

Fortaleza, CE / Maio, 2024

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL12 CONSUMO E
PRODUÇÃO
RESPONSÁVEIS

Identificação e seleção de marcadores moleculares para caracterização genotípica de cultivares de antúrio

Eveline Nogueira Lima⁽¹⁾, Priscila Bezerra dos Santos Melo⁽²⁾, Patricia do Nascimento Bordallo⁽³⁾, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho⁽⁴⁾ e Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Bolsista de apoio técnico, FUNCAP, Fortaleza, CE. ⁽²⁾ Engenheira-agrônoma, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. ⁽³⁾ Pesquisadora, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁴⁾ Pesquisadora, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁵⁾ Professora, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

Resumo – Como o antúrio é uma espécie tropical de grande importância para o mercado de flores e plantas ornamentais, a caracterização genética de suas variedades contribui para a proteção de cultivares e a produção comercial. Nesse sentido, marcadores moleculares são ferramentas bastante úteis, pois possibilitam a seleção indireta de caracteres que apresentam herabilidade de 100%. Objetivou-se com este trabalho identificar marcadores ISSR para caracterização molecular de quatro cultivares de antúrio (Luau, Jureia, Sublime e Maré) por meio de amostras de DNA de folhas oriundas de mudas estabelecidas in vitro por organogênese indireta. Foi realizada a extração de DNA a partir das amostras coletadas para cada cultivar. Com base nos produtos da PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), visualizados por eletroforese, as cultivares de antúrio foram avaliadas por meio de 18 marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), sendo posteriormente estimada a matriz de dissimilaridade genética entre as cultivares por meio do complemento aritmético do índice de Jaccard. O método de agrupamento foi o UPGMA (Método de Média Aritmética Não Ponderada), obtendo-se o dendrograma por análise multivariada. Os 18 marcadores selecionados apresentaram polimorfismo e foram eficientes para caracterizar e diferenciar as quatro cultivares de antúrio em estudo. Essa identificação de marcadores moleculares é importante para garantir maior eficiência na seleção de genitores em programas de melhoramento genético e possibilitar o *fingerprinting* nos processos de registro e lançamento de novas cultivares.

Termos para indexação: *Anthurium andraeanum*, variabilidade genética, *fingerprinting*.

Identification and selection of molecular markers for genotypic characterization of anthurium cultivars

Abstract – As anthurium is a tropical species of great importance to the flower and ornamental market, the precise genetic characterization of its varieties contribute to cultivars protection and commercial production. In this sense, molecular markers are very useful tools, as they enable indirect se-

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Pernambuco, 2.270, Pici
CEP 60.511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
www.embrapa.br/agroindustria-
-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

José Roberto Vieira Junior

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Membros

Afrânio Arley Teles Montenegro,

Aline Saraiva Teixeira, Francisco

Nelsieudes Sombra Oliveira,

Helenira Ellery Marinho

Vasconcelos, Kirley Marques

Canuto, Laura Maria Bruno,

Marlon Wagner Valentim Martins,

Pablo Busatto Figueiredo,

Roselayne Ferro Furtado, Sandra

Maria Morais Rodrigues

Edição executiva

José Cesamildo Cruz Magalhães

Revisão de texto

José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica

Rita de Cassia Costa Cid

(CRB-3/624)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

José Cesamildo Cruz Magalhães

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

lection of characters studied that have 100% heritability. The aim of this study was to identify ISSR markers to molecular characterization of four anthurium cultivars (Luau, Jureia, Sublime and Maré) using DNA samples from leaves derived from plantlets established in vitro by indirect organogenesis. DNA was extracted from the samples collected for each cultivar. From the PCR (Polymerase Chain Reaction) products, visualized by electrophoresis, the anthurium cultivars were evaluated using 18 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers, and the genetic dissimilarity matrix between the cultivars was then estimated using the arithmetic complement of the Jaccard index. The clustering method was UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) and the dendrogram was obtained by multivariate analysis. The 18 markers selected showed polymorphism and were efficient in characterizing and differentiating the four anthurium cultivars under study. This identification of molecular markers is important to ensure greater efficiency in the selection of genitors in breeding programs and to enable fingerprinting in the registration and launch of new cultivars.

Index terms: *Anthurium andraeanum*, genetic variability, fingerprinting.

Introdução

O agronegócio de flores e plantas ornamentais vem se difundindo no País, e um dos aspectos que contribui para essa expansão são as condições climáticas diferentes e favoráveis do Brasil para o cultivo. Em função dessa diversidade climática, é possível produzir flores, folhagens e outros derivados todos os dias do ano a um custo reduzido. Isso contribui para a consolidação de uma atividade econômica relevante, desenvolvida tanto por pequenos produtores rurais, o que contribui para uma melhor distribuição de renda e, conseqüentemente, ascensão no aspecto socioeconômico (Ribeiro; Lopes, 2021), como também por grandes produtores, como Cearosa, SBW do Brasil e AGN Almeida Gusmão Negócios Ltda., as três maiores empresas do mercado brasileiro em 2023 (Econodata, 2023).

Em 2022, o faturamento foi de US\$ 7,1 milhões com a exportação em produtos da floricultura (Sebrae-SC, 2023). Em 2021, a produção brasileira na cadeia produtiva da floricultura cresceu 15%, de acordo com a Ibraflor (Instituto Brasileiro de Floricultura), em relação ao ano anterior. Ao todo, foram R\$ 10,9 bilhões em rendimento pela cadeia

produtiva em 2021, frente a R\$ 9,6 bilhões do ano anterior (Diário da Região, 2023).

Em 2020, entre as espécies mais comercializadas no Veiling Holambra, atualmente um dos mais importantes centros comerciais e logístico de flores e plantas da América Latina, destacam-se os antúrios (Portal do Agronegócio, 2021). Os antúrios têm alcançado grande importância comercial no mundo, tanto como flor de corte quanto planta envasada (Muraleedharan et al., 2020).

A diversidade de plantas heterogêneas, resultantes da propagação por sementes em antúrio, leva à disponibilização de um banco de germoplasma muito atrativo ao melhoramento, no sentido do desenvolvimento, a partir de cruzamentos específicos, de novas cultivares com características ímpares de qualidade floral e produtividade. Após seleção da nova cultivar, é fundamental que haja um cultivo com uniformidade de stand para atender à demanda do mercado consumidor (Tombolato et al., 2012).

Uma vez que a propagação vegetativa tradicional do antúrio é um processo muito lento (Instituto Agronômico de Campinas, 2023), a cultura de tecidos tem sido uma alternativa para o aumento da sua área de cultivo (Carvalho, 2012), pois permite a produção de plantas em larga escala com a uniformização das características de interesse (Tombolato et al., 2012). Além disso, associada ao uso da cultura de tecidos, a caracterização dos genótipos por meio da utilização de marcadores moleculares pode contribuir efetivamente para o melhoramento (Toppa; Jadoski, 2013), resultando no sucesso do cultivo comercial de antúrio.

Marcadores moleculares podem ser definidos como segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a loci que determinam características de interesse. Assim, os marcadores moleculares podem acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este (Toppa; Jadoski, 2013). Dessa forma, os marcadores moleculares permitem maior conhecimento dos germoplasmas e da identificação em nível molecular da variabilidade genética de espécies vegetais (Dantas et al., 2012). Essa capacidade de detecção de variações no genoma favorece a tomada de decisão na escolha de genitores para cruzamentos com objetivo de obter novos exemplares de interesse agrônomo. Ademais, o uso de marcadores proporciona a precisa distinção de indivíduos geneticamente diferentes, o que atende ao requisito de distinguibilidade da Lei de Proteção de Cultivares nº 9.456, a qual por distinto define “a cultivar que se distingue claramente de qualquer outra

cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida” (Toppa; Jadoski, 2013).

Em antúrio, o estudo dos mecanismos genéticos ligados à espata, característica da espécie de maior interesse do mercado, é área prioritária de investigação para melhoramento (Elibox; Umaharan, 2012). Além disso, há uma constante busca por cultivares resistentes a pragas e doenças que impactam negativamente a produção da espécie. Ademais, a senescência das flores, especialmente quando submetidas a ambientes extremos durante o armazenamento (Elibox; Umaharan 2010), também é um desafio a ser superado para melhor atendimento à demanda de mercado. Portanto, a cor e forma das espatas, a resistência a estresses bióticos e a longa vida útil e de armazenamento são alvos para abordagens de melhoramento assistido por marcadores moleculares (Silva et al., 2015).

É bem conhecido que as antocianinas conferem pigmentação e também participam da defesa contra uma variedade de estresses bióticos e abióticos nas plantas (Khoo et al., 2017; Tanaka et al., 2008). Estudos anteriores, em outras espécies, indicam que um único gene não é responsável pelo acúmulo de antocianinas e que a biossíntese dessas substâncias envolve um mecanismo coordenado de muitos genes (Walker et al., 2007; Qian et al., 2014). Em antúrio, essa biossíntese é regulada pelos genes CHI, DFR, F3H e F3'5'H (Osorio-Guarín et al., 2021). Nesse sentido, avaliações moleculares em associação com análises fenotípicas, considerando a identificação de marcadores moleculares ligados às características de interesse agrônomo, são essenciais para o uso eficaz dos recursos fitogenéticos de plantas para atividades de pré-melhoramento e programas de melhoramento (Byrne et al., 2018; Pessoa et al., 2018). São vários os tipos de marcadores moleculares disponíveis e dentre aqueles identificados por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) estão os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Marcadores ISSR têm sido utilizados na caracterização molecular de diferentes genótipos (Buldewo et al., 2012; Souza Neto et al., 2014; Srisamoot; Padsri, 2018; Zhang et al., 2021) e espécies de *Anthurium* (Venkat et al., 2014). Além do alto grau de polimorfismo, esses marcadores apresentam baixo custo e alta reprodutibilidade, sendo uma opção adequada para ser empregada em estudos de diversidade genética, dentre outros (Ng; Tan, 2015).

Portanto, objetivou-se identificar marcadores moleculares ISSR para quatro cultivares de antúrio (Sublime, Luau, Jureia e Maré), visando avaliar a variabilidade genética entre essas cultivares e,

também, selecionar genitores com características de interesse para a obtenção de novas variedades.

Material e métodos

Foram utilizadas as cultivares de antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden ex. André) Jureia, Luau, Maré e Sublime, cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Campinas, São Paulo.

Extração de DNA

A extração de DNA seguiu o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações, a partir de folhas jovens e sadias de mudas de antúrio pré-estabelecidas in vitro por organogênese indireta e mantidas em meio de cultivo Pierik (1976) sem adição de reguladores de crescimento. O protocolo utilizou o tampão de extração CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) a 2%, com 100 mM de TRIS-HCl (pH 8,0); 20 mM de EDTA (etilenodiamino tetra-acético); 1,4 M de NaCl; 2% de CTAB e 2% de PVP 40 (polivinilpirrolidona). O protocolo foi adaptado modificando-se o número de lavagens com clorofórmio-isoamil para dois e diminuindo-se o tempo no banho-maria para três minutos.

Os DNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e, em seguida, diluídos em água ultrapura para a concentração de 10 ng/μL. A partir das soluções diluídas, realizaram-se as reações da PCR. Os DNAs extraídos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,8%, preparado em TBE (90 mM TRIS-ácido bórico / 1 mM EDTA) com concentração final 1X, e corados com brometo de etídio. O peso molecular de cada fragmento amplificado foi estimado com base no marcador de DNA 1 kb ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Amplificação do DNA

Inicialmente, foram realizados testes preliminares de amplificação com 63 iniciadores ISSR (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, EUA), visando determinar quais apresentariam maior polimorfismo, utilizando-se DNA de folha de duas cultivares de antúrio escolhidas ao acaso. Esses iniciadores foram selecionados com base na temperatura de anelamento (47 a 54 °C) da PCR. Após a amplificação, foi realizada a eletroforese, permitindo a visualização do produto da PCR em gel de agarose.

As reações de amplificação foram preparadas isoladamente para cada iniciador em um volume

final de 25 µL, compostas por: tampão de reação 1X; 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 mM de dNTPs; 20 ng de DNA; 0,2 µM de cada iniciador; 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); e água ultrapura para completar o volume da reação.

A PCR foi realizada em termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (47 a 55 °C, dependendo do iniciador, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto). Após os 40 ciclos, seguiu-se uma etapa de extensão final (72 °C por 5 minutos).

Após a amplificação, foi feita a eletroforese, na qual os produtos da PCR foram separados em gel de agarose (1,8%), corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL) e submetidos a 90 volts por 2 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil).

A partir dos padrões de bandas obtidos com os marcadores ISSR, foi elaborada uma matriz binária de dados com base na presença (1) e ausência (0) de bandas.

Em seguida, as estimativas de similaridade entre os pares de variedades (ii') foram convertidos em dissimilaridade, para construção de uma matriz, por meio do complemento aritmético (D) do coeficiente de similaridade de Jaccard, estimado de acordo com a Equação 1 a seguir:

$$(Sii'Jaccard) = \frac{A}{(A + B + C)}$$

em que: Sii' - coeficiente de Jaccard; A - número de concordâncias do tipo 1 1; B - o número de discordâncias do tipo 1 0; e C - número de discordâncias do tipo 0 1.

A partir da matriz de dissimilaridade genética, foi utilizado o método de agrupamento UPGMA (Método de Média Aritmética Não Ponderada) para a obtenção do dendrograma, utilizando-se análise multivariada. Também foi calculado o coeficiente de correlação cofenético (r) para avaliar a consistência do padrão de agrupamento.

O ponto de corte do dendrograma foi definido com base na estimativa da dissimilaridade genética média, apresentada na Equação 2.

$$(Dgm) = \sum Dgij / N$$

em que: Dgm - dissimilaridade genética média; Dgij - dissimilaridade genética entre os indivíduos i e j; N - número de pares obtidos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa computacional Genes (Cruz, 2008).

Resultados e discussão

Extração de DNA

Com a quantificação dos DNAs extraídos, pode-se analisar a pureza destes, sendo verificada pelas relações A260 / A280, as quais variaram de 2,0 a 2,2. A integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (Ferreira; Grattapaglia, 1995). Assim, as amostras obtidas apresentaram boa qualidade, o que é essencial para análises moleculares posteriores, como a PCR (Alessio et al., 2013).

Amplificação do DNA

Com base nos melhores resultados quanto à amplificação em termos de polimorfismo e nitidez das bandas geradas, dos 63 iniciadores ISSR testados, 18 foram selecionados para serem utilizados na amplificação das quatro cultivares de antúrio em estudo.

Na Tabela 1, estão listados os 18 marcadores selecionados para análise da variabilidade genética entre as quatro cultivares de antúrio, os quais amplificaram um total de 149 fragmentos. O número total de fragmentos polimórficos foi de 125, correspondendo a 83,89% de polimorfismo. Os polimorfismos individuais variaram de 46,15% (847) a 100% (810, 826, 855, 856 e 859). A média das bandas polimórficas geradas por iniciador foi de 6,94.

Souza Neto et al. (2014), ao trabalharem com a caracterização molecular de 20 genótipos de *Anthurium andraeanum* Linden ex. André, obtiveram uma média de 13,76 fragmentos polimórficos gerados por iniciador ISSR, correspondendo a 91,05% de polimorfismo. Em experimento conduzido por Venkat et al. (2014) com a construção de mapa genético entre duas espécies de antúrio (*Anthurium ornatum* Schott e *Anthurium andraeanum* Linden ex. André), cada *primer* ISSR produziu entre um e dois fragmentos polimórficos, com 100% de polimorfismo total. Esses dados demonstram que, independentemente do número de genótipos estudados, apesar de variações na média de fragmentos polimórficos, os marcadores moleculares ISSR utilizados são capazes de gerar altas taxas de polimorfismo, assim como observado no presente estudo.

Tabela 1. Identificação e sequência dos iniciadores, número de bandas geradas e polimórficas, e percentual de polimorfismo dos 18 iniciadores ISSR selecionados na caracterização das cultivares Jureia, Luau, Maré e Sublime de antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden ex. André).

Iniciador ISSR	(Sequência 5'→ 3')	Bandas geradas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
807	5' AGA GAG AGA GAG AGA GT	6	4	66,67
810	5' GAG AGA GAG AGA GAG AT	5	5	100,00
811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC	7	6	85,71
817	5' CAC ACA CAC ACA CAC AA	7	6	85,71
818	5' CAC ACA CAC ACA CAC AG	7	6	85,71
825	5' ACA CAC ACA CAC ACA CT	7	4	57,70
826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	5	5	100,00
828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA	10	9	90,00
829	5' TGT GTG TGT GTG TGT GC	8	7	87,50
844	5' CT CT CT CT CT CT CT CT RC	8	7	87,50
846	5' CAC ACA CAC ACA CAC ART	15	11	73,33
847	5' CAC ACA CAC ACA CAC ARC	13	6	46,15
849	5' GTG TGT GTG TGT GTG TYA	10	8	80,00
855	5' AC AC AC AC AC AC AC AC YT	6	6	100,00
856	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYA	11	11	100,00
858	5' TGT GTG TGT GTG TGT GRT	9	8	88,89
859	5' TGT GTG TGT GTG TGT GRC	9	9	100,00
878	5' GGA TGG ATG GAT GGA T	8	7	87,50
Total		149	125	83,89

ISSR também foram úteis para constatar a presença ou não de variação somaclonal em cultivares estabelecidas in vitro. Zhang et al. (2021), utilizando cinco *primers* polimórficos, verificaram que foi possível detectar variabilidade genética entre as quatro cultivares de antúrio, como também entre essas mesmas cultivares (plantas-mães ou plantas-matrizes) e as populações de mudas regeneradas in vitro a partir delas. Esses resultados evidenciam que a utilização de marcadores ISSR tem apresentado boa capacidade de detectar um alto nível de polimorfismo em antúrio.

Srisamoot e Padsri (2018) acessaram a variabilidade de cultivares de antúrio com apenas dez marcadores ISSR. No presente estudo, todos os 18 marcadores ISSR selecionados para amplificação do DNA das quatro cultivares apresentaram polimorfismo. Assim, todos são considerados úteis para serem utilizados na caracterização molecular dessas cultivares, especialmente os marcadores 810, 826,

855, 856 e 859, os quais apresentaram um total de 100% de polimorfismo. Isso evidencia que o número de marcadores polimórficos utilizados foi mais do que o suficiente para verificar as relações genéticas entre as cultivares.

Gantait e Sinniah (2011), em experimento conduzido com *Anthurium andraeanum*, cultivar Can-Can, submeteram amostras de DNA de mudas, obtidas por micropropagação e derivadas de sementes, a uma análise sobre a integridade genética explorando iniciadores ISSR, os quais exibiram um padrão monomórfico de bandas, revelando, assim, a manutenção da identidade genética das plantas obtidas pelos diferentes métodos de propagação. Com o resultado desses autores, pode-se concluir que a utilização de marcadores ISSR é uma ferramenta confiável para caracterização de cultivares de antúrio. Neste estudo, após a amplificação dos 18 marcadores, os perfis eletroforéticos de bandas reveladas evidenciaram que as cultivares compartilharam

um grande número de alelos. Em alguns casos, o perfil eletroforético foi muito similar e uma única banda foi responsável por diferenciar as cultivares. Os marcadores que geraram esse polimorfismo estão descritos na Tabela 2.

Em trabalho desenvolvido por Buldewo et al. (2012) com a identificação da diversidade genética entre 12 cultivares de *Anthurium andraeanum* Linden ex. André, marcadores ISSR exibiram polimorfismos únicos úteis para a distinção de algumas dessas cultivares, contribuindo para sua caracterização. A caracterização de cultivares é

de grande importância porque tem por objetivo registrar o maior número de características, para que se possa reconhecer e fazer uso com eficiência do germoplasma disponível, sendo essencial para a proteção de cultivares, escolha de genitores e identificação de uma nova cultivar para registro e lançamento em programas de melhoramento genético. Srisamoot e Padsri (2018) e Zhang et al. (2021) também identificaram polimorfismo por meio de marcadores ISSR entre as cultivares de antúrio avaliadas, incluindo a identificação e caracterização de cultivares.

Tabela 2. Iniciadores ISSR que distinguem cultivares de antúrio (*Anthurium andraeanum*, Linden ex. André) com perfil de amplificação similar, com diferença em uma única banda polimórfica, a partir de DNA proveniente de amostras de folha. Fortaleza, CE, 2015.

Cultivar com perfil de amplificação similar		Iniciador ISSR selecionado para distinção das cultivares
Presença de banda	Ausência de banda	
Luau	Maré/Jureia	807
Jureia	Maré	810
Jureia	Luau	811/828
Jureia	Sublime	878

As medidas de dissimilaridade são de grande importância em estudos de diversidade genética em que se busca identificar genitores considerados promissores a serem utilizados em programas de melhoramento genético (Cruz et al., 2011). A partir dos dados de presença (1) e ausência (0) de bandas observadas na eletroforese, foi gerada uma matriz com a distância genética entre as cultivares de antúrio. A distância genética entre as quatro cultivares variou de 0,42 a 0,70. O menor índice de dissimilaridade observado foi aquele entre Luau e Jureia. Em contrapartida, os maiores índices de dissimilaridade foram observados entre Sublime e Maré (0,70) e entre Sublime e Jureia (0,66).

Quanto maior a dissimilaridade obtida entre diferentes genótipos, maior o número de combinações possíveis entre características distintas. Assim, com base nas distâncias genéticas obtidas para as cultivares de antúrio estudadas, é possível indicar que as cultivares Jureia e Maré podem ser utilizadas em cruzamentos com a cultivar Sublime para a possível obtenção de progênie recombinações. No entanto, o melhorista deve considerar também outros caracteres mais apropriados que devem ser selecionados nos genitores para obtenção de genótipos superiores.

As características fenotípicas das cultivares de antúrio relevantes na seleção de genitores são as seguintes: 'Jureia' - espata com muitas nervuras, de coloração coral-luminoso e espádice branco/amarelado; 'Luau' - espata de coloração branca e com brilho, com espádice quase totalmente branca (Gonçalves et al., 2023); 'Nuvem' - espata branca, firme, brilhante, formato redondo, tamanho grande e espádice branco/amarelo (Clonagri, 2021); 'Maré' - espata com muitas nervuras de coloração branca, brilhante e espádice robusta de coloração branca/amarela; 'Sublime' - espata com nervuras rasas, de coloração rosa opaca e espádice rosa claro com a ponta mais corada (Instituto Agrônomo de Campinas, 2023).

Em pesquisa conduzida por Buldewo et al. (2012), marcadores ISSR foram utilizados na identificação da diversidade genética entre 12 cultivares de *Anthurium andraeanum* Linden ex. André. As distâncias genéticas entre os diferentes genótipos variaram de 0,24 a 0,78, revelando ampla variabilidade genética entre os genótipos em estudo. O trabalho desenvolvido por Souza Neto et al. (2014) envolveu 20 genótipos de antúrio, e os valores de dissimilaridade variaram de 0,27, entre os genótipos SA 01 e SA 02, e 0,91, entre SA 01 e NA 33. Assim, SA 01 e NA 33, por apresentarem grande dissimilaridade

entre si, foram considerados promissores em programas de melhoramento genético e possíveis genitores de novas variedades.

No presente estudo, a menor distância genética entre as quatro cultivares de antúrio foi de 0,42, valor superior àqueles observados nos trabalhos conduzidos por Buldewo et al. (2012) e Souza Neto et al. (2014), indicando baixa similaridade genética entre as cultivares estudadas e, portanto, que há maiores chances de combinações gênicas para obtenção de novas cultivares, mesmo entre aquelas geneticamente menos distantes.

A partir da matriz de distâncias genéticas, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, por

meio do complemento do coeficiente de Jaccard, foi gerado o dendrograma de dissimilaridade genética (Figura 1), com ponto de corte de 0,58, o qual foi obtido pela distância genética média. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) pode ser utilizado para indicar a consistência de um padrão de agrupamento, que terá maior adequação quanto mais perto da unidade estiverem os valores deste coeficiente (Oliveira et al., 2019). O valor do CCC calculado foi de 0,94, o que indica boa representatividade do dendrograma de dissimilaridade genética gerado para as cultivares de antúrio em estudo. No trabalho de Srisamoot e Padsri (2018), o CCC calculado foi de 0,92, similar ao obtido neste estudo.

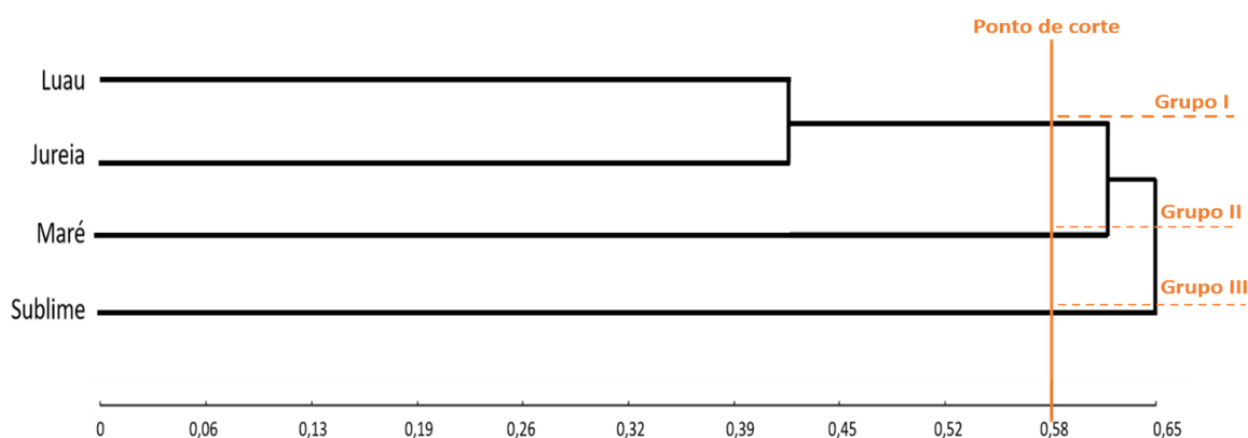


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido com a utilização do método de agrupamento UPGMA (Método de Média Aritmética Não Ponderada), por análise multivariada, a partir da matriz de dissimilaridade genética entre quatro cultivares de antúrio. Ponto de corte com base na estimativa da dissimilaridade genética média: 0,58. Grupos formados: I (Luau e Jureia); II (Maré); e III (Sublime).

No primeiro grupo, estão Luau e Jureia, evidenciando estas cultivares com a maior similaridade genética quando relacionadas àquelas cultivares em grupos distintos. Os grupos II e III, cada um composto apenas por uma cultivar, Maré e Sublime, respectivamente, revelam que elas possuem afastamento genético entre si e, com relação ao grupo I, sendo as cultivares Maré e Sublime, em ordem crescente, as cultivares com maior distância genética entre as quatro estudadas.

Considerando-se as características fenotípicas das cultivares de antúrio em estudo, já relatadas, é importante observar que as cultivares Jureia e Luau são muito distintas do ponto de vista fenotípico; porém, estão em um mesmo agrupamento no dendrograma de dissimilaridade genética, apresentando distância genética menor do que as cultivares Luau e Maré, fenotipicamente semelhantes. Da mesma forma, Jureia e Sublime, que apresentam espadas com cores análogas, ou seja, com pigmentação

semelhante, apresentam-se em grupos distintos no dendrograma. Ou seja, fenótipos similares podem não indicar proximidade genética e vice-versa.

Este estudo contribui para entender que mesmo os marcadores moleculares mais genéricos, como no caso dos ISSR, são muito importantes para uma caracterização precisa e detalhada dos genótipos e, portanto, ferramenta muito útil em estudos genéticos. No caso específico deste estudo, os marcadores ISSR testados são úteis para detectar informação genética capaz de permitir a identificação precisa das quatro cultivares de antúrio consideradas, possibilitando estudos de caracterização genética e escolha de genitores para realização de cruzamentos.

Conclusões

Os 18 marcadores ISSR selecionados para amplificação das amostras de DNA foram eficientes em

detectar polimorfismos entre as cultivares estudadas de antúrio e acessar a variabilidade genética entre elas. Jureia e Luau possuem maior similaridade genética, enquanto que Sublime e Maré são as cultivares mais promissoras para cruzamentos com possibilidade de obtenção de progênies recombinantes, visto serem mais distantes geneticamente. Desses 18 marcadores polimórficos, cinco (807, 810, 811, 828 e 878) podem ser utilizados para a identificação inequívoca entre as cultivares estudadas.

Agradecimentos

Ao Dr. Antonio Fernando Caetano Tombolato (in memoriam) por ceder as mudas in vitro do Instituto Agrônomo (IAC) para a realização deste trabalho; à Embrapa Agroindústria Tropical e à Universidade Federal do Ceará pelo auxílio à pesquisa.

Referências

- ALESSIO, V. M.; HOFFMANN, H. P.; CARNEIRO, M. S. Método rápido para extração de DNA de *Puccinia kuehnii*. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 198-200, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000300009>.
- BYRNE, P. F.; VOLK, G. M.; GARDNER, C.; GORE, M. A.; SIMON, P. W.; SMITH, S. Sustaining the future of plant breeding: the critical role of the USDA ARS National Plant Germplasm System. **Crop Science**, v. 58, n. 2, p. 451-468, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.05.0303>.
- BULDEWO, S.; PILLAY, M.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Genetic diversity in *Anthurium andraeanum* cultivars in Mauritius. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 16737-16744, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB12.2614>.
- CARVALHO, A. C. P. P. de. Propagação. In: CASTRO, A. C. R. de; TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; LOGES, V. (ed.). **Antúrio**. Brasília, DF: Embrapa. 2012. p. 41-57.
- CLONAGRI. **Arquivos antúrio de corte**. Disponível em: <https://clonagri.com/produto/iac-nuven>. Acesso em: 2 maio 2021.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620 p.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: Diversidade Genética. v. 1. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. 278 p.
- DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. de S.; ARAÚJO, S. I.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 183-189, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000100025>.
- DIÁRIO DA REGIÃO. **Mercado de flores e plantas ornamentais cresce e atrai produtores**. Disponível em: <https://www.diariodaregiao.com.br/economia/agronego-cio/mercado-de-flores-e-plantas-ornamentais-cresce-e-atrai-produtores-1.1055343>. Acesso em: 17 mar. 2023.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- ECONODATA. **Empresas de cultivo de flores e plantas ornamentais no Brasil**. 2023. Disponível em: <https://www.econodata.com.br/empresas/todo-brasil/cultivo-de-flores-e-plantas-ornamentais-a-0122900>. Acesso em: 18 nov. 2023.
- ELIBOX, W.; UMAHARAN, P. A study of morphophysiological descriptors of cultivated *Anthurium andraeanum* Hort. **HortScience**, v. 47, p. 1234-1240, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-4-0421>.
- ELIBOX, W.; UMAHARAN, P. Cultivar differences in the deterioration of vase-life in cut-flowers of *Anthurium andraeanum* is determined by mechanisms that regulate water uptake. **Scientia Horticulture**, v. 124, p. 102-108, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.005>.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Morphology, flow cytometry and molecular assessment of ex-vitro grown micropropagated anthurium in comparison with seed germinated plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 13991-13998, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB11.1855>.
- GONÇALVES, C.; CASTRO, C. E. F.; MORAES, G. D.; TAMURA, M. M. N.; MATTIUZ, C. F. M.; PIOTTO, F. A.; PERESSIN, V. A.; FELTRAN, J. C.; FABRI, E. G.; NOMURA, E. S. **Melhoramento de plantas ornamentais do Instituto Agrônomo (IAC)**: 80 anos de história. Campinas: IAC, 2023. 65 p. (Série Tecnologia APTA; Boletim Técnico IAC, n. 233).
- INSTITUTO AGRÔNOMO DE CAMPINAS. **Astral**: nova variedade de antúrio desenvolvida pelo IAC. 2023. Disponível em: [https://www.iac.sp.gov.br/cultivares/inicio/Folders/Ant%C3%Bario/IACAstral\(IAC-154\).htm](https://www.iac.sp.gov.br/cultivares/inicio/Folders/Ant%C3%Bario/IACAstral(IAC-154).htm). Acesso em: 19 nov. 2023.
- KHOO, H. E.; AZLAN, A.; TANG, S. T.; LIM, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, 61(1): 1361779, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.

- MURALEEDHARAN, A.; SHA, K.; KUMAR, S.; SAMLIND SUJIN, G.; JOSHI, J. L.; PRAVEEN SAMPATHKUMAR, C. Performance of *Anthurium andraeanum* to different growing media on flowering. **Plant Archives**, v. 20, supplement 1, p. 3738-3740, 2020. Disponível em: http://www.plantarchives.org/SPECIAL%20ISSUE%2020-1/3738-3740_695_.pdf.
- NG, W. L.; TAN S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **ASM Science Journal**, v. 9, p. 30-39, 2015.
- PESSOA, A. M. S.; RÊGO, E. R.; CARVALHO, M. G.; SANTOS C. A. P.; RÊGO, M. M. Genetic diversity among accessions of *Capsicum annum* L. through morphoagronomic characters. **Genetic and Molecular Research**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16039883>.
- OLIVEIRA, C. S.; PEIXOTO, J. V. M.; MOMESSO, M. P.; PEREIRA, L. M.; PERES, H. G.; MACIEL, G. M. Características de plântulas: dissimilaridade genética entre acessos de pimenta. **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 9, p. e09114, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4322/2359-6643.09114>.
- OSORIO-GUARÍN, J.; GOPAULCHAN, D.; QUANCKENBUSH, C.; LENNON, A. M.; UMAHARAN, P.; CORNEJO, O. E. Comparative transcriptomic analysis reveals key components controlling spathe color in *Anthurium andraeanum* (Hort.) **Plos one**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261364>.
- PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. plantlets produced from callus tissues cultivated in vitro. **Physiologia Plantarum**, v. 37, p. 80-82, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb01876.x>.
- PORTAL DO AGRONEGÓCIO: Flores para finados devem crescer em faturamento, mesmo com redução do volume. 2021. Disponível em: <https://www.portaldoa-gronegocio.com.br/agricultura/flores/noticias/flores-para-finados-devem-crescer-em-faturamento-mesmo-com-reducao-do-volume>. Acesso em: 6 mai. 2021.
- QIAN, M.; YU, B.; LI, X.; SUN, Y.; ZHANG, D.; TENG, Y. Isolation and expression analysis of anthocyanin biosynthesis genes from the Red Chinese Sand Pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Mantianhong, in response to methyl jasmonate treatment and UV-B/VIS conditions. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 428-437, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0652-6>.
- RIBEIRO, G. M.; LOPES, F. Empreendedorismo no agronegócio: tudo são flores. **Jornal de campo**. 2021. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpupublisher/materias/Materia.asp?id=26754&secao=Colunas%20e%20Artigos>. Acesso em: 13 mar. 2023.
- Sebrae-SC. **Panorama do mercado de flores e plantas ornamentais**. 2023. Disponível em: <https://www.sebrae-sc.com.br/observatorio/potencial-de-mercado/mercado-de-flores-e-plantas-ornamentais>. Acesso em: 20 mar. 2023.
- SILVA, J. T. da; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S.; WINARTO, B.; LENNON, A.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y.; CHRISTOPHER, D. Genetic transformation and molecular research in anthurium: progress and prospects. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 205-219, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0832-1>.
- SOUZA NETO, J. D.; SOARES, T. C. B.; MOTTA, L. B.; CABRAL P. D. S.; SILVA, J. A. Molecular characterization of *Anthurium* genotypes by using DNA fingerprinting and SPAR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 4766-4775, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4238/2014.July.2.6>.
- SRISAMOOT, N.; PADSRI, I. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using ISSR markers. **Genomics and Genetics**, v. 11, p. 1-8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14456/gag.2018.1>.
- TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03447.x>.
- TOMBOLATO, A. F. C.; AUGUSTO, T. N.; NOMURA, E. S. Melhoramento de antúrio para flor de corte. In: CASTRO, A. C. R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; LOGES, V. (ed.). **Antúrio**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 163 p.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p. 1-5, 2013. DOI: <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v12np1-5>.
- VENKAT, S. K.; BOMMISSETTY, P.; PATIL, M. S.; REDDY, L.; CHENNAREDDY, A. The genetic linkage maps of *Anthurium* species based on RAPD, ISSR and SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 178, p. 132-137, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.017>.
- WALKER, A. R.; LEE, E.; BOGS, J.; MCDAVID, D. A. J.; THOMAS, M. R.; ROBINSON, S. P. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. **Plant Journal**, v. 49, p. 772-785, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02997.x>.
- ZHANG, H.; WANG, G.; QIAO, Y.; CHEN, C. Plant regeneration from segments of *Anthurium andraeanum* and assessment of genetic fidelity of in vitro regenerates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 57, p. 954-964, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10172-6>.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA