylpyrrolidone (PVP), 2% CTAB (p/v), 1,4M NaCl, 2% (v/v) de 2-mercaptoetanol,
117 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl- pH 8,0]. Após 30 min de incubação a 65°C, adicionou-se
118 volume igual de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), homogenizou-se suavemente as
119 amostras e, em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 5 min a 14000 rpm, para
120 separação das fases. A fase superior foi transferida para um novo tubo (1,5 mL), no qual
121 adicionou-se 2/3 do volume da amostra de isopropanol gelado, permanecendo por 30 min em
122 gelo. Em seguida, centrifugou-se novamente por 5 min a 7000 rpm. Descartou-se o
123 sobrenadante, e o precipitado foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol a 70% (v/v) e
124 uma vez com etanol a 100% (v/v) gelado e posto para secar a temperatura ambiente (TA). O
125 DNA foi ressuspensão em 30 µL de água ultrapura estéril e acrescido de RNase (20 µg/mL),
126 incubado a 37°C por 30 min e estocado a -20°C.

127

128 ***Eletroforese e Quantificação do DNA***

129 O DNA foi analisado em eletroforese de gel de agarose a 0,8% (p/v), em tampão TBE
130 (Tris borato 0,09M, EDTA 0,002M), a 100V durante 1 hora. Após a eletroforese, o gel foi
131 corado com *Syber Gold (1X Molecular Probes)*, visualizado em ultravioleta (UV) e
132 fotografado em um fotodocumentador digital Vilber Lourmat. A concentração do DNA foi
133 estimada por comparação com marcador de massa molecular conhecida (*Low DNA* massa
134 *Ladder* – INVITROGEN) e cada amostra foi diluída para 15 ng/mL em água ultrapura estéril.

135

136 ***Ensaio de RAPD***

137 As reações de amplificação do DNA foram realizadas em termociclador MJ Research,
138 Inc., PT 100 Programmable Thermal Controller (Watetown, USA). Cada reação de 25 µL, foi
139 constituída de: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 100 µM de
140 cada um dos desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs), 0,4 mM de um único
141 oligonucleotídeo iniciador, 1U da enzima *Taq*-DNA polimerase e 15 ng de DNA. Foram
142 utilizados 44 oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias (Operon Technologies), sintetizados
143 pela Invitrogen. Utilizou-se o programa de amplificação de: 5 min a 94°C, seguido de 35
144 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 37°C e 1min a 72°C, seguidos de 5 min a 72°C (extensão
145 final dos fragmentos). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese
146 em géis de agarose a 1,2% (p/v) em tampão TBE (Tris borato 0,09M EDTA 0,002M), a
147 100V, por um período de aproximadamente 1,5h. O marcador de 1kb plus DNA Ladder
148 (INVITROGEN) foi utilizado como padrão para estimar o peso molecular dos fragmentos
149 amplificados. Após a eletroforese, os géis foram corados com *Syber Gold (1X Molecular*
150 *Probes)* e fotografados sob luz UV em um fotodocumentador digital Vilber Lourmat.

151

152 ***Análises dos dados***

153 Os dados obtidos pelos oligonucleotídeos de RAPD foram tabulados conforme a
154 presença (1) ou ausência (0) de bandas. As similaridades genéticas entre genótipos foram
155 estimadas usando-se o coeficiente de Jaccard, no programa Freetree (Versão 0.9.1.50).
156 Análise de *bootstrap* foi realizada com 100 reamostragens, utilizando o programa Freetree
157 (Versão 0.9.1.50). Os dendrogramas foram construídos no programa Treeview (Page, 1996),
158 usando-se a opção UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average).

159

160

RESULTADOS E DISCUSSÃO

161 Para a análise de RAPD foram testados 44 oligonucleotídeos, dos quais seis foram
162 selecionados para as reações de PCR, por gerarem mais polimorfismo e apresentarem melhor
163 perfil de amplificação (Tabela 2). Bastianel et al. (1998), utilizando 4 oligonucleotídeos de
164 RAPD, obtiveram polimorfismo suficiente para diferenciar sementes de tangerina
165 provenientes de embrião zigótico e nuclear. Zucchi (2002) realizou um estudo de diversidade
166 em *Eugenia disenterica*, testando 80 oligonucleotídeos, e utilizando para análise um total de
167 oito, sendo todos bastantes polimórficos, obtendo bons resultados. Cavallari (2004) testou 90
168 oligonucleotídeos, dos quais somente cinco foram utilizados para as reações de PCR em
169 estudo de diversidade em *Encholirium* sp.

170 Segundo Cruz & Milach (1998) e Ferreira & Grattapaglia (1998), a reprodutibilidade
171 está fortemente associada à qualidade do DNA e à padronização das condições de reação. Keil
172 & Griffin (1994) também obtiveram padrões de amplificação RAPDs bastante consistentes,
173 ao trabalharem com *Eucalyptus*, verificando pequena ou nenhuma variação durante as
174 repetições

175 Foram amplificadas, através do marcador RAPD, 59 regiões de bandas das quais 43
176 apresentam-se polimórficas (72,9%), obtendo-se, em média, 9,83 loci por oligonucleotídeo. O

177 número de bandas amplificadas normalmente é função da espécie, do oligonucleotídeo e das
178 condições da amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O oligonucleotídeo o OPAH-05
179 produziu maior número de bandas com 15 regiões, sendo dez polimórficas e cinco
180 monomórficas. O oligonucleotídeo OPAZ-14 gerou apenas uma região de banda
181 monomórfica, o OPG-03 e o OPB-10 geraram três regiões de banda monomórfica cada. O
182 oligonucleotídeo OPG-09 foi o único que gerou todas as regiões de banda polimórficas.

183 Provavelmente não há presença de clones entre os materiais analisados. Obara-Okeyo
184 & Kako (1998), estudando a variabilidade de cultivares de *Cymbidium* também observou uma
185 alta variabilidade por meio de marcador molecular RAPD não encontrando, tampouco, clones
186 entre os materiais estudados.

187 A análise de agrupamento para a técnica RAPD está ilustrada na Figura 1. Observou-
188 se através do dendrograma pelo método UPGMA, a formação de agrupamentos separando-se
189 por tipo de propagação, e a confiabilidade dos dados e consistência das bifurcações
190 (*bootstrapping*), foram constatados pelos altos valores do *bootstrap* (Figura 1). A técnica
191 RAPD apresentou altos valores de *bootstrap* (acima de 50%) para a maioria dos grupos
192 formados. De posse destes valores de *bootstrap* pode-se demonstrar que os marcadores de
193 RAPD foram capazes de separar (a partir de 60% de similaridade) os indivíduos propagados
194 vegetativamente dos oriundos de cultivo de embrião. Houve uma primeira formação de dois
195 grandes grupos, onde o primeiro agrupamento está formado por CE-1 e CE-7, e o outro
196 formado pelos demais. O segundo agrupamento formado por outros dois subgrupos, dentre
197 dos quais observa-se a separação dos tipos de propagação em um dos subgrupos formados.
198 Um agrupamento foi formado por todos os indivíduos oriundos de propagação vegetativa
199 (PV-4, PV-5, PV-8, PV-9, PV-2, PV-3, PV-1, PV-10, PV-6 e PV-7) e o outro formado por
200 cinco provenientes de cultivo de embrião (CE-10, CE-6, CE-3, CE-4 e CE-9).

201 O coeficiente de similaridade de Jaccard demonstrou que a maior similaridade está
202 entre os indivíduos PV-4 e o PV-5 com 0,93 (93%) e o PV-8 e PV-5 com 0,93 (93%), em
203 propagação vegetativa, e CE-3 e CE-4 com 0,90 (90%) em indivíduos oriundos de cultivo de
204 embrião. Os indivíduos mais distantes foram o CE-7 e o PV-1 com 0,49 (49%) de
205 similaridade (Tabela 3).

206 Entre os dois tipos de propagação utilizados, os indivíduos mais próximos foram o
207 CE-3 e o PV-9 com 0,82 (82%) de similaridade. Houve maior distância entre indivíduos do
208 mesmo tipo de propagação como é o caso dos indivíduos PV-1 e PV-7 que se mostraram
209 bastante distantes, com um coeficiente de similaridade de 0,60 (60%). Os materiais mais
210 distantes dentro do cultivo de embrião foram o CE-8 e CE-9 com 0,53 (53%) de similaridade.
211 Nenhuma das bandas produzidas mostrou-se exclusiva para nenhum dos dois tipos de
212 propagação ou de algum agrupamento.

213 Marques et al. (2004) constataram variabilidade utilizando o marcador molecular
214 RAPD, ao estudarem indivíduos de populações de *Heliconia bihai* e *H. rostrata* propagados
215 por cultivo de embriões extraídos de sementes apresentando uma variação de 0,47 a 0,98 na
216 população de *H. rostrata* e de 0,67 a 1,00 na população de *H. bihai*.

217 Segundo Silva (2005), trabalhando com *Heliconia bihai*, as plantas provenientes da
218 cultivo de embrião apresentaram maior desenvolvimento dos parâmetros fisiológicos
219 avaliados em comparação com as plantas provenientes de rizoma, como também, apresentou
220 precocidade na floração. Apesar das plantas provenientes do cultivo de embrião não
221 apresentou alterações morfológicas nas plantas e nem nas inflorescências obtidas.

222 No presente trabalho foi observado, pelo uso do marcador RAPD, que os materiais
223 propagados vegetativamente, apresentaram variabilidade. Algumas plantas de propagação
224 vegetativa apresentam diversidade (Ellstrand & Roose, 1987; Hamrick e Godt, 1990;
225 Widen et al., 1994). A fonte dessa variação genética pode ser resultantes de mudas

226 provenientes de cruzamentos, mutação ou origem múltiplas dos rizomas inicialmente
227 introduzidos na região de cultivo (Korpelainen et al., 1999).
228 Conforme Cook (1983), em espécies clonais, dois níveis de organização podem ser
229 reconhecidos: genetos (*genets*) e rametos (*ramets*). Um geneto compreende todos os
230 indivíduos geneticamente idênticos, membros de um clone, originados de um único zigoto. Já
231 um rameto consiste numa parte potencialmente independente de um geneto, apresentando
232 variações genéticas.

233 A propagação do material vegetal em estudo neste trabalho, foi através de rizomas e
234 de embriões retirado de sementes, aumentando assim a variabilidade genética. Segundo Berry
235 e Kress (1991), a polinização nas helicônias é feita, na grande maioria das vezes, por
236 morcegos e beija-flores, portanto as mudas de sementes são provenientes de cruzamento
237 aberto o qual favorece a variabilidade genética. A origem dos plantios de *H. bihai*, na Zona da
238 Mata de Pernambuco, é desconhecida pois, as mudas não foram introduzidas de maneira
239 uniforme, sendo procedentes de diversos locais do Brasil e do mundo.

240 Segundo os dados gerados através dos RAPDs, os indivíduos provenientes de cultivo
241 de embrião analisados possuem bastante similaridade com os indivíduos propagados
242 vegetativamente (82%), sendo assim, não inviabiliza a utilização do cultivo *in vitro* de
243 embrião como forma de micropropagação da espécie.

244

245

CONCLUSÕES

246 A técnica de RAPD foi bastante útil para detectar variabilidade tanto nos indivíduos de
247 propagação vegetativa como nos provenientes de cultura de embrião;

248 De acordo com os resultados do RAPD, há bastante similaridade genética entre os dois tipos
249 de propagação, abrindo portas para outros tipos de propagação (cultivo de embrião) mais
250 rápidos e seguros;

251 A técnica de RAPD indicou variabilidade entre os indivíduos propagados
252 vegetativamente;

253 O dendrograma gerado pelo RAPD foi bastante satisfatório, na formação dos agrupamentos,
254 portanto, o RAPD ainda é uma técnica bastante confiável.

255

256

AGRADECIMENTOS

257 Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro, a UFRPE por
258 ceder as instalações da casa de vegetação para o desenvolvimento das mudas, e a todos do
259 Laboratório GENOMA do IPA, onde foram realizadas as atividades.

260

261

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

262 AKI, A.; PEROSA, J. M. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no
263 Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.8, n.1/2, p.13-23,
264 2002.

265 ARÚS, P. Molecular markers for ornamental breeding. **Acta Horticulturae**, v.508, p.91-98,
266 2000.

267 ATEHORTUA, L. Heliconias: A new challenge for the Colombian floricultural industry.
268 **Biotechnology and Development Monitor**, v.31, p.2021, 1997.

269 BASTIANEL, M.; SCHWARTZ, S. F.; COLETTA FILHO, H. D.; LIN, L. L.; MACHADO,
270 M. A.; KOLLER, O. C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.)
271 using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.123-127, 1998.

- 272 BERRY, F.; KRESS, W.J. **Heliconia**: An identification guide. Smithsonian Institution Press.
273 Washington and London, p. 334, 1991.
- 274 BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W. RAPDs na caracterização
275 genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de
276 ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.272-274, 2003.
- 277 BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D.
278 Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis*
279 and *E. urophylla*. **Theoretical and applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.
- 280 BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D.
281 Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis*
282 and *E. urophylla*. **Theoretical applied genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.
- 283 BUELDEWO, S.; JAUFEEERALLY-FAKIM Y. F. Isolation of clean and PCR-Amplifiable
284 DNA from *Anthurium andreanum*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.71a-71, 2002.
- 285 CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium***
286 **(BROMELIACEAE) e implicações para sua conservação**. 106p. 2004. Tese (Doutorado) –
287 Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 288 COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and
289 characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree
290 species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p.748-756, 1999.
- 291 COLLINS, D.; MILLS, R. R.; MÖLLER, M. Species separation of *Taxus baccata*, *T.*
292 *Canadensis*, and *T. cuspidate* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from
293 RAPD and cpDNA data. **Am. J. Bot.** v.90 n.2, p.175-182, 2003.
- 294 COOK, R. E. Clonal plant populations. **American Scientist**, v.71, p. 244-253, 1983.

- 295 CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; JARRET, R.L.; CREGAN, P.B.; ORTIZ, R. Segregation at
296 microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. **Crop Science**, v.38, p.211-217,
297 1998.
- 298 CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.), **Marcadores**
299 **moleculares em plantas**. Porto Alegre, p.107-116, 1998.
- 300 DEBENER, T. Molecular tools for modern ornamental plant breeding and selection. **Acta**
301 **Horticulturae**, v.552, p.121-127, 2001.
- 302 DENG, Z. N.; GENTILE, A.; NICOLOSI, E.; DOMINA, F.; VARDI, A.; TRIBULATO, E.
303 Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutans by RAPD markers. **Journal of**
304 **Horticultural Science**, v.70, n.1, p. 117-125, 1995.
- 305 DIAS, M.A.S.; RODRIGUES, P.H.V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em
306 cultivo *in vitro* de *Heliconia bihai* (HELICONIACEAE). **Revista Brasileira de Horticultura**
307 **Ornamental**, v.7, p.165-168, 2001.
- 308 DOYLE, I. J.; DOYLE, J. L.. Isolation of plant from fresh tissue. **Foccus**, v.12, p. 13-15,
309 1990.
- 310 ELLSTRAND, N. C.; ROOSE, M. L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species.
311 **Am J Bot**, v.74, p.123–131. 1987
- 312 FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores**
313 **moleculares em análises genéticas**. 3^{ed}. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.
- 314 GAIOTTO, F. A. **Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em**
315 **populações naturais de *Euterpes edulis* Mart. Utilizando marcadores microsatélites**.
316 2001. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 317 HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. p.43–63, 1990. **in**
318 **AH Brown, MT Clegg, AL Kahler, BS Weir, eds. Plant population genetics, breeding, and**
319 **genetic resources**. Sinauer, Sunderland, Mass.

- 320 HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.;
- 321 BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:
- 322 EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, p.371-394, 1998.
- 323 JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. S. Os pólos de produção de flores e plantas ornamentais do
- 324 Brasil: uma análise do potencial exportado. **Revista Brasileira de Horticultura**
- 325 **Ornamental**, v.8, n.1/2, p.25-47, 2002.
- 326 KEIL, M.; GRIFFIN, A.R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in
- 327 the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied**
- 328 **Genetics**, Berlin, v.89, p.442-450, 1994
- 329 KORPELAINEN, H.; ANTONIUS-KLEMOLA, K.; WERLEMARK, G. Clonal Structure of
- 330 *Rubus chamaemorus* populations: Comparison of different molecular methods. **Plant**
- 331 **Ecology**, v. 143, p. 123-128, 1999.
- 332 LABORDA, P. R. **Diversidade Genética entre Linhagens de Milho Tropical: Estudo com**
- 333 **Base em Marcadores Moleculares**. 2003. 103p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual
- 334 de Campinas, Campinas.
- 335 MARQUES, J. M.; COELHO, P. J. A.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; TORRES,
- 336 A. C.; AMORIM, J. C.; BUSO, G. S. C. Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de
- 337 populações de *Heliconia bihai* e *Heliconia rostrata*. **Boletim de pesquisa e**
- 338 **desenvolvimento – EMBRAPA**, n. 69, 2004.
- 339 MATSUMOTO, M.; FUKUI, H. Identification of rose cultivars and clonal plants by random
- 340 amplified polymorphic DNA. **Scientia Horticulturae**, v.67, p.49–54, 1996.
- 341 MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, p.187, 1998.
- 342 NATHAN, M. J.; GOH, C. J.; KUMAR, P. P. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum*
- 343 by bud culture. **HortScience**, v.27, n.5, p.450-452, 1992.

- 344 NOWBUTH, P.; KHITTOO, G.; BAHORUN, T.; VENKATASAMY, S. Assessing genetic
345 diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using RAPD Markers.
- 346 OBARA-OKEYO, P.; KAKO, S. Genetic diversity and identification of *cymbidium* cultivars
347 as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, v.99,
348 p.95–101, 1998.
- 349 OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. MARCADORES RAPD PARA
350 MAPEAMENTO GENÉTICO E SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS. **Revista**
351 **Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.477-481, 2001.
- 352 PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal
353 computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v.12, n.357-358, 1996.
- 354 RANAMUKHAARACHCHI, D. G.; HENNY, R. J.; GUY, C. L.; LI, Q. B. DNA
355 fingerprinting to identify nine *Anthurium* pot plant cultivars and examine their genetic
356 relationship. **HortScience**, v.36 n.4, p.758-760, 2001.
- 357 Revista SEBRAE de Agronegócios <http://www.sebrae->
358 [sc.com.br/noticias/mostrar_materia.asp?cd_noticia=10904\(2005\)](http://www.sebrae-sc.com.br/noticias/mostrar_materia.asp?cd_noticia=10904(2005)).
- 359 RIBEIRO, T.R.; LOPES, G.G.O.; VIANA, F.D. **Produção de mudas e flores de plantas**
360 **ornamentais tropicais**. EMBRAPA – CPATSA, Petrolina, PE. Circular Técnica, p.41, 2002.
- 361 SATO, A.S. **Micropropagação e protocolo para transformação de Mandioca (*Manihot***
362 ***esculenta crantz*) via *Agrobacterium rhizogenes***. 1999. 90p. Tese (Doutorado),
363 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 364 SILVA, C. U. **Cultivo *in vitro* de espécies de helicônia (*Heliconia spp.*) mediante**
365 **embriogenese somática e embriões zigóticos**. 2005. 86p. Tese (Doutorado), Universidade
366 Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- 367 WIDEN, B.; CRONBERG, N.; WIDEN, M. Genotypic diversity, molecular markers and
368 spatial distribution of genets in clonal plants: a literature survey. **Folia Geobot Phytotaxon**,
369 v.29, p.245–263, 1994.
- 370 ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando**
371 **marcadores RAPD e SSR**. 2002, 148p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo,
372 Piracicaba.

Tabela 1 – Identificação dos 19 indivíduos de *H. bihai* de diferentes métodos de propagação

Material	Sigla do acesso	Tipo de propagação	Identificação da espécie	Origem
1	PV1	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
2	PV2	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
3	PV3	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
4	PV4	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
5	PV5	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
6	PV6	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
7	PV7	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
8	PV8	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
9	PV9	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
10	PV10	Vegetativa (PV)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
11	CE1	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
12	CE2	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
13	CE3	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
14	CE4	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
15	CE6	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
16	CE7	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
17	CE8	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
18	CE9	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE
19	CE10	Cultivo de Embrião (CE)	<i>Heliconia bihai</i>	Zona da mata de PE

Tabela 2 - Sequências dos Oligonucleotídeos de RAPD, número e tamanho dos fragmentos amplificados e polimorfismo produzido

Oligonucleotídeos	Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Nº de fragm.	Nº de fragm. monomór.	Polimorfismo (%)
OPAH5	TTGCAGGCAG	2800-500	15	5	66,7%
OPAZ14	CACGGGTTCC	2200-900	7	1	87,5%
OPB 10	CTGCTGGGAC	2000-1000	5	3	40,0%
OPG03	GAGCCCTCCA	2100-850	8	4	50,0%
OPG09	CTGACGTCAC	2800-550	13	0	100,0%
OPG10	AGGGCCGTCT	2000-550	11	3	72,7%
TOTAL			59	16	72,9%

Tabela 3 – Matriz de similaridade do marcador RAPD: (PV-4 e PV-5 com 0,93; PV-8 e PV-5 com 0,93) (CE-3 e CE-4 com 0,90); (CE-7 e PV-1 com 0,49); (PV-7 e PV-1 com 0,60); (CE-9 e CE-8 com 0,53) e (CE-3 e PV-9 com 0,82)

	CE8	PV3	PV1	PV2	CE1	CE2	PV7	CE7	PV6	PV10	PV9	CE3	CE4	CE6	PV8	CE9	CE10	PV4	PV5
CE8	1,00																		
PV3	0,79	1,00																	
PV1	0,57	0,74	1,00																
PV2	0,71	0,89	0,85	1,00															
CE1	0,59	0,55	0,55	0,53	1,00														
CE2	0,78	0,66	0,51	0,63	0,68	1,00													
PV7	0,71	0,74	0,60	0,73	0,55	0,66	1,00												
CE7	0,55	0,55	0,49	0,53	0,64	0,58	0,58	1,00											
PV6	0,57	0,64	0,60	0,64	0,62	0,57	0,64	0,62	1,00										
PV10	0,63	0,69	0,69	0,73	0,65	0,62	0,69	0,65	0,86	1,00									
PV9	0,60	0,72	0,75	0,81	0,64	0,65	0,75	0,64	0,73	0,84	1,00								
CE3	0,62	0,65	0,62	0,68	0,67	0,70	0,62	0,67	0,59	0,67	0,82	1,00							
CE4	0,60	0,62	0,62	0,69	0,64	0,68	0,62	0,67	0,63	0,68	0,80	0,90	1,00						
CE6	0,58	0,67	0,71	0,74	0,66	0,60	0,64	0,63	0,61	0,67	0,79	0,82	0,83	1,00					
PV8	0,63	0,73	0,77	0,80	0,55	0,51	0,69	0,65	0,74	0,79	0,84	0,70	0,68	0,73	1,00				
CE9	0,53	0,64	0,67	0,70	0,63	0,58	0,61	0,66	0,58	0,64	0,78	0,81	0,86	0,82	0,70	1,00			
CE10	0,57	0,65	0,65	0,72	0,64	0,62	0,62	0,61	0,63	0,65	0,80	0,86	0,84	0,87	0,75	0,82	1,00		
PV4	0,64	0,73	0,70	0,76	0,59	0,57	0,73	0,65	0,71	0,76	0,88	0,77	0,72	0,74	0,91	0,74	0,78	1,00	
PV5	0,68	0,78	0,74	0,81	0,56	0,55	0,67	0,63	0,72	0,77	0,82	0,72	0,66	0,68	0,93	0,68	0,73	0,93	1,00

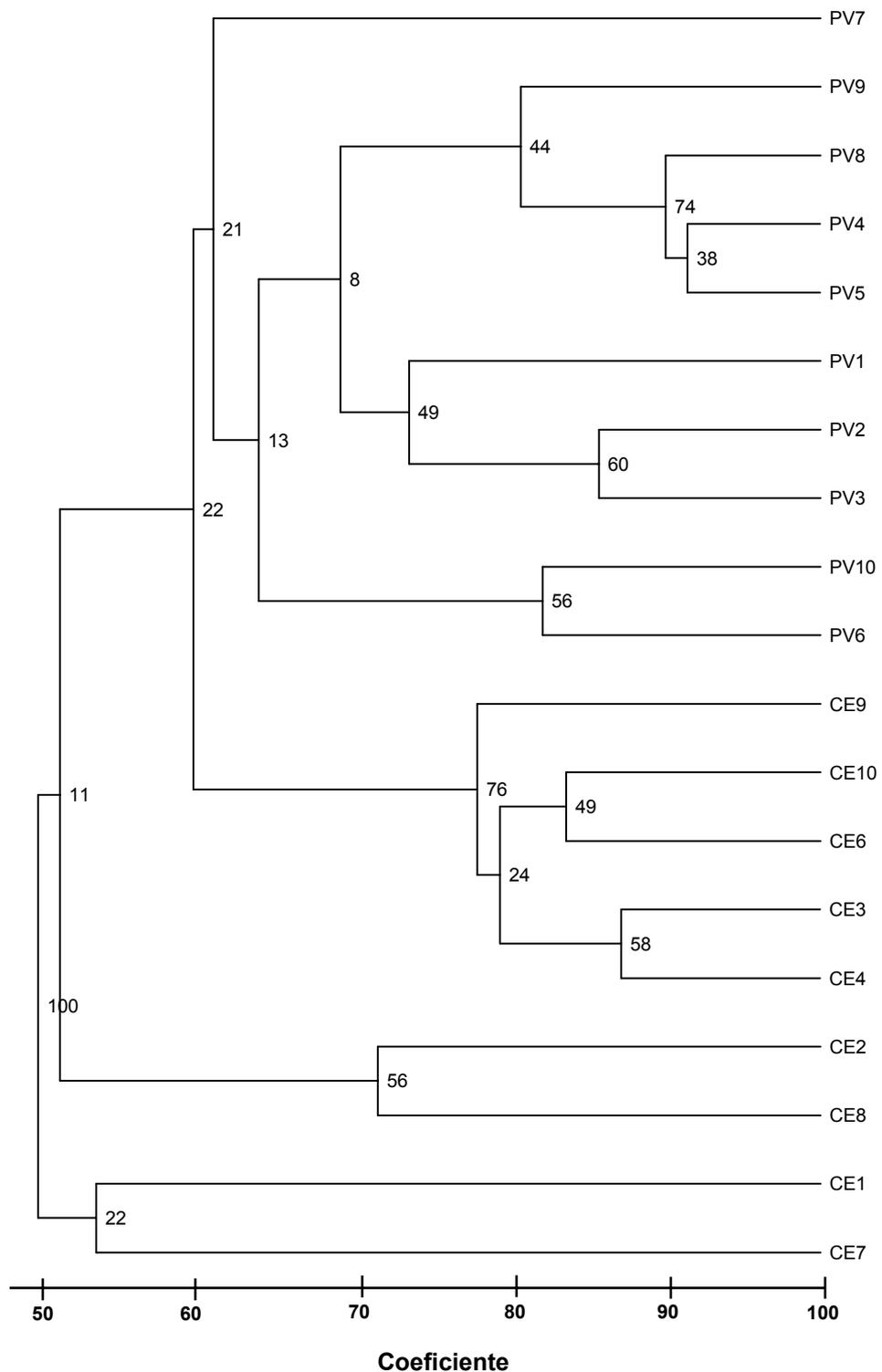


Figura 1 – Análise de agrupamento, do marcador molecular RAPD, dos 19 indivíduos de *H. bihai*, obtida através do programa Treeview, usando o UPGMA.