

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS
POLIPLOIDES DE *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink**

UFAM

MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER

MANAUS
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS
POLIPLOIDES DE *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink*

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, na linha de pesquisa Biotecnologia, Genética e Melhoramento Vegetal, para obtenção de título de Doutor.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes

Coorientadora: Regina Caetano Quisen

MANAUS
2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R161i Raizer, Marcelo Domingues Martins
Identificação e caracterização de plantas poliploides de *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink* / Marcelo Domingues Martins Raizer.
2017
106 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes
Coorientadora: Regina Caetano Quisen
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Flores tropicais. 2. Melhoramento genético. 3. Colchicina. 4. Citometria de fluxo. I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS
POLIPLOIDES DE *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink*

Marcelo Domingues Martins Raizer

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação
em Agronomia Tropical, da Universidade Federal do Amazonas,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Agronomia

Apresentação pública e aprovação em 30 de junho de 2017

Comissão examinadora:

Dr. Jorge Hugo Iriarte Martel (INPA)

Dra. Luciana Souza da Aguiar e Souza (UFAM)

Dr. Magno Savio Ferreira Valente (UFAM)

Dra. Lucia Helena Pinheiro Martins (UFAM)

Dra. Maria Teresa Gomes Lopes (UFAM)

*Ao meu Avô e minhas avós, Mario Raizer, Maria da Conceição Raizer e
Maria Isabel Martins (in memoriam) pelo amor e confiança incondicional.*

Ofereço

*A minha mãe Maria Lúcia Martins
Pereira que com muito carinho e
esforço não mediu esforços para que eu
chegasse a esta etapa da minha vida.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, que sempre me guiou nas minhas conquistas me acalutando nos momentos de aflição;

A Universidade Federal do Amazonas - UFAM, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, pelo aporte institucional e disponibilidade do material genético da infraestrutura para a realização dos experimentos;

A FAPEAM, pela sua importância no desenvolvimento da pesquisa e em especial neste trabalho, pela concessão da bolsa de pesquisa;

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, pela doação do material vegetal que originou este estudo;

A minha orientadora, Dra. Maria Teresa Gomes Lopes, pelo apoio, dedicação, sugestões, paciência e confiança na orientação;

A minha coorientadora, Dra. Regina Caetano Quisen, pelo valoroso esforço e apoio disponibilizado durante toda a realização do projeto;

A equipe de funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em especial ao Dr. Moacir Pascoal e ao Dr. Filipe Almendagna Rodrigues, pelo acolhimento, treinamento e instrução na parte de citometria de fluxo;

As técnicas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa, Rosimar Fernandes e Pamela Harada pela dedicação e disposição na transmissão do conhecimento;

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Mozanil Correia Pantoja e Francly Mary Galúcio Sousa, pelo treinamento, apoio, confiança e paciência na parte de AFLP;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa,

Suelen Cristina Lima, Marcelle Larissa Correa de Lima, Amanda da Rocha Gomes, Graziela Guimarães, Daniel Nascimento Motta, Daniele Coelho, Cibele Azamora e Eduardo Dias, pelo dialogo, apoio e conforto oferecido nas horas difíceis;

Aos amigos de longa data que ofereceram apoio durante as etapas mais difíceis ao decorrer desta jornada: Mozar Alves Gondim Neto (*in memoriam*), Samuel Lima (*in memoriam*), Marco Antônio de Oliveira, Bruno Miranda da Silva, Claudemir Matos, Alexandre Leite Magalhães, Felipe Nascimento Ximenes e Diego de Souza Guimarães;

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho;

Deixo aqui expresso meu muito obrigado!

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS POLIPLOIDES DE *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink

RESUMO:

Um dos setores que possuem maior taxa de crescimento no mercado nacional e internacional é o de floricultura. As plantas ornamentais se diferenciam pela sua beleza, que encantam tanto através das suas formas exóticas, como pela variação de cores, e dentre elas destaca-se a *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. A busca dos consumidores por novidades tem obrigado os produtores a lançarem, cada vez mais rapidamente, novas variedades para manter a competição nesse segmento produtivo. Neste sentido, pesquisas biotecnológicas foram realizadas pela Embrapa Amazônia Ocidental com a finalidade de induzir a poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina em três concentrações (0,01%, 0,05% e 0,1%), visando obter uma maior taxa de variabilidade genética ocasionando plantas maiores e melhores, e como uma ponte para a transferência gênica entre diferentes níveis de ploidia. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as plantas estabelecidas em campo, provenientes dos ensaios de indução de poliploidia in vitro para determinar as características morfológicas, fisiológicas, molecular e produtivas de 42 clones de *H. chartacea* var. Sexy Pink. As análises de caracterização foram realizadas por meio de 49 descritores morfológicos e agrônômicos, determinação do número de locos polimórficos por AFLP, caracterização da estrutura do limbo foliar e avaliação da densidade estomática por meio de microscopia, além de identificação do nível de ploidia por citometria de fluxo. Como os genótipos 13, 20, 36, 37 e 40 não apresentaram inflorescências durante os dois anos de avaliação, e não apresentaram nenhuma outra característica de interesse comercial, foram considerados inaptos para seleção para futuros trabalhos de seleção e melhoramento. O genótipo 35 foi o que apresentou maiores variações morfológicas com alterações na posição e coloração da inflorescência, além de possuir as bordas do limbo foliar inteiras. O clone 18 apresentou altura da planta e tamanho das inflorescências reduzidos. O clone 26 apresentou necrose e desfolhamento durante a floração, o que torna este genótipo mais interessante para o paisagismo. As combinações dos primers utilizados para a análise de AFLP revelaram um total de 519 bandas, variando entre 100 e 800 pares de bases. O número total de locos por primer variou de 157 a 188, enquanto que a quantidade de variação genética obtida pela análise de variância molecular mostrou que 99,67% da variabilidade genética encontra-se

dentro dos tratamentos com colchicina analisados, e apenas 0,33% entre os tratamentos dos clones de *H. chartacea*. Os estômatos de todos os clones apresentaram morfologia tetracítica e células-guarda sem alterações significativas; porém, houve uma menor densidade estomática, além de um tamanho maior que os estômatos apresentados pelo tratamento controle. O trabalho permitiu a identificação de 4 genótipos tetraploides e 11 mixoploides, pela técnica de citometria de fluxo. Auxiliando na identificação de genótipos potenciais para programa de melhoramento genético e futuramente na obtenção de novas variedades.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLIPLOID PLANT OF *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink

ABSTRACT:

One of the sectors that have the highest growth rate in the national and international market is floriculture. Ornamental plants are distinguished by their beauty, which enchant both through their exotic forms and by the variation of colors, among which stands out the *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. The search for consumers for news has forced producers to launch, more and more quickly, new varieties to maintain competition in this productive segment. In this sense, biotechnological research was carried out by Embrapa Amazônia Occidental to induce polyploidy in vitro by somatic doubling using colchicine in three concentrations (0.01%, 0.05% and 0.1%) in order to obtain a Higher rate of genetic variability causing larger and better plants, and as a bridge for gene transfer between different levels of ploidy. In this context, the objective of this work was to evaluate the plants established in the field, from in vitro polyploidy induction assays to determine the morphological, physiological, molecular and productive characteristics of 42 clones of *H. chartacea* var. Sexy Pink. The characterization analyzes were performed by means of 49 morphological and agronomic descriptors, determination of the number of polymorphic loci by AFLP, characterization of leaf blade structure and stomatal density evaluation by means of microscopy, besides identification of the ploidy level by citometry of flow. As the genotypes 13, 20, 36, 37 and 40 did not present inflorescences during the two years of evaluation and did not present any other characteristic of commercial interest, they were considered unfit for selection for future selection and breeding work. The genotype 35 showed the highest morphological variations with changes in the position and color of the inflorescence, besides having the edges of the whole leaf blade. Clone 18 showed plant height and inflorescence size reduced. Clone 26 presented total defoliation during flowering, which makes this genotype more interesting for landscaping. Combinations of the primers used for AFLP analysis revealed a total of 519 bands, ranging from 100 to 800 base pairs. The total number of loci per primer varied from 157 to 188, while the amount of genetic variation obtained by analysis of molecular variance showed that 99.67% of the genetic variability is within the treatments with colchicine analyzed, and only 0.33 % Among treatments of *H. chartacea* clones. The stomata of all clones showed tetracytic morphology and guard cells without significant alterations. The

highest ED were observed in clones 1 and 14 for the adaxial part of the leaves, whereas for the abaxial part, clones 10, 12 and 14 were the ones with the highest values. The lowest values were verified in clones 7 and 35 for the adaxial part and 7 and 13 for the abaxial part of the leaves. The work allowed the identification of 4 tetraploid and 11 mixoploid genotypes by the flow cytometry technique. Helping in the identification of potential genotypes for genetic improvement program and future in obtaining new varieties.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Evolução da ordem Zingiberales. Fonte: Smithsonian National Museum of Natural History. 08
- Figura 2** - Distribuição do gênero *Heliconia*, regiões destacadas em vermelho correspondem à presença deste gênero. 09
- Figura 3** - Hábitos de crescimento de plantas de *Heliconia*: (A) Musóide, (B) Canóide e (C) Zingiberóide, segundo Arruda 2008 10
- Figura 4** - Disposição das inflorescências de algumas *Heliconias*. Eretas: (A) *H. psittacorum*; (B) *H. bihai*; (C) *H. orthotricha*; (D) *H. caribaea*. Pendentes: (E) *H. vellerigera*; (F) *H. mariae*; (G) *H. chartacea* e (H) *H. rostrata*..... 11
- Figura 05** - *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink 12
- Figura 6** - Diferentes pontos de ação de agentes antimetabólicos no ciclo celular vegetal. Grupo 1: colchicina, colcemida, vimblastina, acenafetano, dintroanilinas, fosfoamidatos, piridinas, benzamidas, e ácido benzoico. Grupo 2: carbanatos. 17
- Figura 7** - Estômatos das três espécies mais usadas em estudos de fisiologia estomática. a) *Commelina communis*; b) *Vicia faba* e; c) *Zea mays*. 31
- Figura 8** - Análise de agrupamento UPGMA, a partir das dissimilaridades de 38 clones de *H. chartacea*, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e o complemento aritmético do índice de coincidência simples. Manaus, AM. 2017 51
- Figura 9** - Inflorescências de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. (A) Clone 29; (B) Clone 32; (C) Clone 35. Manaus, AM. 2017 52
- Figura 10** - Análise de agrupamento UPGMA, a partir das dissimilaridades de 38 clones de *H. chartacea*, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e quantitativos e algoritmo de Gower. Manaus, AM. 2017 53
- Figura 11** - Alterações Altura da planta e no tamanho da inflorescência do genótipo 18, de *H. chartacea* var. Sexy Pink. 55
- Figura 12** - Pseudocaule de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. (A) Clone 27; (B) Clone 35. Setas mostram a presença de cerosidade. Manaus, AM. 2017 57
- Figura 13** - Alterações no limbo foliar de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. (A) Clone 12, (B) Clone 35. Manaus, AM. 2017 58

Figura 14 - Alterações no limbo foliar de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink. (A,B) Genótipo 26. Setas indicam a perda das folhas. Manaus, AM. 2017.	59
Figura 15 - Inflorescências de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. De 1 à 25: Clones poliploides. Manaus, AM. 2017	64
Figura 16 - Continuação. Inflorescências de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. De 26 a 41: Clones poliploides. 42: Área de cultivo. Manaus, AM. 2017.....	65
Figura 17 - Formato dos estômatos e das células guarda dos clones poliploides de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink, na parte Abaxial (A) e Adaxial (B). Manaus, AM. 2017	69
Figura 18 - Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo em clones de <i>H. chartacea</i> induzidos à poliploidia.	73
Figura 19 - Diferentes níveis de ploidia em <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink: A) Diploide (2x); B) Mixoploide (2x + 4x) e C) Tetraploide (4x). Manaus, AM. 2017	76
Figura 20 - Revelação do DNA dos 37 genótipos de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink em gel-agarose. Manaus, AM. 2017. (Extração feita com N=Nitrogênio líquido, C=CTAB)	77
Figura 21 - Análise de agrupamento UPGMA a partir do complemento aritmético da distância genética de Jaccard para 37 clones de <i>H. chartacea</i> . Manaus, AM. 2017	79
Figura 22 - Análise de escalonamento multidimensional não-métrico das distâncias genéticas entre os clones de <i>H. chartacea</i> . Manaus, AM. 2017	80
Figura 23 - Valores de agrupamento (K) mais prováveis obtidos pelo método de Evano et. al (2005). Manaus, AM. 2017	81
Figura 24 - Estrutura populacional empregando o software Structure a partir de 37 clones de <i>H. chartacea</i> , considerando o número de agrupamentos como K=3	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descritores morfológicos qualitativos utilizados para avaliar os clones poliploides de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink. Manaus – AM. 2017	36
Tabela 2 - Esquema resumido da análise de variância conjunta dos dados da análise estomática de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink. Manaus – AM. 2017	41
Tabela 3 - Combinação de <i>Primers</i> utilizados na amplificação seletiva para analisar qualidade de amplificação e número de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA em <i>Heliconia chartacea</i> var. Sexy Pink. Manaus, AM. 2017	46
Tabela 4 - Agrupamento dos clones de <i>H. chartacea</i> pelo método de otimização de Tocher, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e o complemento aritmético do índice de coincidência simples. Manaus, AM. 2017	52
Tabela 5 - Agrupamento dos clones de <i>H. chartacea</i> pelo método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo algoritmo de Gower. Manaus, AM. 2017	53
Tabela 6 - Caracterização de 38 clones de <i>H. chartacea</i> , considerando análise de descritores morfológicos do pseudocaule. Manaus, AM. 2017	54
Tabela 7 - Caracterização de 38 clones de <i>H. chartacea</i> , considerando análise de descritores morfológicos da folha. Manaus, AM. 2017	60
Tabela 8 - Caracterização de 38 clones de <i>H. chartacea</i> , considerando análise de descritores morfológicos da inflorescência. Manaus, AM. 2017	62
Tabela 9 - Quadrados médios e parâmetros genéticos referentes à densidade estomática (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DQ) e a funcionalidade estomática (FUN), avaliados em 37 clones de <i>H. chartacea</i> . Manaus, AM. 2017	66
Tabela 10 - Coeficientes de correlação entre a densidade estomática (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DQ) e a funcionalidade estomática (FUN), avaliadas em 37 clones de <i>H. chartacea</i> nas regiões adaxial ⁽¹⁾ e abaxial ⁽²⁾ das folhas. Manaus, AM. 2017	69
Tabela 11 - Médias estimadas da densidade estomática (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DQ) e a funcionalidade estomática (FUN), avaliadas em 37 clones de <i>H. chartacea</i> em diferentes regiões da folha. Manaus, AM. 2017	70

Tabela 12 - Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo em clones de <i>H. chartacea</i> induzidos à poliploidia utilizando os tratamento 1 – controle (T1), tratamento 2 – 0,01% de couchicina (T2), tratamento 3 – 0,05% de couchicina (T3) e tratamento 4 – 0,1% de couchicina (T4), Manaus, AM. 2017	72
Tabela 13 - Coeficiente de Variação estimado por citometria de fluxo de clones induzidos à poliploidia de <i>H. chartacea</i> var. Sexy Pink. Manaus, AM. 2017	75
Tabela 14 - Polimorfismo obtido em clones de <i>H. chartacea</i> a partir de três combinações de oligonucleotídeos utilizando marcadores AFLP. Manaus, AM. 2017	78
Tabela 15 - Agrupamento dos clones de <i>H. chartacea</i> pelo método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Manaus, AM. 2017	80
Tabela 16 - Variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA entre e dentro de tratamentos de indução a mutação em <i>H. chartacea</i>	82
Tabela 17: Matriz de dissimilaridade entre clones de <i>H. chartacea</i> , baseado em dados moleculares de AFLP e o complemento aritmético da distância genética de Jaccard. Manaus, AM. 2017.....	105
Tabela 18 - Matriz de dissimilaridade entre clones de <i>H. chartacea</i> , baseado em caracteres morfológicos qualitativos e o complemento aritmético do índice de coincidência simples. Manaus, AM. 2017.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABP** - Ângulo da 1ª bráctea em relação ao pedúnculo
- AFLP** - Amplified fragment length polymorphism
- ALP** - Altura da planta
- AMOVA** - Análise de Variância Molecular
- APEX** - Agência de Promoção de Exportações e Investimentos
- BEM** - Margem da base escariosa
- CB** - Comprimento da 2ª bráctea
- CBE** - Cor da bráctea externa
- CBI** - Cor da bráctea interna
- CBL** - Comparação das dimensões da base do limbo
- CBP** - Média; Cor da base do perigônio
- CEAGESP** - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo
- CEASA** Campinas - Centrais de Abastecimento de Campinas S.A.
- CEB** - Cerosidade das brácteas
- CER** - Cerosidade do pseudocaule
- CFI** - Cor verde da face inferior da folha;
- CFO** - Comprimento da terceira folha
- CFS** - Cor verde da face superior da folha
- CI** - Comprimento da inflorescência
- CIB** - Cor interna das bainhas.
- CLD** - Cerosidade do limbo na superfície dorsal da folha
- CLP** - Cor dos lóbulos do perigônio
- CLV** - Cerosidade do limbo na superfície ventral da folha
- CMP** - Cor da margem do pecíolo
- CPC** - Cor do pseudocaule;
- CPE** - Cor da Pétala
- CRA** - Cor da ráquis
- CSE** - Cor da Sépala
- CTAB** - Cetyl trimethylammonium bromide

DE - Densidade estomática

DIVA - Dispersion and Vicariance Analysis

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Diâmetro polar dos estômatos

DPC - Diâmetro do pseudocaule

DQ - Diâmetro equatorial dos estômatos

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAB - Forma do ápice da bráctea

FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

FBL - Forma da base do limbo

FBP - Forma da base do pecíolo

FE - Folha na extremidade (1ª bráctea)

FMP - Forma da margem do pecíolo

FUN - Funcionalidade estomática

IAN - Intensidade de antocianina

LB - Largura da segunda bráctea

LFO - Largura da terceira folha

LI - Largura da inflorescência

LIM - Limbo

NBI - Número de brácteas na inflorescência madura

OCI - Ovário: Cor do fruto imaturo

OCM - Ovário: Cor do fruto maduro

OPA - One Phor All

PAP - Presença de antocianina no perigônio

PB - Pilosidade das brácteas

PCR - Polimerase Chain Reaction

PF - Período de florescimento.

PFO - Posição das folhas

PIH - Posicionamento da inflorescência em relação a haste

PIL - Pilosidade do pseudocaule

PML - Presença de manchas no limbo da muda

PPO - Presença de Pólen

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

SB - Simetria da bráctea

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

TCN - Tonalidade da cor da face inferior da nervura principal

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

TR - Torção da ráquis

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

UFLA - Universidade Federal de Lavras

UPGMA - Unweighted Pair Group Method using Arithmetical Averages

VR - Visualização da ráquis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral:	3
2.2. Objetivos Específicos:	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Helicônias	6
3.1.1. Descrição botânica e classificação taxonômica.....	9
3.1.2. <i>Heliconia chartacea</i> var. <i>Sexy Pink</i> – segundo Mosca et al. (2004).....	12
3.2. Propagação das helicônias	13
3.3. Indução e identificação de variabilidade genética em plantas.....	14
3.4. Poliploidia via processos indutores artificiais	16
3.5. Poliploidia como ferramenta para o melhoramento genético	18
3.5.1. Parâmetros genéticos	20
3.5.2. Herdabilidade.....	21
3.5.3. Análise de Agrupamento.....	22
3.5.4. Divergência genética em recursos vegetais	24
3.5.5. Marcadores moleculares	25
3.6. Análise Multivariada	28
3.7. Caracterização dos estômatos.....	30
3.7.1. A estrutura dos estômatos:	30
3.7.2. Densidade estomática:	33
3.8. Citometria de fluxo.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Caracterização morfológica.....	35
4.2. Caracterização da estrutura do limbo foliar, avaliação da densidade estomática e do tamanho das células-guarda dos estômatos por meio de microscopia.....	39
4.3 Citometria de fluxo.....	41
4.3.1 Preparo da suspensão nuclear	41
4.3.2. Análise em citômetro de fluxo.....	42
4.4. Caracterização molecular	43
4.4.1. Digestão do DNA	44
4.4.2. Preparo e ligação dos adaptadores.....	45
4.4.3. Reações de amplificação	45
4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	47
4.4.5. Revelação do gel.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

5.1 Caracterização morfológica.....	51
6.2 Caracterização Estomática.....	66
5.2 Citometria de fluxo.....	72
5.3 AFLP.....	77
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS.....	104

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as flores tropicais vêm recebendo especial atenção devido às características favoráveis à sua produção em escala como a beleza, exotismo, cores, formas, resistência ao transporte e durabilidade pós-colheita. Apesar do crescimento da base produtiva e a inclusão de novos pólos geográficos regionais na produção de flores ornamentais tropicais, a floricultura empresarial e comercial no Brasil é caracterizada por grandes diferenças nacionais, concentrada nas regiões sudeste e sul, e ascendente no nordeste.

Dentro desta distribuição, a região Norte, apesar de apresentar maior biodiversidade de espécies de plantas e qualidade de hastes florais, contribui com somente 2% da área cultivada com flores e plantas ornamentais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2007). Nesta região, a estrutura de produção de flores ainda é incipiente, onde a maioria das espécies produzidas está distante do grande mercado consumidor, e a experiência e conhecimentos específicos acumulados sobre seu cultivo são poucos ou inexistentes. No Estado do Amazonas especificamente, o setor produtivo de flores e plantas ornamentais é novo, imaturo e em fase de experimentação e consolidação profissional, onde os poucos produtores envolvidos não têm capacitação para o atendimento específico do setor.

Na Região Metropolitana de Manaus, eventos como a Copa do Mundo de 2014 levou as instituições federais, estaduais e municipais, como o SEBRAE, IDAM, CBA e SEPROR, a incentivar o mercado de flores tropicais e com isso houve uma melhora da organização do setor e a criação de três associações de produtores localizadas nos municípios de Presidente Figueiredo (Florati Carpam), Rio Preto da Eva (Flores da Eva) e na capital (Associação de Produtores do Brasileirinho). Mesmo com estes incentivos e com a maior visibilidade para o setor de flores tropicais que eventos de grande porte como este trouxeram para região, a produção insipiente para atender toda a demanda de maneira eficiente; a falta de padronização das flores entre os produtores; e as dificuldades do escoamento da produção, dificultam a aceitação no mercado, principalmente pelas floriculturas da capital que exigem quantidade, qualidade e rapidez na entrega (LOPES; CAVALCANTE, 2013).

Dentro deste panorama regional, e considerando a necessidade de ações consistentes de pesquisa aplicadas ao setor de flores e plantas ornamentais tropicais, em 2009, a Embrapa Amazônia Ocidental coordenou com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), o projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de

tecnologias para a produção de helicônias: novo segmento de mercado para o Amazonas”. Este projeto que teve como objetivo definir critérios para a produção de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink nas condições ambientais do entorno de Manaus, envolvendo estudos agronômicos e biotecnológicos, e tendo como um dos principais produtos gerados, o estabelecimento em campo de população de plantas poliploides que manifestaram precocemente características bastante interessantes e inovadoras para esta espécie.

Considerando a importância das helicônias e o crescimento econômico que o mercado de flores tem apresentado frente a economia nacional, torna-se necessária a realização de estudos mais detalhados sobre estes genótipos de *Heliconia chartaceae* var. Sexy Pink, para que se possa caracterizar este material a fim de que se consiga identificar possíveis genótipos promissores comercialmente e adaptados às condições ambientais de Manaus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Determinar as características morfológicas, fisiológicas, molecular e produtivas de interesse comercial de plantas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink obtidas por poliploidização induzida.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar de aspectos morfológicos de pseudocaule, folhas e inflorescências;
- Determinar do tamanho e da densidade de estômatos foliares;
- Determinar o conteúdo de DNA por citometria de fluxo;
- Caracterizar diversidade genética entre os genótipos utilizando marcador molecular AFLP.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O setor de floricultura brasileiro, caracterizado pelo conjunto de atividades produtivas e comerciais relacionadas ao mercado de espécies vegetais cultivadas com finalidades ornamentais, vivenciou um período de constante crescimento nas exportações, chegando a atingir um crescimento acumulado de 515% no período de 1992 a 2008 (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - MDIC e do Instituto Brasileiro de Floricultura - IBF). O crescimento observado neste período pode ser atribuído principalmente em função da evolução dos indicadores socioeconômicos, das melhorias no setor produtivo e da expansão da cultura do consumo de flores e plantas como elementos expoentes de qualidade de vida, bem-estar e reaproximação da natureza (SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2017).

A partir de 2008 com o início da crise econômica e financeira nos principais mercados importadores internacionais, houve uma queda nas exportações de flores, evidenciando que no período de 1992 a 2008, o País viveu um processo ininterrupto de crescimento obtenção de recordes sucessivos nos embarques de flores e plantas para o exterior, tendo elevado seus resultados de US\$ 11,97 milhões, em 2000, para 35,5 milhões, em 2008 (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

Em 2009 o valor da exportação do grupo de flores de corte decresceu drasticamente (-134,5%) em relação ao ano anterior, enquanto aumentava o seu valor de importação (+50,2%), um indicativo de que os exportadores brasileiros de flores de corte estão perdendo espaço no mercado internacional, pelo fato de ser uma perda observada nos anos seguintes (KIYUNA et al. 2011)

Em 2013, os resultados das exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais confirmaram o ciclo de retração recentemente experimentado pela floricultura nacional, decaindo 8,43% em relação ao total vendido ao exterior em 2012, e fechando o ano no valor global de US\$ 23,81 milhões (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

As perdas só não foram mais acentuadas devido a várias ações favoráveis, entre as quais cabe destacar a disponibilidade de terras agricultáveis, com suas grandes extensões e boas condições edafoclimáticas, do baixo custo de produção e da presença de empreendedores e de tecnologia tropical, os esforços promocionais, técnicos e organizacionais alcançados pelo Flora Brasiliis – Programa Brasileiro de Exportação de Flores e Plantas Ornamentais, que

resultou de parceria entre a Agência de Promoção de Exportações e Investimentos – APEX – BRASIL e órgãos de representação setorial dos produtores e exportadores no setor da floricultura, como o Ibraflor e o Instituto Agropólos do Ceará, além de empresários de diferentes regiões do País (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

Outro fato que tem garantido uma relativa suavidade no processo decrescente das vendas no mercado mundial são as características estruturais do setor exportador da floricultura brasileira – qual seja o de se concentrar essencialmente na comercialização de material de propagação vegetal destinado a produtores internacionais de flores e plantas e não diretamente à venda para consumidores finais.

As flores frescas de corte em geral por serem produtos destinados ao consumo final e, portanto, mais sujeitos aos efeitos da crise internacional, vêm apresentando as maiores perdas econômicas comparadas aos bulbos, rizomas, tubérculos e similares, destinados à propagação vegetativa no período de 2010 a 2013. De fato, enquanto em 2010 as vendas internacionais de flores frescas atingiram US\$ 627,514 mil, dois anos depois, em 2012, esse valor foi reduzido a menos da metade (US\$ 298,761 mil) e, em 2013, caiu ainda mais, para apenas US\$ 138,549 mil (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

No Brasil, o maior consumo da floricultura encontra - se no mercado interno, representando 97,54% de sua comercialização setorial. Embora voltada em grande parte para o consumo interno, a floricultura brasileira tem mostrado potencial para o desenvolvimento da economia do país, tendo permanecido em crescimento, mesmo durante a crise econômica mundial no período de 2008 a 2010 (JUNQUEIRA; PEETZ, 2010). Apesar da dificuldade na obtenção de informações oficiais sobre a dimensão deste mercado, devido à existência da produção e comércios informais, dados baseados em grupos como Veiling Holambra, Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) e Centrais de Abastecimento de Campinas S.A. (CEASA Campinas) afirmam que a floricultura brasileira movimenta anualmente US\$ 1,3 bilhão, com consumo per capita de US\$ 7,00/ano (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

Mesmo com a crise, o mercado floricultor apresenta um grande potencial de crescimento para a economia brasileira (JUNQUEIRA; PEETZ, 2010), o que tem gerado aumento de investimentos vindos dos governos estaduais e instituições privadas em pesquisas, programas e feiras, visando a uma maior produtividade e qualidade dos produtos oferecidos

(MOTOS, 2000; OLIVEIRA; BRAINER, 2007). Nos últimos anos, o faturamento do setor vem crescendo significativamente. Foram faturados R\$ 5,7 bilhões em 2014, R\$ 6,2 bilhões em 2015 e, em 2016, o mercado de flores apresentou um crescimento de 6%, empregando quase 200 mil trabalhadores e com faturamento de R\$ 6,65 bilhões. (AKI, 2016; PRIA, 2016).

O cultivo de flores tropicais no Brasil é realizado, principalmente, nos estados de Pernambuco, Alagoas, Ceará, Bahia, Sergipe, Pará, Amazonas, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal. Na região Nordeste destacam-se os estados de Pernambuco, Alagoas e Ceará que atuam como principais exportadores de flores tropicais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Esta peculiaridade pode ser explicada pelas condições climáticas favoráveis e pela facilidade de exportação aliada a proximidade em relação a posição geográfica dos centros consumidores como a Europa e os Estados Unidos (BEZERRA, 1997). As flores tropicais possuem uma beleza exótica, diversidade de formas e cores, assim como resistência ao transporte e durabilidade pós-colheita, refletindo no aumento do interesse do mercado interno e externo (LOGES et al., 2005).

Nos últimos anos, algumas ações têm sido desenvolvidas na região norte pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) com o objetivo de suprir em parte as dificuldades na organização deste setor, mas que tiveram resultados insatisfatórios frente à falta de capacitação dos poucos técnicos específicos do setor de floricultura e a inexistência de tecnologias geradas e/ou adaptadas para as condições amazônicas de produção. Considerando que parte das tecnologias aplicadas na produção brasileira de flores é trazida de outros países, as pesquisas com plantas ornamentais tropicais são escassas, principalmente com as espécies nativas, tal como helicônias amazônicas. Estas plantas apresentam grande potencial de crescimento no mercado floricultor, mas as informações sobre o seu cultivo e manejo pós-colheita são ainda reduzidas, mesmo para aquelas mais valorizadas, como a *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink.

3.1. Helicônias

Dentre as diversas flores tropicais, as helicônias vêm mostrando um grande poder de mercado, por pertencerem a um dos grupos mais vistosos de plantas herbáceas das florestas

tropicais, apresentando uma ampla variação de caracteres florais, bem como grande distribuição nos trópicos e adaptação ao cultivo (BERRY; KRESS, 1991).

O nome helicônia é uma alusão ao monte Helicon na Beócia, sul da Grécia, onde a mitologia diz ser a casa do Deus Apolo e das Musas (CRILEY; BROCHAT, 1992). A maioria das espécies pode ser encontrada em regiões encharcadas ou úmidas, embora algumas ainda sejam encontradas em áreas sazonalmente secas. Seu florescimento se dá em regiões de planícies tropicais úmidas, em habitats florestais, enquanto muitas espécies florescem bem em locais abertos como estradas, áreas de rio ou em pequenas áreas abertas em florestas (MAROUELLI, 2009).

O gênero *Heliconia* foi inicialmente inserido na família Musaceae por possuir semelhanças com este grupo, no entanto, a existência de algumas diferenças em relação às Musaceae, como ausência de laticíferos (que quando presentes são articulados), diferenças na anatomia de suas raízes, nas folhas, flores bissexuais, entre outras características, fizeram de *Heliconia*, o único componente da família Heliconiaceae (NAKAI, 1941).

Ambas as famílias são pertencentes à ordem Zingiberales (Figura 1) a qual inclui, além das Heliconiaceae e Musaceae, outras seis famílias de monocotiledôneas (Zingiberaceae, Lowiaceae, Cannaceae, Maranthaceae, Strelitziaceae e Costaceae), caracterizadas por possuírem folhas grandes com venação transversa em suas lâminas, grandes pecíolos e inflorescências grandes com brácteas geralmente coloridas (BERRY; KRESS, 1991). Essas famílias estão divididas em dois grupos, o grupo das bananas (Musaceae, Lowiaceae, Heliconiaceae e Strelitziaceae), o qual é parafilético basal ancestral, e o grupo monofilético dos gengibres (Zingiberaceae, Cannaceae, Maranthaceae e Costaceae) (KRESS et al., 2001).



Figura 01: Evolução da ordem Zingiberales. Fonte: Smithsonian National Museum of Natural History.
 Fonte: <http://botany.si.edu/zingiberales/>

Com base em uma Análise de Dispersão e Vicariância (DIVA, *Dispersion and Vicariance Analysis*), combinada com uma técnica de relógio molecular, foi proposto que as Zingiberales originaram - se por volta de 124 milhões de anos atrás e sua diversificação ocorreu há cerca de 110 milhões de anos, durante o período Cretáceo (KRESS; SPECHT, 2006). A família Heliconiaceae divergiu da linhagem ancestral por volta de 109 milhões de anos, juntamente com as famílias Strelitziaceae e Lowiaceae, que indica uma rápida diversificação da linhagem principal. Porém, o processo de especiação das helicônias é mais recente e vem ocorrendo nos últimos 32 milhões de anos (KRESS; SPECHT, 2006).

Conhecidas como bananeira-de-jardim, falsa-ave-do-paraíso e paquevira, atualmente existem registros no *Index Kewensis* de mais de 250 binômios específicos para o gênero *Heliconia*. Porém, devido à grande variedade de flores e colorações até mesmo dentro de espécies, muitos taxonomistas encontram dificuldades em estabelecer uma classificação precisa para espécies e subespécies (CASTRO, 1995).

Com base em dados publicados, Castro et al. (2007) propuseram a existência de 182 espécies, subdivididas em cinco subgêneros e 23 seções, as quais permaneceram com mesma subdivisão em estudos realizados com marcadores de RAPD por Maruoelli et al. (2009). Dessas espécies, 176 encontram-se na região neotropical, do norte do México ao sul do Brasil (SANTOS, 1977; CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; BERRY; KRESS, 1991) em

altitudes ao nível do mar até 2.000 metros, enquanto seis distribuem-se no pacífico, em altitudes de até 500 metros, estando o maior número com ocorrência na Colômbia (94), seguido do Equador (60), Panamá (56), Costa Rica (47), Brasil (37), Peru (32), Venezuela (26), Nicarágua (22), Guatemala (16), Bolívia (15), Honduras e México (14) e Suriname (13) (Figura 2) (KRESS, 1990; BERRY; KRESS, 1991; CRILEY; BROCHAT, 1992).

Apenas um pequeno grupo paleotropical, com aproximadamente seis espécies, é encontrado nas Ilhas do Pacífico (BERRY; KRESS, 1991). O centro de diversidade do gênero abrange a região dos Andes e se estende até o sul da América Central (ANDERSSON, 1989).



Figura 2: Distribuição do gênero *Heliconia*, regiões destacadas em vermelho correspondem à presença deste gênero.

Fonte: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb>

3.1.1. Descrição botânica e classificação taxonômica

As helicônias pertencem à família Heliconiaceae e gênero *Heliconia*. O nome do gênero foi estabelecido por Linnaeus, em 1771.

Embora existam controvérsias entre diferentes autores, são classificadas mais de 250 espécies de helicônias, além de serem conhecidos alguns híbridos naturais e formas distintas de uma mesma espécie (LAMAS, 2002).

As helicônias são plantas herbáceas, eretas, perenes, com rizomas simpodiais. Seus pseudocauls são formados por justaposição dos pecíolos ou lâminas foliares com diferentes comprimentos e formas, podendo chegar a doze metros de comprimento, apresentando a

lâmina foliar em geral oblonga pontuda. Suas folhas são dísticas, apresentam uma folha por nó, com bainhas longas basais e um longo e expandido pecíolo (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; CASTRO, 1995).

De acordo com o arranjo básico de suas folhas, elas podem ser classificadas como: (A) musóides, com folhas verticalmente orientadas, longos pecíolos e um hábito de crescimento como as bananeiras; (B) canóides, com pecíolos de comprimento curto ou médio, posicionado obliquamente em relação à haste, ou (C) zingiberóides, com lâminas com pecíolo curto, dispostas na horizontal em relação à haste (Figura 3) (BERRY; KRESS, 1991).

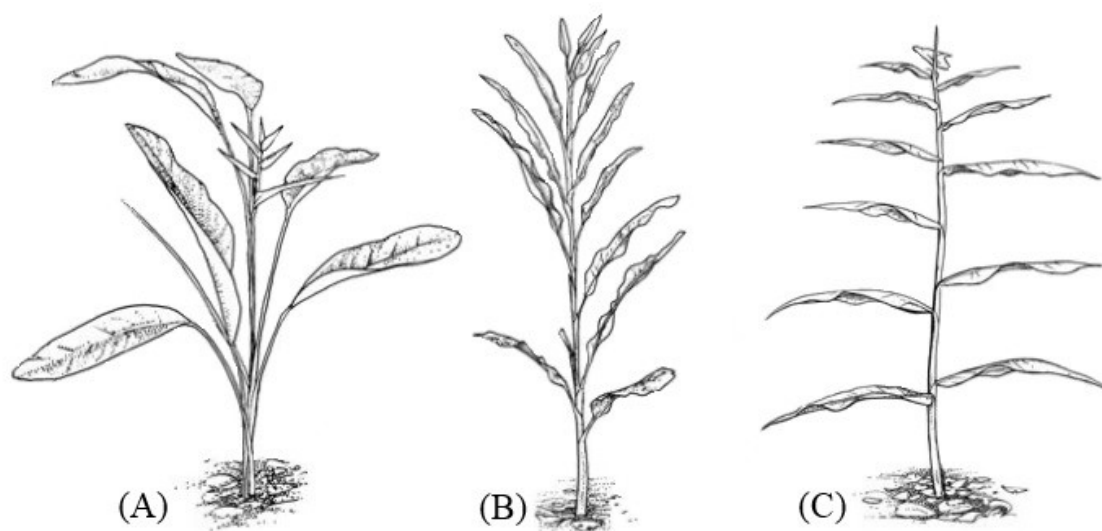


Figura 3: Hábitos de crescimento de plantas de *Heliconia*: (A) Musóide, (B) Canóide e (C) Zingiberóide, segundo Arruda (2008).

As inflorescências são terminais, divididas em dois grupos: as eretas, com suas brácteas retas apontando para cima, e as pendentes, com brácteas penduradas apontando para baixo. São formadas pela reunião de brácteas normalmente grandes, de cores fortes e atrativas, côncavas, unidas através da ráquis, organizadas em padrão alternado ao longo de uma espessa haste, as quais podem possuir uma orientação dística ou em espiral (Figura 4) (SIMÃO; SCATENA, 2004; SHEELA, 2008).

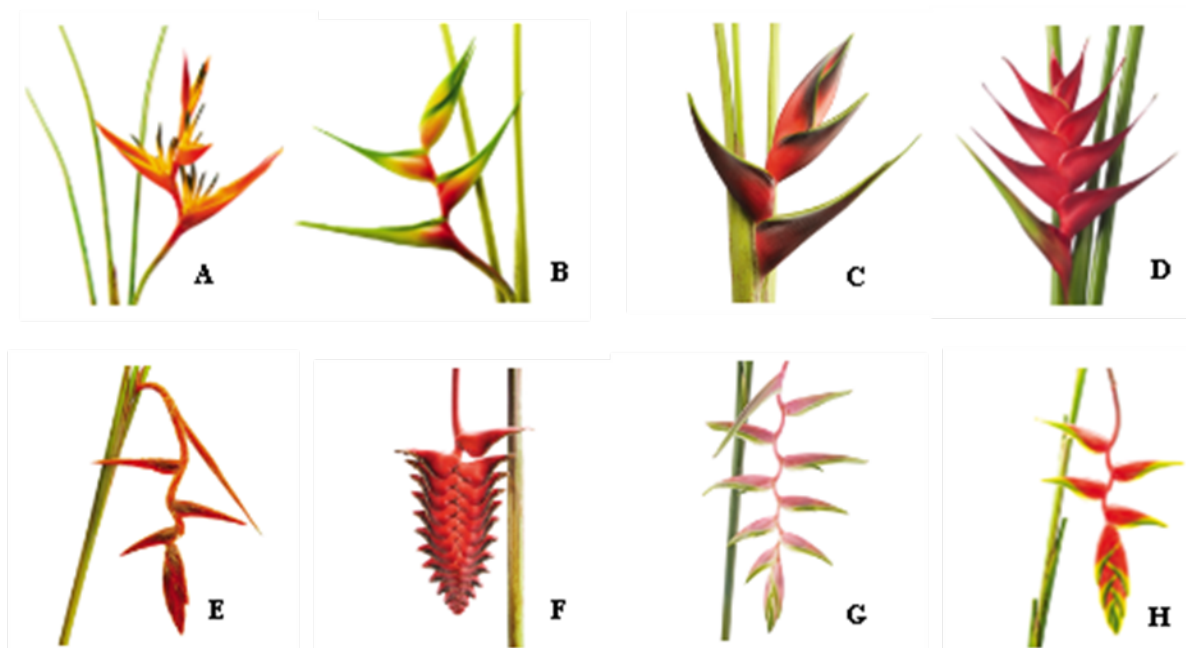


Figura 4: Disposição das inflorescências de algumas *Heliconias*. Eretas: (A) *H. psittacorum*; (B) *H. bihai*; (C) *H. orthotricha*; (D) *H. caribaea*. Pendentes: (E) *H. vellerigera*; (F) *H. mariae*; (G) *H. chartacea* e (H) *H. rostrata*.

Fonte: <http://www.heliconias.net/flores-heliconias.html>

As flores são hermafroditas, zigomorfas, envolvidas pelas brácteas podendo ter o formato curvo, parabólico ou sigmoidal, estando o nectário localizado na base. As flores ainda podem estar bem visíveis e eretas nas brácteas ou bem escondidas, sendo vista apenas uma parte de sua extremidade, dependendo da espécie. Seu androceu é constituído por cinco estames férteis e um estaminódio. O ovário é ínfero, trilocular e possui um óvulo sub-basal simples em cada lóculo. Os frutos são do tipo baga possuindo até três sementes (CRILEY; BROCHAT, 1992; CASTRO, 1995; DAHLGREN et al., 1985).

A polinização das flores é normalmente realizada por beija-flores, tendo sido observadas algumas espécies do pacífico com polinizações por morcegos (PEDERSEN; KRESS, 1999; TAYLOR; WHITE, 2007). As inflorescências permanecem viáveis por 40 a 200 dias provendo um grande insumo de néctar, de cerca de 30-69 μL por flor, embora cada flor dure apenas um dia (DOBKIN, 1984).

Os frutos podem ser brancos, cremes, amarelos ou laranjas, tornando-se azulados após o amadurecimento. Devido a uma maior facilidade, sua propagação é preferencialmente vegetativa, a partir do cultivo de seu rizoma ou pelo plantio de perfilhos laterais, sendo rara a propagação por meio de sementes uma vez que possui uma germinação lenta, o que no geral a

torna inviável, sendo necessária a aplicação de técnicas que acelerem seu desenvolvimento (BERRY; KRESS, 1991; PAIVA, 1998).

3.1.2. *Heliconia chartacea* var. **Sexy Pink** – segundo Mosca et al. (2004).



Figura 05. *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. **Sexy Pink**.

Esta variedade floresce á partir dos seis meses e mantém sua floração durante o ano todo com altura que pode variar de 1,98 a 5,28 m, dependendo do local de cultivo. Seu plantio pode ser conduzido desde 50% de sombra até completa exposição ao sol, e seu hábito de crescimento é musóide. Está distribuída desde as Guianas à bacia Amazônica, Flórida, Havaí, Barbados e Costa Rica.

As brácteas variam de 4 a 28, nas quais a base e 2/3 da porção proximal “bochechas” e quilha são róseos com uma linha fina verde marcando as bordas e a ponta. A haste possui uma coloração de laranja a amarelo. As sépalas são de cor laranja na porção distal e em 2/3 da porção proximal amarelo-clara. O ovário possui uma cor laranja-clara, pedicelo cor amarelo-claro.

Podem ser cultivadas em pleno sol ou em locais com sombreamento entre 30 e 50%, sendo indicado para compor o sombreamento devem-se plantar de forma intercalada árvores para esta finalidade. As espécies mais recomendadas são: gliricidia (*Gliricidia sepium*),

sombrero (*Clitoria racemosa*), samam (*Pithecolobium saman*); ingá (*Inga* spp); ou qualquer outro tipo de árvore que não venha competir por nutrientes e luminosidade com as helicônias. A faixa de temperatura ideal oscila entre 21 °C noturna e 26 °C diurna, com umidade relativa do ar entre 60 e 80 % (KRESS et al., 1999).

3.2. Propagação das helicônias

As helicônias são plantas que podem ser propagadas sexuadamente via semente ou assexuadamente. A propagação sexuada de helicônia é limitada, sendo que o tempo de desenvolvimento da planta pode demorar de um a dois anos (LAMAS, 2004), pois o fruto apresenta um endocarpo duro que dificulta a germinação das sementes. Esta limitação pode ser contornada pela utilização da técnica de resgate de embriões zigóticos, que propicia uma propagação rápida, recuperação de plantas livres de doenças, conservação e intercâmbio de germoplasma, introdução de germoplasma como semente botânica e a superação da dormência de sementes (TORRES et al., 2005).

Na propagação assexuada ou por via vegetativa ocorre a divisão do rizoma e emissão de brotações à superfície, podendo ser solitárias ou agregadas (MOSCA et al., 2004). Esse método tem a desvantagem de poder conduzir à disseminação e ao acúmulo de agentes causais de doenças que são transmitidas e intensificadas entre plantios sucessivos, via rizomas contaminados (TORRES et al., 2005). Para minimizar esse risco, é necessária a utilização de ferramentas bem afiadas, salientando-se que o procedimento de desinfecção das ferramentas, entre o uso de uma touceira para outra, deve ser observado, e que antes de transplantar os rizomas devem ser desinfetados com inseticida, nematicida, fungicida e bactericida ou banhado em solução de hipoclorito de sódio. Esta prática contribui para se evitar possíveis danos com nematóides, insetos, fungos e bactérias.

No método comercial, segundo Criley, 1988, as plantas matrizes, que irão fornecer os rizomas, devem apresentar características tais como: produtividade, vigor e sanidade. Um rizoma ideal é aquele que tem pelo menos três gemas e, dependendo da época do ano, pode ser plantado diretamente no campo ou em sacos plásticos, sendo preferencialmente sob irrigação e sombreamento entre 30 e 60%, para facilitar o enraizamento (LAMAS, 2004).

Atualmente, a propagação por culturas de meristemas é a forma mais adotada na

multiplicação de plantas em larga escala, para fins comerciais. Neste tipo de multiplicação, também conhecida por micropropagação, clonagem ou cultura de tecidos, as novas plantas são obtidas a partir de um grupo de células (meristema). A principal vantagem desse tipo de propagação é a obtenção de mudas uniformes, com alta qualidade, em grande quantidade, num tempo relativamente curto e total ou parcialmente livre de doenças. Portanto, a micropropagação possibilita a obtenção de plantas em quantidade e qualidade, de maneira a atender um mercado consumidor crescente e, cada vez mais exigente (PAULA, 2000).

3.3. Indução e identificação de variabilidade genética em plantas

A variabilidade genética refere-se às variações dos genes entre indivíduos de uma população e determina o seu conjunto de características morfológicas e fisiológicas, tornando-os capazes de se adaptar às mudanças ambientais. Tem origem através de mutações e recombinações gênicas, sendo a matéria prima sobre a qual a seleção natural atua e corresponde a qualquer alteração no material genético de um organismo, sendo sua preservação também de grande interesse ao mercado floricultor, uma vez que uma maior variabilidade acarretaria, numa maior capacidade de adaptação e de possíveis alterações morfológicas nos indivíduos em questão.

Para que possa ser feita a caracterização e confirmação da variabilidade genética em indivíduos submetidos a algum processo de duplicação cromossômica, é necessário a determinação do nível de ploidia, podendo ser utilizados métodos diretos, como a contagem do número de cromossomos em células mitóticas e meióticas (GUERRA, 1989; VILLA, 1995). Contudo, este tipo de análise é um procedimento laborioso e demorado, que exige muita técnica e conhecimento, sendo praticamente inviável quando se possui um grande número de amostras a serem quantificadas (VILLA, 1995; MAGALHÃES et al., 1996; SARI et al., 1999). Para estes casos, métodos indiretos podem ser utilizados para identificação do nível de ploidia como a caracterização morfológica e citoanatômica, que possibilitam o estudo das alterações estruturais como diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos foliares.

Dentre os métodos indiretos, a análise estomática é a mais citada na literatura para inferir o número de ploidia em plantas submetidas a indução de poliploidia (VILLA, 1995; MAGALHÃES et al., 1996; SOUZA; QUEIROZ, 2004). Porém, vários autores enfatizam que

os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos quando se trata do nível de ploidia sendo necessário análises complementares (MAGALHÃES et al., 1996; SARI et al., 1999; SOUZA; QUEIROZ, 2004).

A indução de variabilidade genética é um processo de melhoramento que se faz necessário para o setor da floricultura para que o mesmo possa se manter competitivo no mercado internacional. Isso se faz necessário pois o processo de melhoramento genético que é uma ciência voltada à obtenção de genótipos vegetais superiores aos atualmente utilizados sob determinadas condições ecológicas, vem como uma ferramenta para aprimorar os processos de produção já existentes.

O melhoramento consiste na seleção de genótipos considerando-se a variabilidade genética existente ou através de cruzamentos entre indivíduos a fim de se obter uma população com genótipos superiores, ou ainda com a indução à poliploidia, que pode ser definida pelo aumento no número de conjuntos cromossômicos ou genomas de uma espécie, sendo denominadas como poliploides àquelas plantas com três ou mais conjuntos cromossômicos completos (WRIGHT, 1976), e assim elevar o valor econômico da espécie.

Uma forma de se obter plantas poliploides é por meio da indução artificial de poliploidia, com uso de colchicina ou de outros agentes poliploidizantes como a orizalina ou o ácido nitroso (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). A descoberta de agentes poliploidizantes, como a colchicina, e da capacidade deste agente em provocar alterações em componentes envolvidos no ciclo celular e indiretamente no material genético de diversos indivíduos e por consequência, refletindo na morfologia, despertou o interesse de geneticistas e de agricultores, visando a sua utilização para o melhoramento vegetal (DIXON; MALDEN, 1908; EIGSTI, 1938). Seguindo esta vertente, vários processos de indução de mutações artificiais foram desenvolvidos, visando acelerar o processo de mutação nos organismos, e consequentemente aumentar a variabilidade genética e aprimorar o processo de melhoramento vegetal (VAN HARTEN, 1998).

Diversas cultivares vegetais que apresentam características de alta qualidade aos diversos ramos do mercado agricultor têm sido desenvolvidas através do uso da colchicina (EIGSTI; DUSTIN, 1955; SLEPER; POEHLMAN, 2006). Como exemplos, podem ser citadas plantas com características de resistência a adversidades ambientais, *Ziziphus*

mauritiana resistente ao estresse hídrico (NTULI; ZOBOLO, 2008), assim como variedade de flores e plantas ornamentais, *Dendrobium nobile* (UNEMOTO et al., 2009), *Oncidium flexuosum* (VICHATO et al., 2007), *Heliconia bihail* (CAVALCANTE FILHO, 2011).

3.4. Poliploidia via processos indutores artificiais

A poliploidia pode ocorrer na natureza em decorrência de um erro meiótico, gerado a partir da não redução do número cromossômico e produção de gametas com números cromossômicos de células somáticas ou pela endomitose ocorrida em células precursoras da meiose. Neste último caso, células com genoma duplicado entram na fase de mitose, que ocorre de forma incompleta, não havendo o rompimento da carioteca, nem a divisão celular, o que produzirá células poliploides as quais, passarão ao processo de meiose (LEE et al., 2008).

Processos de indução artificial de poliploidização também podem ser realizados visando a junção de núcleos, através da fusão de protoplastos, ou com uso de agentes químicos capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo mitótico, alterando sua via padrão como representado na Figura 6. As plantas poliploides produzidas por estes processos, normalmente apresentam características superiores às plantas matrizes e desta forma gerando grande interesse sobre o material produzido. Devido à baixa frequência da poliploidização natural, o uso de técnicas de indução artificial tem crescido nos programas de melhoramento genético, levando a um aprimoramento das técnicas (DHOOGHE et al., 2010).

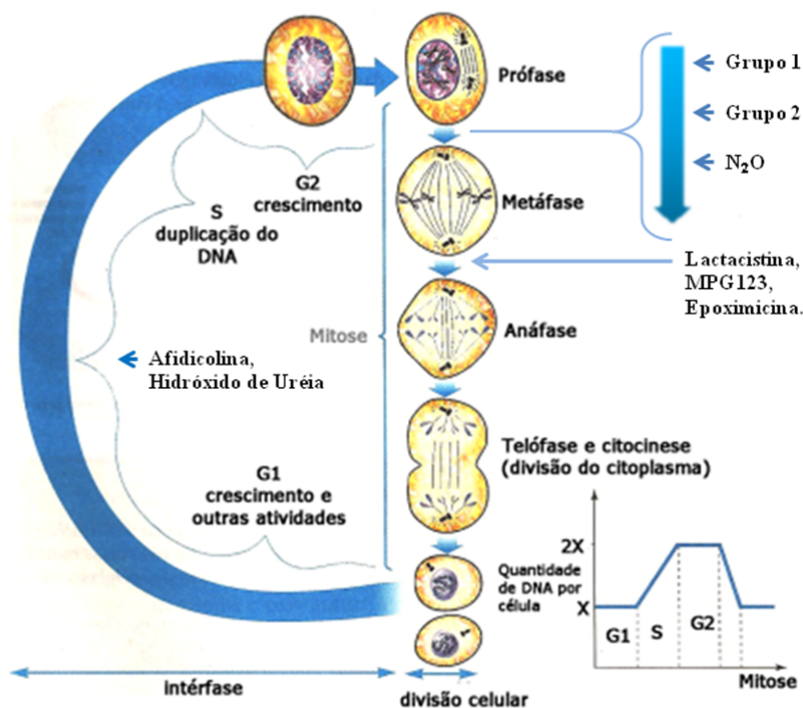


Figura 6: Diferentes pontos de ação de agentes antimitóticos no ciclo celular vegetal. Grupo 1: colchicina, colcemida, vimblastina, acenaftano, dintroanilinas, fosfoamidatos, piridinas, benzamidas, e ácido benzoico. Grupo 2: carbanatos.
Fonte: Baseado em Dhooghe et al. (2010).

Um dos agentes químicos mais utilizados na promoção da poliploidização é a colchicina, que é um alcalóide responsável por bloquear a divisão celular na metáfase e induzir a duplicação do número de cromossomos, gerando uma divisão celular incorreta que produz células com diferentes níveis de ploidia. Estas células podem ter seu número cromossômico multiplicado, produzindo indivíduos poliploides, que irão possivelmente apresentar características diferentes do material doador (EIGSTI; DUSTIN, 1955; DHOOGHE et al., 2010).

O efeito da colchicina está relacionado a sua capacidade em ligar-se aos dímeros de tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos e consequentemente das fibras do fuso, importantes para a migração dos cromossomos aos pólos da célula durante a mitose (DHOOGHE et al., 2010). Extraída de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* L. (Liliaceae), esta substância teve seus primeiros relatos apresentados no “Ebers papyrus”, um documento egípcio preparado por volta de 1550 a.C., com sua utilização para tratamento de reumatismo e especialmente da gota. Apesar de seu amplo uso, a colchicina apresenta elevada toxicidade ao ser humano, e quando usada in vitro em altas concentrações, apresenta elevada

fitotoxicidade, podendo acarretar em aumento da frequência de mixoploidia nas plantas regeneradas (VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; YEMETS; BLUME, 2008).

Plantas submetidas ao tratamento com colchicina, se bem sucedido, apresentam um aumento no número cromossômico que, em geral, é refletido pela célula, através do aumento de seu volume que, por conseguinte, pode ser observado também com o crescimento de alguns órgãos da planta como tamanho das células dos estômatos, densidade de estômatos por área e diâmetro dos grãos de pólen são muito utilizados para identificar poliploides (GRANER, 1940; BREWBAKER, 1952; EVANS, 1955; ARMSTRONG; ROBERTSON, 1960; ELLIOTT, 1967; SILVA et al., 2000; BECK et al., 2003; MORGAN et al., 2003), da mesma forma que o número de plastídios nas células dos estômatos (BINGHAM, 1968; BOAVENTURA et al., 1981).

De acordo com sua origem, indivíduos poliploides podem ser classificados em autopoliploides (originados a partir de células ou indivíduos com um mesmo genoma) ou alopoliploides (originados a partir de células ou indivíduos, com genomas diferentes) (GUERRA, 1989).

Com o desenvolvimento de novas técnicas como o cultivo in vitro e a possibilidade que este oferece no controle dos padrões de cultivo, a poliploidização tornou-se uma técnica mais popular, com o primeiro trabalho in vitro sendo apresentado por Murashige; Nakano (1966). O uso desta técnica para o mercado horticultor tem sido mais frequente uma vez que as alterações são expressas geralmente na morfologia da planta, como o aumento do tamanho de suas folhas e flores, maior intensidade de cor, novas formas e em muitos casos a recuperação da fertilidade de plantas antes estéreis (ESCANDÓN et al., 2005).

Atualmente, encontram-se registradas no banco de dados da FAO/IAEA (2010) variedades de plantas, obtidas a partir de tratamento com colchicina, dentre as quais 18 referiram-se a plantas ornamentais, além dos diversos estudos não registrados neste banco, mostrando a aplicação desta técnica no melhoramento vegetal.

3.5. Poliploidia como ferramenta para o melhoramento genético

A poliploidia pode ser induzida, processo pelo qual se faz a seleção de

genótipos considerando-se a variabilidade genética existente ou através de cruzamentos entre indivíduos a fim de se obter uma população com genótipos superiores e assim elevar o valor econômico da espécie. Porém, para que se possa produzir uma nova cultivar, são necessários vários procedimentos, vários ciclos de avaliação, seleção e recombinação o que torna o processo de melhoramento genético relativamente lento (PINTO et al., 1995; BORÉM; MIRANDA, 2005).

O que se espera, é que as plantas poliploides sejam superiores às plantas diploides numa série de características pelo fato de que as características adaptativas são controladas por numerosos genes que estão distribuídos em vários cromossomos. Isto ocorre porque durante o processo da evolução dos poliploides, o efeito da poliploidia em mutações individuais pode ter pequenas consequências, mas coletivamente, pode dar lugar a características diferentes que estão sob controle de múltiplos genes. Além disso, o aumento do nível de poliploidia pode se constituir numa vantagem adaptativa porque pode mascarar os efeitos de mutações deletérias, já que os poliploides em geral têm um efeito tamponante sobre estas mutações, que seriam silenciadas devido ao maior número de genomas (SIMIONI, 2004).

A associação entre o nível de ploidia e características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliploides, principalmente porque essas características estão relacionadas com o aumento do tamanho das células, como resultantes da poliploidização.

A diversidade de plantas na ordem Zingiberales e a consequente importância econômica de muitas espécies despertam o interesse da criação de novas cultivares, buscando aumentar a variedade e qualidade de seus produtos (BABU; RAVINDRAN, 2005; BERMÚDEZ-CARABALLOSO et al., 2010). Neste sentido, a poliploidização tem sido aplicada em algumas espécies, produzindo materiais com qualidades e com significativo interesse ao mercado, como é o caso das *Musa* spp. (ROUX et al., 2001; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007) e da *Heliconia* sp. (CAVALCANTI FILHO, 2011).

Para o gênero *Heliconia*, família *Heliconiaceae*, indivíduos triploides têm sido reportados para *H. psittacorum* cv. Sassy, cv. Petra e cv. Iris (LEE et al., 1994), no entanto, originados por eventos naturais que ocorrem devido aos isolamentos geográficos, influências ambientais e nutricionais (BERRY; KRESS, 1991). Há apenas um trabalho com *H. bihai* conduzido por Cavalcanti Filho (2011) com a finalidade de indução de poliploidia por meio da aplicação da colchicina, com resultados satisfatórios, porém, devido a importância

econômica que o gênero possui, é muito pouco, e novas pesquisas neste sentido com outras espécies seria de grande utilidade para o uso em programas de melhoramento.

3.5.1. Parâmetros genéticos

O conhecimento dos componentes da variabilidade fenotípica, resultado da ação conjunta dos efeitos genéticos e do ambiente, tem grande importância em programas de melhoramento genético de plantas (HEIKO, 2001; CRUZ, 2005), pois auxiliam na tomada de decisões relacionadas a escolha do método mais apropriado e permitem também determinar os caracteres que devem ser selecionados nas etapas iniciais e avançadas em um programa de melhoramento e o peso que deve ser atribuído a cada caráter, separadamente ou em conjunto (ROSSMMAN, 2001).

Os efeitos ambientais mascaram o mérito genético dos indivíduos; assim, quanto maior a proporção da variabilidade decorrente dos efeitos de ambiente em relação à variabilidade total, maior esforço deverá ser despendido na seleção dos genótipos superiores (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Heiko (2001) afirma que a variabilidade fenotípica pode ser conhecida por meio das estimativas de herdabilidade, dos coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e ambiental, das variâncias genotípicas e fenotípicas, entre outros parâmetros genéticos, que refletem a natureza do material genético e a ação do ambiente, permitindo assim, a predição dos ganhos decorrentes da seleção e a definição das estratégias de melhoramento que devem ser adotadas.

Para que o melhoramento seja eficiente, o conhecimento do controle genético dos caracteres a ser melhorados é fundamental. Para um caráter quantitativo, o controle genético ou base genética, inclui todos os mecanismos genéticos responsáveis pela sua herança, tais como, herdabilidade, repetibilidade, associações genéticas com outros caracteres, interações genéticas com outros ambientes, variação genética aditiva e de dominância (RESENDE et al., 1995). Outra medida de grande importância para o melhorista é a estimativa de correlações genéticas e fenotípicas entre características; por meio delas pode-se conhecer quanto uma característica pode influenciar em outras.

Para o melhoramento genético, as correlações de natureza genética são mais importantes, principalmente quando os caracteres envolvidos possuem herança complexa, ou seja,

governados por vários genes, cada gene com pequeno efeito no caráter e alta participação no ambiente. No estudo desses caracteres, a herdabilidade tem grande importância, porque representa o efeito cumulativo de todos os locos que afetam determinado caráter (MARCHIORO et al., 2003).

3.5.2. Herdabilidade

A herdabilidade (h^2) é um dos parâmetros genéticos mais informativos para o trabalho do melhorista. Este parâmetro fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total. Ela pode ser estimada no sentido amplo (h^2_g) e no sentido restrito (h^2_a). A herdabilidade no sentido amplo considera toda a variação genética aditiva e não aditiva sendo mais importante para o melhorista espécies de propagação assexuada (RAMALHO et al., 1993).

O coeficiente de herdabilidade, tanto no sentido restrito como no sentido amplo, pode variar de zero a um. No caso de $h^2 = 1$, as diferenças fenotípicas entre os indivíduos são causadas unicamente por diferenças genéticas entre os mesmos. Quando $h^2 = 0$, significa que a variabilidade do caráter não tem origem genética e sim ambiental. Neste caso não existe correlação alguma entre valor genético e valor fenotípico da unidade de seleção (ALLARD, 1971).

A herdabilidade no sentido restrito quantifica a importância relativa da proporção aditiva da variância genética, que pode ser transmitida para a próxima geração (BORÉM; MIRANDA, 2005). A herdabilidade varia de acordo com as diversas características agronômicas. Uma das teorias é que as características que se desenvolvem em um curto período estariam menos sujeitas ao ambiente e, dessa forma, apresentariam maior herdabilidade do que as sujeitas a maior período (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Para as helicônias, por serem espécie de ciclo curto, estão menos tempo em campo, sofrendo menos interferência do ambiente e consequentemente redução de mão-de-obra e custo. Sendo assim, a utilização da herdabilidade associada às correlações genéticas, pode auxiliar o melhorista a maximizar seus ganhos no processo de seleção de caracteres quantitativos (MARCHIORO et al., 2003).

Como a herdabilidade é normalmente estimada a partir de uma análise de variância, pode ocorrer erros associados às estimativas de herdabilidade e de outros componentes da variância genética. Sendo assim, as estimativas devem ser avaliadas com cuidado. Existe grande faixa de variação nas estimativas da herdabilidade de um mesmo caráter e que pode ser parcialmente atribuída à amostragem, às diferenças populacionais e às diferenças ambientais (VENCOVSKY, 1970; PESEK; BAKER, 1971; RAMALHO et al., 1993; HEIKO, 2001).

Pela sua importância, a herdabilidade deve ser conhecida para a condução de um programa de melhoramento, e muitas decisões práticas são tomadas em função de sua magnitude. A predição do ganho com seleção antes da sua realização, servindo de subsídio para a definição da estratégia de seleção, é uma utilidade direta do valor da herdabilidade no sentido restrito (FEHR, 1987; RAMALHO et al., 1993; HEIKO, 2001).

O conhecimento da correlação entre caracteres, nos programas de melhoramento genético, é importante quando se deseja fazer seleção simultânea de caracteres ou seleção indireta, principalmente quando o caráter de interesse apresenta baixa herdabilidade, problemas de medição ou de identificação. Neste caso, ao selecionar outro caráter de alta herdabilidade, de fácil medição, de fácil identificação e que apresenta alta correlação com o caráter desejado, o melhorista poderá obter progressos mais rápidos em relação ao uso de seleção direta (CARVALHO et al., 1999).

3.5.3. Análise de Agrupamento

Uma das atividades básicas no processo do conhecimento científico consiste em classificar seres semelhantes ou diferentes em grupos. Dessa forma, a identidade pode ser firmada de acordo com suas características. Existem vários métodos de agrupamento que podem criar grupos similares ou distintos, o que se deseja na escolha do melhor método é que os grupamentos sejam homogêneos e relacionados através de coeficientes de similaridades ou de correspondências (VASCONCELOS et al., 2007).

A análise de agrupamento é composta por um conjunto de técnicas estatísticas cujo propósito é classificar os dados, unindo-os pelas semelhanças ou pelas diferenças, de acordo com o contexto. Os elementos de um mesmo grupo devem ser o mais semelhante possível

entre si, enquanto a diferença entre os grupos deve ser a maior possível (FERNAU; SAMSON, 1990). A distância entre indivíduos é normalmente determinada pela distância euclidiana ou pelo coeficiente de correlação, muito comumente utilizados em estudos geofísicos (GONG; RICHMAN, 1995). Os métodos de agrupamento mais utilizados são os hierárquicos e os de otimização.

A maioria dos estatísticos considera a análise de agrupamento como um conjunto de técnicas que permitem dividir os dados, que normalmente apresentam componentes com observações multivariadas (KRZANOWSKI; MARRIOTT, 1995). Segundo Bertan et al. (2006), nos métodos hierárquicos os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, estabelecendo um dendrograma, sem preocupação com o número ótimo de grupos. Dentre os principais métodos de agrupamento hierárquicos então: o método do vizinho mais próximo; o método do vizinho mais distante; o método da variância mínima de Ward e o método o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

As técnicas de análises multivariadas avaliam simultaneamente um conjunto de características, considerando as correlações existentes e permitindo que sejam feitas inferências sobre o conjunto de características em um nível de significância conhecido (SAKAGUTI, 1994). Desse modo, as análises multivariadas são de grande importância em experimentos que envolvem elevado número de variáveis. Vários métodos multivariados podem ser aplicados na predição de divergência genética. Os métodos aglomerativos diferem dos restantes, em função de depender de medidas de dissimilaridades estimadas previamente, como a distância Euclidiana ou a distância generalizada de Mahalanobis, dentre outras (CRUZ; REGAZZI, 2004).

Já a análise de componentes principais é uma técnica estatística poderosa que pode ser utilizada para redução do número de variáveis e para fornecer uma visão privilegiada do conjunto de dados, fornecendo as ferramentas adequadas para identificar as variáveis mais importantes no espaço das componentes principais (MOITA NETO, 2004), esta técnica baseia-se apenas nas informações individuais de cada genótipo, sem a necessidade de dados com repetições (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

No método de Tocher adota-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridades dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos (CRUZ; REGAZZI, 2004; RAO, 1952). Também chamado de método de

agrupamento por otimização (CRUZ; CARNEIRO, 2006), constitui um método de agrupamento simultâneo, separando os genótipos de uma só vez, formando grupos.

Cruz; Regazzi (2004) afirmam que as técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo, ainda, dividir um grupo original de observações em vários grupos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade. Adicionalmente, Ribeiro Junior (2001) relata que a análise de agrupamento tem por objetivo reunir, segundo algum critério de classificação, um conjunto de t unidades amostrais (tratamentos, progenitores, indivíduos, etc.) em grupos através da avaliação de p variáveis, de forma que exista homogeneidade dentro de cada grupo e heterogeneidade entre eles.

O conhecimento das dissimilaridades entre variáveis pode atender objetivos em futuros programas de melhoramento genético, pois propiciam informações acerca do grau de semelhança ou de diferença entre dois ou mais genótipos. O emprego de métodos que agrupem os genótipos pode ser uma das principais alternativas para analisar e compreender os dados (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

O método da ligação média entre grupos (UPGMA) tem sido muito utilizado para estudos de diversidade genética, tendo como vantagem sobre os demais métodos o fato de considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, evitando caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os indivíduos considerados (CRUZ et al., 2004), como ocorre com os métodos do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante. Outra vantagem deste método é que ele produz menor distorção na representação das similaridades entre indivíduos de um dendrograma (SOKAL; ROHLF, 1962). O método UPGMA tem sido utilizado em estudos de divergência genética de diversas culturas, tais como gergelim (ARRIEL et al., 2006), goiabeiras (GOMES FILHO et al., 2010), e pimentas (FARIA et al. 2012).

3.5.4. Divergência genética em recursos vegetais

Nass (2007) afirma que o conhecimento da variabilidade genômica em espécies vegetais e como ela se apresenta, contribui para o uso racional e sustentável dos recursos genéticos nativos e/ou naturalizados.

Com a crescente visibilidade que as flores ornamentais tropicais ganharam nos últimos anos, e a crescente busca pelo lançamento de novas variedades e de características comercialmente impactantes, diversos setores da pesquisa vem despertando a sociedade para estudos e conservação de recursos vegetais para manutenção da variabilidade genética e para evitar a perda de algumas espécies de plantas e seu impacto negativo sobre os valores ambientais e socioeconômicos que essas perdas acarretariam. As estimativas de divergência entre genótipos de plantas ou populações que são utilizadas para quantificar a variabilidade em germoplasmas, além de fomentar o conhecimento das relações filogenéticas, permitem identificar, caracterizar e avaliar o nível de dissimilaridade entre diversos indivíduos.

Quando se realiza trabalhos com plantas que apresentam elevado valor de mercado como a *H. chartacea*, a quantificação da similaridade genética torna-se um importante parâmetro a ser utilizado para conservação e aprimoramento dessas plantas. Este parâmetro pode ser embasado em uma série de particularidades, provenientes de dados moleculares, morfo-agronômicos, biométricos e sobre o desempenho produtivo em uma determinada região. Esta abordagem de estudo que considera a combinação de várias características, tem-se mostrado mais eficiente na identificação e seleção de materiais mais promissores (CLEMENT, 2012 apud BLIND, 2016). No Brasil a maioria dos estudos genéticos com espécies pouco conhecidas baseia-se na importância econômica, ou seja, nos dados quantitativos, o que torna o melhoramento menos eficiente.

Em helicônias, diversas técnicas moleculares ou descritivas são empregadas para caracterização da variabilidade genética de modo adequado, com finalidades de subsidiar programas de melhoramento e vistas ao uso agronômico (ARRUDA, 2008; GIRALDO, 2014; KUMAR et al., 1998; PEREIRA, 2012).

3.5.5. Marcadores moleculares

Os avanços na biologia molecular têm dado oportunidade de explorar a diversidade vegetal através do uso de marcadores moleculares, pois permitem detectar polimorfismos na molécula de DNA, cobertura do genoma de modo eficiente, tempo reduzido e não possui interação ambiental. Esses avanços só foram possíveis devido ao surgimento do DNA recombinante e a amplificação da molécula de DNA, por *Polimerase Chain Reaction* (PCR),

o que evidenciou ainda mais a potencialidade do uso de marcadores, e com isto, levando ao aprimoramento das técnicas de detecção do polimorfismo diretamente no DNA.

Dentre as técnicas mais utilizadas, por motivos de confiabilidade, particularidades e vantagens de aplicação, o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), o *Sequence-Characterized Amplified Regions* (SCAR), o *Restriction Fragment Length Polymorphism DNA* (RFLP), e Microssatélites permitem, quantificar o DNA genômico, e predispor a variabilidade de polimorfismo existente (VOS et al., 1995). Estes sinalizadores de polimorfismo baseiam-se nas alterações elementares da molécula de DNA, que são abundantes em genomas de plantas alógamas, isto é, ocorre mais variação nas bases nitrogenadas da cadeia (Adenina, Citosina, Timina e Guanina) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os métodos mais sensíveis, rápidos e relativamente simples de revelar diversos locos que estão dispersos pelo genoma são o *AFLP* e *RAPD*, pois não é necessário o conhecimento prévio da informação de sequências-alvo como é o caso dos Microssatélites, estes métodos não requerem um sistema especial para a revelação destes polimorfismos (LOPES et al., 2002). Estas técnicas não são capazes de expressar, se o genoma é homozigótico ou heterozigótico, pois a única distinção apresentada é o alelo estar amplificado (1) ou não estar amplificado (0), não sendo levado em conta o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

Além de ser uma técnica robusta, o *AFLP* possui custo relativamente baixo pois baseia-se na amplificação de um subconjunto de fragmentos que são gerados a partir da combinação de enzimas de restrição de corte raro (ApaI, EcoRI, HindIII, PstI) e de corte frequente (MseI, TaqI), que clivam o DNA genômico em sítios específicos (LOPES et al., 2002). Esta clivagem pode ser feita em apenas uma etapa, desde que tenha-se disponível um tampão adequado para as duas enzimas (corte raro / corte frequente). A principal importância da utilização dessa combinação de enzimas é a digestão completa da molécula de DNA, pois uma digestão parcial pode levar a uma caracterização de falsos polimorfismos, sendo que a alta pureza desse DNA amostral é um fator essencial para o sucesso da digestão total, exigindo um excelente método de extração e quantificação de DNA (CRESTE et al., 2001).

Lopes et al. (2002) explica que o processo de digestão pela combinação das enzimas de corte raro e de corte frequente vai gerar 3 tipos diferentes de fragmentos, que são: os

fragmentos de corte frequente/frequente, frequente/raro e raro/raro. Haverá uma predominância dos fragmentos de corte frequente/frequente, se comparada com os fragmentos de corte raro/raro, porém já os fragmentos de corte frequente/raro são preferencialmente amplificados pois há uma baixa eficiência na hibridização dos iniciadores da enzima de corte frequente comparando-a com a hibridização dos iniciadores da enzima de corte raro, somado ao fato de que os fragmentos de corte frequente/frequente possuem uma extremidade terminal invertida (amplificado por um único iniciador) o que vai favorecer a formação de uma sequência, sendo que este último competirá com os iniciadores pelo anelamento (BLIND, 2016).

As enzimas de restrição deixam extremidades coesivas de sequência conhecida, após a clivagem do DNA, em que será possível a construção de sequências nucleotídicas de fita dupla (adaptadores) que irão se ligar às extremidades dos fragmentos de restrição. Partindo do conhecimento das sequências dos adaptadores e do sítio de restrição é possível construir iniciadores específicos para estas sequências como é o caso dos microsatélites e com isso pré-amplificar os fragmentos de restrição (VOS et al., 1995).

Os *primers*, por sua vez, são construídos a partir de uma sequência complementar ao do adaptador seguida de outra sequência específica para o sítio de restrição da enzima e ainda uma extensão de nucleotídeos seletivos na região terminal 3' (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O resultado da digestão e da pré-amplificação podem ser verificados a partir de uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), sendo uma etapa importante, pois evita que possíveis erros na digestão ou na pré-amplificação, posteriormente sejam detectados no final de todo procedimento (VOS et al., 1995). A análise final dos resultados é feita por meio de leitura em gel de poliacrilamida desnaturante corado com nitrato de prata, observando-se a presença ou ausência de bandas polimórficas (sinais).

Lopes et al. (2002) explica ainda que a técnica AFLP além da reprodutibilidade, apresenta uma grande vantagem que é a detecção de um maior número de locos, se comparada às demais técnicas de identificação dos marcadores moleculares, possibilitando ainda, uma ampla cobertura do genoma e um custo reduzido por loco obtido.

3.6. Análise Multivariada

Um aporte adicional ao uso de análises moleculares para estudar a diversidade entre acessos ou genótipos, é justamente as análises das características morfo-agronômicas (ALLARD, 1971; DAVIS, 1994), uma vez que fica evidente a aptidão produtiva tanto qualitativamente quanto quantitativamente e assim classificá-los por meio de agrupamentos, dendrogramas, dispersões gráficas e figuras filogenéticas.

Por proporcionar maior oportunidade de escolha de genótipos potenciais, a técnica de análise multivariada tem sido muito utilizada e permite aferir existência de correlação positiva ou negativa entre múltiplas variáveis avaliadas (CRUZ, 1990). Dentre as mais empregadas citam-se as técnicas de bioinformática, análise por componentes principais, e pelos métodos de agrupamento por algum método de otimização e que dependem de medidas de dissimilaridade (CRUZ, 1990). A escolha do método mais adaptado à determinada cultura depende, sobretudo, da precisão experimental desejada, como também da facilidade de análise e pela forma de obtenção dos dados (BLIND, 2016).

Uma outra técnica que apresenta grande vantagem é a dos componentes principais para estudos sobre divergência genética em plantas, este procedimento gera a eliminação daqueles materiais que contribuem pouco, em termos de variação, sob um conjunto de indivíduos avaliados, além de manusear genótipos em bancos de germoplasma, identificar parentais divergentes, estimar a variabilidade disponível em grupos geneticamente relacionados, e avaliar a importância de cada caráter (CRUZ, 2006). Porém, sua eficácia dependerá da probabilidade de resumir o conjunto de variáveis originais em poucos componentes, o que resultará na divergência genética entre os genótipos.

Com base no princípio de que a importância ou variância dos componentes principais decresce do primeiro para o último, tem-se que os últimos componentes explicam uma fração muito pequena da variância total. O interesse nesta avaliação reside na possibilidade de selecionar caracteres que contribuem para a discriminação do material avaliado, reduzindo, dessa forma, mão-de-obra, tempo e custo despendidos nos ensaios experimentais (BLIND, 2016).

O conhecimento sobre o desempenho produtivo, isto é analisar variáveis quantitativas sob determinadas condições ambientais, constitui-se em fator importante a considerar para a compreensão varietal e como ela interage com o ambiente (QUEIROZ, 2011).

A avaliação através de dados multicatégoricos para estimar a diversidade genética em coleções de germoplasma também pode ser mensurada pela presença/ausência, formas, cores e/ou posições, envolvendo flores, frutos, folhas, ramas e/ou sementes em espécies de cucurbitáceas (RAMOS et al., 2000; QUEIROZ, 2011). O objetivo é considerar a combinação de diversas variáveis com classificação ordinal é obter uma matriz única que traduza a distância genética entre materiais por meio de agrupamento, seguindo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (CRUZ; REGAZZI, 2001 apud BLIND, 2016). Esta técnica exige olhar acurado e apresenta custo relativamente barato, pois envolve diretamente a observação e/ou mensuração de vários caracteres em um mesmo acesso e/ou genótipo.

As técnicas de análise de agrupamento, considera dividir um grupo original de observações em diversos grupos, seguindo algum critério de similaridade ou dissimilaridade, que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (CRUZ et al., 2004). Na análise de agrupamento, algumas decisões devem ser tomadas entre elas, a adequação arbitrária de partição e o tipo de medida de similaridade a ser ponderada. Com relação ao número de grupos desejados, o mais comumente, é utilizar vários números de grupos e, por algum critério de otimização, selecionar o (s) mais conveniente (s) (CRUZ et al., 2004).

Para escolha da adequação da partição, é comum a utilização da análise discriminante e com relação às medidas de similaridade, as mais empregadas no melhoramento são as distâncias Euclidianas e a de Mahalanobis (CRUZ; CARNEIRO, 2014). Há grande número de métodos de agrupamento disponível, cabendo decidir qual o mais adequado ao trabalho, uma vez que as várias técnicas podem evidenciar diferentes padrões de agrupamentos (CRUZ et al., 2004).

Dentre os métodos de agrupamento mais empregados no estudo de variáveis quantitativas em plantas, citam-se os métodos baseados em distâncias, a exemplo dos hierárquicos, e os de otimização (CRUZ; CARNEIRO, 2014). Entre os hierárquicos, destacam-se os métodos do vizinho mais próximo, vizinho mais distante, e *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic* (UPGMA). Já entre os métodos de otimização o mais empregado é o proposto por Tocher, pois permite facilidade na visualização de divergência genética e formação de grupos.

A caracterização por meio de descritores botânicos, pode fornecer informações sob a variabilidade genética de modo eficiente, onde centenas de cruzamentos indesejáveis posteriormente podem ser evitadas. Além disso a quantificação da divergência entre genótipos pode ter mais significado em uma coleção, quando a diversidade fenotípica refletir sobre a divergência calculada.

No catálogo de descritores morfológicos de helicônias, proposto por Guimarães et al. (No prelo) constam 42 descritores qualitativos sugeridos para estudo da divergência desta espécie. Acrescido a estes descritores, outros seis propostos por IPGRI (1996) e Silva et al. (1999) para caracterização da cultura da banana e utilizado como referência pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Dentre estes, os descritores morfo-agronômicos envolvendo o vegetativo e o reprodutivo das plantas representa maior importância.

3.7. Caracterização dos estômatos

3.7.1. A estrutura dos estômatos:

Os estômatos são pequenos orifícios localizados principalmente na superfície das folhas e estão relacionados diretamente com a entrada de CO₂ e a perda de água via transpiração, sendo o principal mecanismo regulador destes processos (AL AFAS et al., 2006; BUSSIS et al., 2006).

A palavra estômato vem do grego (stoma) e significa boca, o nome se dá pelo fato de que suas estruturas, vistas ao microscópio, assemelham-se a pequenas bocas. É constituído pelo ostíolo, abertura responsável pelas trocas gasosas, por um par de células chamadas de células-guarda e um conjunto de células adjacentes às células-guarda, que se diferem ou não das demais células da epiderme. Quando as células na linha mais próxima das células-guarda (adjacentes) não se diferem das demais células da epiderme, elas são chamadas de células vizinhas, mas quando estas células se diferenciam em textura, tamanho ou até mesmo em forma, são denominadas subsidiárias. O conjunto formado pelo estômato, mais as células vizinhas ou subsidiárias, constitui o complexo estomático ou aparato estomático (METCALFE; CHALK, 1950; ESAU, 1960; PANT, 1965; STACE, 1965; VAN COTTHEM, 1970; WILKINSON, 1979; CARPENTER, 2005).

O póro estomático é formado entre duas células guarda, que são células especializadas da epiderme. No que tange a forma (Figura 7), estas células podem ser de dois tipos: reniforme (elípticas – comum na maioria das dicotiledôneas), e em forma de halter (mais comum em monocotiledôneas). Vichiato et al. (2006) fizeram comparações entre plantas diploides e tetraploides de *Dendrobium nobile*, e observaram que as plantas poliploides apresentaram menor crescimento quando comparadas com as diploides e conseguiram determinar o grau de ploidia utilizando as análises estomática e morfométrica.

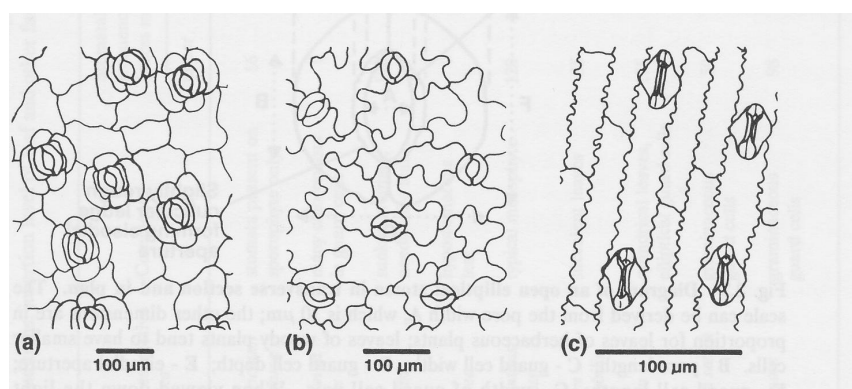


Figura 7: Estômatos das três espécies mais usadas em estudos de fisiologia estomática. a) *Commelina communis*; b) *Vicia faba* e; c) *Zea mays*.
Fonte: Weyers; Meidner (1990).

A Figura 7 destaca os tipos três espécies que são comumente mais utilizadas em estudos de fisiologia onde a) *Commelina communis* que é uma monocotiledônea com um complexo hexacítico, isto é, apresenta seis células subsidiárias; b) *Vicia faba*, que é uma dicotiledônea sem células vizinhas morfologicamente especializadas; o complexo denomina-se anomocítico; c) *Zea mays*, que é uma monocotiledônea com células guarda do tipo das gramíneas e um par de células subsidiárias, isto é, com um complexo paracítico.

Muitas vezes utiliza-se, incorretamente, o termo estômato para designar não apenas o poro estomático, mas também as células guarda e outras células adjacentes que formam o complexo estomático. Se as células adjacentes são morfologicamente diferentes das restantes células da epiderme chamam-se células subsidiárias (Figura 7 - a), se são semelhantes denominam-se células vizinhas (Figura 7 – b) (WEYERS; MEIDNER, 1990).

Os tipos estomáticos podem variar bastante entre diferentes grupos de plantas, mas, ocasionalmente, vários tipos estomáticos podem ocorrer em uma mesma planta dando origem

ao polimorfismo (TIMONIN, 1986). Segundo a terminologia proposta por Baranova (1992), plantas que apresentam polimorfismo estomático são também chamadas de heteroestomáticas e plantas que apresentam apenas um tipo de complexo estomático (ou somente um tipo estomático) é chamada de homoestomática.

Camargo (2009) sugere que utilize-se o termo “heteroestomatotividade” para referir-se a dois ou mais tipos estomáticos ocorrendo na mesma folha e o termo “polimórfico” para descrever variações em um determinado tipo estomático, ou seja, no caso de haver diferenças estruturais no tamanho, textura e forma de qualquer parte de um mesmo tipo de complexo estomático.

De acordo com o tipo de células subsidiárias em Dicotyledoneae, os estômatos podem ainda ser classificados como anomocítico (ausência de células subsidiárias), diacítico (presença de 2 células subsidiárias perpendiculares às células-guarda), paracítico (presença de 2 células subsidiárias paralelas às células-guarda) e anisocítico (presença de 3 ou mais células subsidiárias, sendo uma delas menor que as demais). Com base na disposição dos estômatos nas folhas, distribuem-se ao acaso quando a nervação é reticulada, comum em Dicotyledoneae, e em arranjos lineares quando a nervação é paralela, caso de Monocotyledoneae.

As células guarda só apresentam plasmodesmos entre elas e não apresentam qualquer tipo de conexão com as restantes células do complexo estomático. Assim, todos os compostos importados para o seu interior têm de atravessar a membrana plasmática. Esta característica do complexo estomático é extremamente importante em termos fisiológicos (Camargo, 2009).

Além dos estômatos a epiderme não apresenta espaços intercelulares. As paredes mais exteriores da epiderme e das células guarda apresentam cutícula que continua numa forma mais fina nas paredes ventral e laterais das células guarda, e nas paredes interiores das células da epiderme que limitam uma câmara subestomática (WEYERS; MEIDNER, 1990).

Como a poliploidia causa nas plantas uma série de consequências fenotípicas como o aumento do número cromossômico, que normalmente repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais e a análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliploides e testemunhas diploides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos (VICHIAITTO et al., 2006) a caracterização do material pode ser realizada por comparações entre os estômatos dos poliploides com os de plantas diploides (normais). Portanto, a alteração no tamanho das

células-guarda de estômatos de folhas de plantas tratadas com colchicina pode ser utilizada como característica indicativa da existência de poliploidia. Logo, diversos trabalhos de indução de poliploidia em vegetais utilizaram essa característica para selecionar putativos poliploides, como em *Manihot esculenta* (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000), *Heliconia bihai* (CAVALCANTE-FILHO, 2011), *Centella asiática* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonii* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012).

3.7.2. Densidade estomática:

A densidade estomática (ou frequência estomática) de uma epiderme com estômatos pode variar muito dependendo da espécie, podendo chegar a 2 000 poros mm^{-2} , porém, a maioria das plantas possui em torno de 40 a 350 poros mm^{-2} . Sua aferição é feita pela contagem do número de estômatos por área.

Por meio da densidade estomática podemos calcular também o índice estomático, com a quantificação dos estômatos e das células epiteliais. Quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático torna-se independente do tamanho da folha, por esta razão, as estimativas tanto de densidade estomática quanto do índice estomático, são realizadas com folhas maduras (completamente expandidas). Quando se determina a densidade e a média da área dos estômatos, então a área total dos poros estomáticos pode ser calculada como uma percentagem da área foliar. Este valor situa-se geralmente entre os 0.3 a 2 % se o diâmetro médio do poro for cerca de 6 μm (WEYERS; MEIDNER, 1990).

3.8. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucos gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em

uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico. São possíveis análises de características físicas e químicas de uma simples célula. Desta maneira, podem ser realizadas análises quantitativas de DNA e revelar a ploidia de células em suspensão.

A técnica de citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta para o estudo de genomas vegetais e apresenta diversas aplicações. Segundo Loureiro; Santos (2005), é de esperar que o número de aplicações práticas aumente e que a citometria de fluxo seja rotineiramente utilizada em estudos de melhoramento vegetal e taxonomia.

A análise por citometria de fluxo do conteúdo em DNA nuclear em células em interfase é uma excelente alternativa aos métodos clássicos de coloração e contagem de cromossomos ao microscópio. Comparativamente, a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias (quimerismo). Por estas razões, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (DOLEZEL, 1997 apud LOUREIRO; SANTOS, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados no presente estudo pertencem à coleção de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink estabelecida no Campo Experimental Sede da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas. Estas plantas são provenientes de ensaio de indução à poliploidia in vitro que consistiu na imersão de ápices caulinares de um único clone em diferentes concentrações de colchicina, além do controle (ausência de colchicina). Estes explantes foram multiplicados na presença de citocinina e enraizados in vitro, seguidos de aclimação em casa de vegetação e plantio em campo em março de 2011. Em maio de 2014, a coleção com 55 genótipos foi transferida para nova área com divisão das touceiras e estabelecidas em espaçamento de 3,0 m entre fileiras e 1,5 m entre plantas, dispostas em blocos ao acaso com quatro repetições por genótipo.

Para a realização do transplântio foram selecionadas mudas do tipo “chifre” com aproximadamente 40 cm de altura, as quais foram devidamente identificadas para o transporte e o plantio realizado diretamente em covas previamente preparadas e adubadas. Para minimizar os riscos de disseminação de pragas e doenças, as ferramentas utilizadas estavam bem afiadas, e foi feito um procedimento de desinfecção das ferramentas, entre o uso de uma touceira para outra com uma limpeza em solução de hipoclorito de sódio.

4.1 Caracterização morfológica

As análises foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e no Laboratório de Fisiologia de Plantas pertencentes à Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no município de Manaus, Amazonas.

As avaliações dos descritores morfológicos foram realizadas mensalmente nos 41 genótipos estabelecidos no campo por dois anos consecutivos, sendo os critérios utilizados baseados em quarenta e nove descritores qualitativos (Tabela 2) (LOGES et al., 2007; COSTA et al., 2009; GUIMARÃES, 2011), além do auxílio de uma carta de cores Munsell (2012) para a identificação mais precisa de descritores relacionados a tonalidades.

Tabela 1: Descritores morfológicos utilizados para avaliar os genótipos poliploides de *H. chartacea* var. Sexy Pink. Manaus, AM. 2017.

PSEUDOCAULE	
Descritores	Identificação do Descritor
1 Altura da planta (ALP)	1. Pequeno porte (<1.50 m); 2. Médio porte (1.51 - 2.50 m); 3. Grande Porte (> 2.51 m)
2 Diâmetro do pseudocaule (DPC)	Obtida a uma altura de 30 cm do nível do solo
3 Cor do pseudocaule (CPC)	1. Amarelo esverdeado (2.5GY 8/12); 2. Verde claro (2.5GY (8/8); 3. Verde médio (5GY 6/6); 4. Verde escuro (7.5GY 4/4)
4 Cerosidade do pseudocaule (CER)	1. Ausente; 2. Pouca; 3. Média; 4. Muita
5 Pilosidade do pseudocaule (PIL)	1. Ausente; 2. Pouca; 3. Média; 4. Muita
6 Intensidade de antocianina (IAN)	1. Intensa; 2. Média; 3. Fraca; 4. Ausente
FOLHA	
7 Comprimento da terceira folha (CFO)	Medida da base até o ápice do Limbo
8 Largura da terceira folha (LFO)	1. Estreita (até 10 cm); 2. Mediana (de 20 a 30 cm); 3. Larga (mais de 31 cm)
9 Posição das folhas (PFO)	1. Ereta; 2. Pendente; 3. Arcada
10 Limbo (LIM)	1. Rasgado; 2. Não rasgado
11 Cor verde da face inferior da folha (CFI)	1. Amarelo esverdeado (2.5GY 8/12); 2. Verde claro (2.5GY (8/8); 3. Verde médio (5GY 6/6); 4. Verde escuro (7.5GY 4/4)
12 Cor verde da face superior da folha (CFS)	1. Amarelo esverdeado (2.5GY 8/12); 2. Verde claro (2.5GY (8/8); 3. Verde médio (5GY 6/6); 4. Verde escuro (7.5GY 4/4)
13 Tonalidade da cor da face inferior da nervura principal (TCP)	1. Amarelo esverdeado (2.5GY 8/12); 2. Verde claro (2.5GY (8/8); 3. Verde médio (5GY 6/6); 4. Verde escuro (7.5GY 4/4)
14 Cor da margem do pecíolo (CMP)	1. Púrpura (5R 3/10); 2. Vermelho-rosado (2.5R 7/2); 3. Verde (5GY 6/6); 4. Marrom (5YR 3/4); 5. Transparente
15 Cerosidade do limbo na superfície dorsal da folha (CLD)	1. Ausente; 2. Pouca; 3. Média; 4. Muita
16 Cerosidade do limbo na superfície ventral da folha (CLV)	1. Ausente; 2. Pouca; 3. Média; 4. Muita
17 Presença de manchas no limbo da muda (PML)	1. Sem manchas; Poucas manchas; 3. Manchas raras
18 Forma da base do limbo (FBL)	1. Ambas redondas; 2. Uma redonda / uma afilada; 3. Ambas afiladas
19 Comparação das dimensões da base do limbo (CBL)	1. Iguais; 2. Desiguais; 3. Variável na mesma planta
20 Forma da base do pecíolo (FBP)	1. Aberta com margens aladas; 2. Aberta com margens eretas; 3. Estreito com margens eretas; 4. Margens retorcidas na parte interna
21 Margem da base escariosa (MBE)	1. Ausente; 2. Pouco; 3. Médio; 4. Muito
22 Forma da Margem do pecíolo (FMP)	1. Fechada; 2. Quase fechada; 3. Ereta; 4. Bem aberta
23 Cor interna das bainhas (CIB)	1. Púrpura (5R 3/10); 2. Vermelho-rosado (2.5R 7/2); 3. Verde (5GY 6/6); 4. Marrom (5YR 3/4); 5. Transparente

Tabela 1: Continuação.

INFLORESCÊNCIA	
Descritores	Identificação do Descritor
24 Posicionamento da inflorescência em relação a haste (PIH)	1. Ereta; 2. Pendente
25 Comprimento da inflorescência (CI)	1. Curta (< 10 cm); 2. Média (entre 11 a 40 cm); 3. Grande (> 41 cm)
26 Comprimento da 2ª bráctea (CB)	1. Pequena (< 10 cm); 2. Média (entre 11 a 40 cm); 3. Grande (> 41 cm)
27 Largura da segunda bráctea (LB)	1. Estreita (até 10 cm); 2. Mediana (de 20 a 30 cm); 3. Larga (mais de 31 cm)
28 Ângulo da 1ª bráctea em relação ao pedúnculo (ABP)	1. > 90°; 2. 75° - 90°; 3. 45° - 60°; 4. 15° - 30°; 5. 0°
29 Torção da ráquis (TR)	1. Presente; 2. Ausente
30 Visualização da ráquis (VR)	1. Visível; 2. Recoberta por brácteas
31 Largura da inflorescência (LI)	1. Estreita (< 10 cm); 2. Média (entre 11 a 40 cm); 3. Larga (> 41 cm)
32 Folha na extremidade (1ª bráctea)	1. Presente; 2. Ausente; Variável na mesma planta
33 Forma do ápice da bráctea (FAB)	1. Largo (abaulado); 2. Estreito; 3. Afilado
34 Cerosidade das brácteas (CEB)	1. Ausente; 2. Pouca; 3. Média; 4. Muita
35 Pilosidade das brácteas (PB)	1. Ausente; 2. Pouca; 3. Média; 4. Muita
36 Simetria da bráctea (SB)	1. Actinomórfica; 2. Zigomórfica; 3. Assimétrica
37 Número de brácteas na inflorescência madura (NBI)	1. Pouca (< 5); 2. Média (entre 6 a 20); 3. Muita (> 21)
38 Cor da ráquis (CRA)	1. Pink Escuro (5R 4/6); 2. Pink Claro (5R 4/4); 3. Pink Alaranjado (10R 7/8); 4. Rosa bebê (2.5R 8/4); 5. Rosa bebê Alaranjado (2.5R 7/8); 6. Vermelho escuro (5R 3/10); 7. Vermelho Médio (5R 4/10).
38 Cor da bráctea externa (CBE)	1. Pink Escuro (5R 4/6); 2. Pink Claro (5R 4/4); 3. Pink Alaranjado (10R 7/8); 4. Rosa bebê (2.5R 8/4); 5. Rosa bebê Alaranjado (2.5R 7/8); 6. Vermelho escuro (5R 3/10); 7. Vermelho Médio (5R 4/10).
40 Cor da bráctea interna (CBI)	1. Pink Escuro (5R 4/6); 2. Pink Claro (5R 4/4); 3. Pink Alaranjado (10R 7/8); 4. Rosa bebê (2.5R 8/4); 5. Rosa bebê Alaranjado (2.5R 7/8); 6. Vermelho escuro (5R 3/10); 7. Vermelho Médio (5R 4/10).
41 Cor da base do perigônio (CBP)	1. Branca; 2. Creme; 3. Amarelo (5Y 8/12)
42 Cor dos lóbulos do perigônio (CLP)	1. Branca; 2. Creme; 3. Amarelo (5Y 8/12)
43 Presença de antocianina no perigônio (PAP)	1. Ausente; 2. Na parte basal; 3. Presença de listras; 4. Coloração uniforme
44 Presença de Pólen (PPO)	1. Ausente; 2. Pouco; 3. Médio; 4. Muito
45 Cor da Sépala (CSE)	1. Amarelo esverdeado (2.5GY 8/12); 2. Verde claro (2.5GY (8/8); 3. Verde médio (5GY 6/6); 4. Verde escuro (7.5GY 4/4)
46 Cor da Pétala (CPE)	1. Amarelo esverdeado (2.5GY 8/12); 2. Verde claro (2.5GY (8/8); 3. Verde médio (5GY 6/6); 4. Verde escuro (7.5GY 4/4)
47 Ovário: Cor do fruto imaturo (OCI)	1. Branca; 2. Creme; 3. Amarelo (5Y 8/12)
48 Ovário: Cor do fruto maduro (COM)	1. Branca; 2. Creme; 3. Azul arroxeado
49 Período de florescimento (PF)	1. Curto (< 5 meses); 2. Médio (entre 5 a 8 meses); 3. Longo (> 8 meses)

As avaliações do pseudocaule, folhas e inflorescências foram visuais e as medidas realizadas com auxílio de paquímetro digital e fita métrica para cada um dos genótipos poliploides avaliados.

As plantas foram monitoradas quanto à ocorrência de pragas e doenças, assim como seu controle. As adubações e limpezas culturais seguiram o cronograma pré-estabelecido pela Embrapa, com base em dados para a cultura da helicônia de outras regiões (CASTRO, et al. 2007; SOUSA, et al. 2009; LUZ et al., 2005).

Para visualização da diferenciação entre os genótipos de *H. chartacea*, com base nos descritores morfológicos qualitativos, foi construído um dendrograma por análise de agrupamentos do tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetical Averages) com o auxílio do programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). A matriz de dissimilaridade foi obtida pelo complemento aritmético do índice de coincidência simples. A adequação da análise de agrupamento aos dados originais foi avaliada pelo coeficiente de correlação cofenética (SOKAL; ROHLF, 1962) e a definição dos agrupamentos foi feita pelo método de Mojema (1977). Também foi considerado o agrupamento obtido pelo método de otimização (Tocher).

A determinação da diversidade genética de uma população qualquer pode ser realizada por um método específico, a partir de variáveis binárias, qualitativas ou quantitativas (AMORIM et al., 2007), ou ainda por uma combinação de métodos. Gower (1971) propôs uma técnica que permite a análise simultânea das distâncias genéticas entre características quantitativas e qualitativas. Este método permite que valores da matriz de distância fiquem compreendidos entre 0 e 1. Deste modo, a divergência genética entre os genótipos de *H. chartacea* foi estimada utilizando o algoritmo de Gower em um estudo conjunto a partir dos dados qualitativos e quantitativos. Esse algoritmo é expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{k=1}^v W_{ijk} S_{ijk}}{\sum_{k=1}^v W_{ijk}}$$

Onde: K = o número de variáveis (K = 1, 2,...,v); i e j = dois indivíduos que representam os genótipos; W_{ijk} = peso dado a comparação ijk, atribuindo valor 1 para comparações válidas e valor 0 para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); S_{ijk} = contribuição da variável K na similaridade entre os indivíduos i e j, com valores entre 0 e 1.

Para características binárias, a similaridade é obtida pelo grau de coincidência de padrão “1-1”, assumindo peso (W_{ijk}) nulo nas situações em que um padrão fenotípico não se manifesta em ambos os indivíduos, para a k -ésima variável. Para uma variável qualitativa (nominal), se o valor da variável K é o mesmo para ambos os indivíduos, i e j , então $S_{ijk} = 1$, caso contrário, é igual a 0; para uma variável quantitativa (contínua) $S_{ijk} = 1 - |Y_{ik} - Y_{jk}| / R_k$ onde Y_{ik} e Y_{jk} são os valores da variável K para os indivíduos i e j , respectivamente, e R_k é o intervalo (valor máximo menos o valor mínimo), da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo (0, 1) e pesos iguais. Posteriormente, a matriz de similaridade obtida deve ser convertida em uma matriz de dissimilaridade por meio de seus complementos aritméticos ($d = 1 - S$).

De posse da matriz de distâncias genéticas entre os genótipos de *H. chartacea*, considerando a análise conjunta dos dados, foram realizados os agrupamentos pelo procedimento hierárquico UPGMA e otimização de Tocher. Adicionalmente realizou-se o cálculo do coeficiente de correlação cofenético (SOKAL; ROHLF, 1962) para a estimativa do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado.

4.2. Caracterização da estrutura do limbo foliar, avaliação da densidade estomática e do tamanho das células-guarda dos estômatos por meio de microscopia.

Para verificar a existência de diferenças nas estruturas do limbo foliar, foi selecionada uma touceira por genótipo, de boa qualidade fitossanitária, sendo coletado três folhas completamente expandida (terceira folha) e da parte mediana de cada folha foi retirado com o auxílio de um perfurador circular de 1 cm de diâmetro, uma amostra que foram colocadas em uma placa de petri e imersas em uma solução de hipoclorito comercial até a completa despigmentação (24 - 48h). Em seguida, foram separadas as partes abaxial e adaxial com um pincel de cerdas macias, e coradas com azul de toluidina a 1% e feita a montagem das lâminas com a adição de uma gota de bálsamo do Canadá sobre as amostras e sobre estas uma lamínula.

O tamanho dos estômatos e a densidade estomática (DE- número de estômatos por unidade de área) de ambas as partes, abaxial e adaxial dos genótipos, foram analisados em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X, observando-se quinze campos de visão por

amostra. Baseando-se em escala micrométrica para a ocular utilizada, a densidade estomática foi determinada segundo a equação:

$$DE = \frac{\text{Número de estômatos}}{\text{Área (mm}^2\text{)}}$$

Onde: DE = Densidade estomática. Área = área do campo real visível da ocular de 40x (0,14 mm²).

O número total de estômatos de uma folha pode ser calculado a partir do produto da densidade pela área foliar, embora a densidade não seja uniforme em toda superfície da folha.

Para as avaliações do diâmetro polar dos estômatos (DP) e diâmetro equatorial dos estômatos (DQ), preparou-se lâminas com azul de toluidina, sendo observadas em câmara clara, segundo técnica de Labouriau (CASTRO et al., 2009). A partir dos dados de DE e DQ foi calculada a funcionalidade estomática (FUN) segundo Castro et al. (2009), pela seguinte fórmula:

$$FUN = \frac{\text{Diâmetro polar}}{\text{Diâmetro equatorial}}$$

O esquema da análise de variância conjunta é apresentado na Tabela 2 e foi realizado seguindo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} : valor fenotípico do caráter Y medido no material genético (genótipo) i , no ambiente (região da folha) j e repetição k ; m : média geral paramétrica dos dados em estudo; G_i : efeito do i -ésimo genótipo ($i=1,2,...,g$); A_j : efeito do j -ésimo ambiente experimental ($j=1,2,...,a$); GA_{ij} : efeito da interação do i -ésimo genótipo com o j -ésimo ambiente; E_{ijk} : erro médio associado à observação Y_{ijk} .

Tabela 2. Esquema resumido da análise de variância conjunta dos dados da análise estomática de *H. chartacea* var. Sexy Pink. Manaus, AM. 2017.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	F	E(QM)
Genótipo	g-1	QMG	QMG/QMGA	$\sigma^2 + r\sigma_{ga}^2 + ar\sigma_{gm}^2$
Ambiente	a-1	QMA	QMA/QMGA	$\sigma^2 + r\sigma_{ga}^2 + g\sigma_a^2$
G x A	(a-1)(g-1)	QMGA	QMGA/QMR	$\sigma^2 + r\sigma_{ga}^2$
Resíduo	ga(r-1)	QMR		σ^2
Média			M	
CV %			$100 \sqrt{QMR/M}$	

σ_m^2 : Componente de variância genotípico (genótipos);

σ_a^2 : Componente de variância ambiental (região das folhas);

σ_{ga}^2 : Componente de variância da interação entre genótipo e ambiente;

σ^2 : Componente de variância residual;

r, g, a: número de repetições, genótipos e ambientes, respectivamente.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: componente da variância genotípica, fenotípica e ambiental, componente de variância da interação genótipos e ambientes (genótipos x região da folha), coeficiente de variação genético, coeficiente de herdabilidade no sentido amplo e a razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação ambiental, conforme Cruz et al. (2014). Também foram estimadas as correlações de Pearson ($p < 0,05$) entre os parâmetros obtidos nas regiões adaxial e abaxial da folha.

Todas as análises foram realizadas utilizando o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa GENES, versão 6.1, da Universidade Federal de Viçosa – UFV (CRUZ, 2013).

4.3 Citometria de fluxo

4.3.1 Preparo da suspensão nuclear

O preparo das amostras e as análises em citometria de fluxo foram conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG.

Para cada uma das 37 plantas de *H. chartacea* var. Sexy Pink, três amostras foram avaliadas, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA e a existência de poliploidia. Para a quantificação do DNA foi utilizado como padrão de referência a folha de ervilha (*Pisum sativum* – 9,09 pg).

De cada uma das amostras foi retirado aproximadamente 70 mg de tecido foliar jovem, fragmentadas com o auxílio de um bisturi em placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração LB01 gelado para obtenção de suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). O tecido triturado em suspensão nuclear foi aspirado com o auxílio de uma pipeta e posteriormente filtrado em uma tela de náilon de 50 µm de diâmetro de poro em um tubo para análise em citômetro de fluxo. À suspensão nuclear foram adicionados 25µL do fluorocromo de iodeto de propídio (1 mg mL⁻¹) para corar os núcleos presentes na amostra, sendo colocada no gelo, no escuro até a análise.

4.3.2. Análise em citômetro de fluxo

Para cada amostra foram analisados pelo menos 5 mil núcleos. As análises foram realizadas no Citômetro de Fluxo FACS Calibur™ 4 Cores da BD (Becton Dickinson) e os dados obtidos foram analisados pelo software Cell Quest Pro (Versão 5.1) para obtenção dos histogramas.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas de Sexy Pink foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*P. sativum*). Para a análise de ploidia foi utilizado como padrão de referência a folha de *H. chartacea* var. Sexy Pink, que não sofreu tratamento com o antimetabólito, e a partir da posição do pico G1 formado no histograma foi possível estimar a ploidia do material analisado, pela aplicação da proporção de suas intensidades relativas de fluorescência.

Já a quantidade de DNA (pg) das plantas foi obtida por meio da equação: quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 da ervilha) x 9,09.

Para quantificação dos picos G1 dos genótipos poliploides foi utilizado como padrão interno o DNA da ervilha (*Pisum sativum*), que possui um conteúdo 2 C de 9,09 pg. A ervilha é tida por alguns autores como uma excelente alternativa de padrão interno por possuir um conteúdo de DNA que se situa no meio do valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA

vegetal (DOLEZEL; BARTOS, 2005). O que evitaria a sobreposição dos gráficos quando analisados conjuntamente com o DNA dos genótipos poliploides uma vez que não há referências na literatura sobre o conteúdo de DNA para esta espécie. Nesse sentido a ervilha pode ser utilizada para avaliar tanto plantas com um pequeno genoma quanto plantas com um genoma grande, ao contrário da soja (*Glycine max*) e do tomate (*Solanum lycopersicum*), que também são comumente utilizados como padrão interno porém, apresentam um conteúdo 2 C menor (2,50 e 1,96 pg respectivamente). Além disso, o genoma nuclear da *P. sativum* é estável, e o preparo de suspensões de núcleos a partir de suas folhas não libera compostos que interferem na coloração pelo iodeto de propídeo (MADAIL et al, 2015).

4.4. Caracterização molecular

Folhas jovens e sadias de cada genótipo cultivado foram coletadas no início da manhã, seccionadas e retirada uma porção da parte mediana das folhas de aproximadamente 15 cm². Posteriormente as folhas seccionadas foram armazenadas em sacos ziplock contendo sílica granulada, acondicionadas em caixa de isopor refrigerado e levadas ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LAB-MGV) da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, para extração do DNA e posteriormente, análise utilizando marcadores AFLP.

O DNA genômico de cada genótipo foi extraído pelo meio CTAB descrito por Ferreira; Grattapaglia (1998). De cada amostra, macerou-se aproximadamente 800 mg de tecido foliar fresco sem a nervura principal em cadinho com nitrogênio líquido e ao tecido macerado adicionado 1000 µL de tampão de extração (CTAB 20%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-β-mercaptoetanol 0,8%, PVP-Polivinilpirrolidona 1% e água ultrapura).

O macerado foi colocado em microtubo de plástico de 1,5 µL e mantido em recipiente com gelo até o término do processo de maceração de todas as amostras. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente por trinta segundos e incubadas em banho-maria a 60 °C por trinta minutos com homogeneização a cada dez minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 600 µL da mistura gelada de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) na amostra, que foi suavemente homogeneizada por cinco minutos e centrifugada a 14.500 rpm por dez minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 450 µL de isopropanol gelado e, após homogeneização suave, foram incubados a -20 °C por 24h.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 7.500 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por cinco minutos duas vezes e uma vez com 1 mL de etanol absoluto, ambos gelados. Após a retirada do etanol o precipitado foi deixado para secar à temperatura ambiente por 1 hora para então ser ressuscitado em 30 µL de tampão TE (Tris - EDTA) acrescido de RNase (39:1), incubado em banho-maria por 30 minutos a 37 °C e posteriormente estocado a -20 °C.

Para algumas amostras foi necessária uma etapa de limpeza em que foi acrescentado 500 mL de NaCl 2M ao precipitado, que após vortexado foi incubado a 4 °C por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo acrescido de 400 mL de isopropanol. Após duas horas de armazenamento a -20 °C, os tubos foram centrifugados a 7500 rpm por dez minutos e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se a limpeza com etanol conforme feito anteriormente para as demais amostras com folhas frescas, bem como o restante dos procedimentos.

Para a quantificação, 2 µL de DNA ressuscitado foi diluído em solução contendo 3 µL do corante azul de bromofenol e 1 µL de gel Red. Este volume, 6 µL, foi aplicado em gel de agarose 0,8 % (p/v). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese, em tensão de 100 V por dez minutos para a saída do poço e 60 V por 50 minutos para o restante da corrida. A quantidade de DNA extraída dos 37 genótipos foi avaliada por análise comparativa entre o DNA extraído de cada amostra e um DNA de concentração conhecida (Marcador - DNA lambda-Invitrogen) visualizados em transluminador de UV e fotodocumentados por sistema digital Vilber Lourmat. Após quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura para ajustar as suas concentrações para condição de trabalho (10 ng/µL) conforme sugestões de Vos et al., (1995).

A análise de marcadores AFLP foi realizada segundo os procedimentos propostos por Vos et al., (1995), com modificações de Lopes et al., (2002) conforme a sequência:

4.4.1. Digestão do DNA

As reações de digestão foram realizadas utilizando 200 ng de DNA genômico, 5,0 µL do tampão One Phor All (OPA) 10X (Pharmacia), 0,5 µL de solução Albumina de Soro Bovino-BSA (10 µg µL⁻¹), 1,0 µL da enzima *Mse*I (5 U µL⁻¹) e 0,4 µL da enzima *Eco*RI (12 U µL⁻¹), ambas fornecidas pelo New England Biolabs, e água ultrapura completando o

volume final para 50 µL. O material foi incubado em termociclador ESCO® PCR Thermal Cyclers por três horas a 37 °C para as reações de restrição e, em seguida, por 15 minutos a 70 °C para inativação das endonucleases.

4.4.2. Preparo e ligação dos adaptadores

Foram preparados adaptadores específicos de *EcoRI* e *MseI* que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. O adaptador *EcoRI* foi preparado utilizando 5,6 µL de adaptador *EcoRI forward*, 4,8 µL de adaptador *EcoRI reverse*, 6 µL de tampão OPA (Amersham®) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 120 µL. O adaptador *MseI* foi preparado utilizando 64 µL de adaptador *MseI forward*, 56 µL de adaptador *MseI reverse*, 7 µL de tampão OPA (Amersham®) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 140 µL. Ambos os adaptadores foram incubados no termociclador ESCO® PCR Thermal Cyclers, a temperaturas subsecutivas de 65, 37 e 25 °C, com duração de dez minutos cada.

Para a reação de ligação dos adaptadores foi utilizado 1,0 µL de adaptador *EcoRI*, 1,0 µL de adaptador *MseI*, 1,0 µL de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X), 0,33 µL da enzima T4 DNA Ligase (3 U/µL) (Promega®) e água ultrapura esterilizada completando o volume para 10 µL. Este mix foi adicionado a 50 µL do DNA digerido com as enzimas de restrição. As amostras foram incubadas em termociclador a 23 °C por 3 horas e estocadas a -20 °C.

4.4.3. Reações de amplificação

Na reação de pré- amplificação foram utilizados 0,6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo contendo um nucleotídeo seletivo adicionado à extremidade 3': oligo *EcoRI* + A (25 ng/µL) e oligo *MseI* + C (25 ng/µL), 1,0 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (10X) (Fermentas®), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas®), 3 µL de DNA digerido e ligado, e água ultrapura para completar o volume para 20 µL. As amostras foram incubadas em termociclador a 94 °C por dois minutos, seguidos de 26 ciclos de 94, 56 e 72 °C, com duração de um minuto para cada temperatura, e uma extensão final de 72 °C por cinco minutos. Terminada a reação de PCR foram acrescentados 80 µL de água ultrapura em cada amostra, e foram armazenadas a -20 °C.

Na reação de amplificação seletiva, em seguida, os iniciadores utilizados possuíam mais dois nucleotídeos arbitrários adicionais, além do nucleotídeo da pré-amplificação. A amplificação seletiva foi feita inicialmente em apenas 3 genótipos aleatórios das amostras pré-amplificadas, utilizando 19 combinações de pares de pares de primers, para selecionar aqueles com melhor qualidade de amplificação e o maior número de locos polimórficos amplificados.

As sequências dos oligonucleotídeos usados para teste de qualidade de amplificação encontram-se na Tabela 3. As três combinações de *primers* com melhor qualidade de amplificação e número de locos polimórficos (E+ACA/M+CGC, E+AAC/M+CCA e E+ACA/M+CCA) foram analisadas em todos os indivíduos de helicônia do estudo.

Tabela 3: Combinação de *Primers* utilizados na amplificação seletiva para analisar qualidade de amplificação e número de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA em *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus, AM. 2017.

Combinação do <i>Primer</i>	Especificação dos iniciadores (5' → 3')
E/AAC + M/CTC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
E/AGC + M/CTC	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
E/ATC + M/CTC	GAC TGC GTA CCA ATT CAT C + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
E/AGT + M/CTC	GAC TGC GTA CCA ATT GAG T + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
E/ACA + M/CTC	GAC TGC CTA CCA ATT CAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
E/AAC + M/CCA	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
E/AGC + M/CCA	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C + GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
E/ATC + M/CCA	GAC TGC GTA CCA ATT CAT C + GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
E/AGT + M/CCA	GAC TGC GTA CCA ATT GAG T + GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
E/ACA + M/CCA	GAC TGC CTA CCA ATT CAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
E/AAC + M/CGC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
E/AGC + M/CGC	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
E/ATC + M/CGC	GAC TGC GTA CCA ATT CAT C + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
E/AGT + M/CGC	GAC TGC GTA CCA ATT GAG T + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
E/ACA + M/CGC	GAC TGC CTA CCA ATT CAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
E/AAC + M/CAC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C + GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
E/AAC + M/CGC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
E/ACA + M/CAC	GAC TGC GTA CCA ATT GAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
E/ACA + M/CGC	GAC TGC CTA CCA ATT CAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACG C

Para as reações de amplificação seletiva foram utilizados 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL do oligo EcoRI (25 ng/µL) + ANN, 1,2 µL do oligo MseI (25 ng/µL) + CNN (Em que N é o nucleotídeo arbitrário usado na amplificação seletiva), 2,0 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (10X) (Fermentas[®]), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas[®]), 3 µL de DNA das amostras pré-amplificadas, e água ultrapura para completar o volume de 20 µL.

As amostras foram incubadas em termociclador à temperatura 94 °C por dois minutos, seguida de 12 ciclos de 94, 65 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, mais 23 ciclos de 94, 56 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, e uma extensão final de 72 °C por dois minutos afim de manter amostras previamente preparadas para as reações de eletroforese e estocadas a -20 °C.

4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bis-acrilamida (19:1 v/v)). Para o preparo da matriz de poliacrilamida foram utilizados 50,40 g de ureia, 0,36 g de bis-acrilamida e 7,20 g de acrilamida e tampão 1X TEB (Tris base, Ácido bórico e EDTA) para completar o volume de 120 mL. Foi usado o sistema de gel de sequenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), fonte de 3.000 V.

As placas foram limpas duas vezes com etanol 95%. Em seguida, na placa maior foram aplicados 1,5 mL de Repel químico e na placa menor foi aplicada uma solução contendo 1 mL de etanol 95 %, 5 µL de ácido acético glacial e 5 µL de Bind químico. Após cinco minutos as placas foram limpas mais duas vezes com álcool 95%, neste caso com leves movimentos apenas para a retirada do excesso das soluções. Foram utilizados lenços de papel, tanto na limpeza das placas como na aplicação e retirada do excesso das soluções.

Para o preparo do gel de poliacrilamida, utilizou-se 150 mL da matriz, 150 µL de Tetrametiletilenodiamina - TEMED e 1 mL de persulfato de amônia (95 mg/mL). O gel permaneceu, no mínimo, por quatro horas em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado aproximadamente 1,2 L TEB 1X e na parte inferior 350 mL de TEB 1X adido de 50 mL de acetato de sódio 3M.

Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrida conduzida sob potência constante de 80 W durante uma hora, para aquecimento e limpeza do gel.

As amostras receberam adição de 8 µL de loading buffer (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xilenocianol 0,002% (p/v) e incubadas no termociclador por cinco minutos à temperatura de 95 °C para desnaturação. Em seguida, foram aplicados 20 µL da amostra desnaturada no gel para eletroforese sob potência constante de 80 W durante duas horas e 30 minutos.

4.4.5. Revelação do gel

Para a revelação do gel, usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

A placa com o gel foi imersa em 3 L de solução para fixação (etanol 10% e ácido acético glacial 1%) durante dez minutos, seguida de lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Realizou-se então um pré-tratamento com solução de oxidação (ácido nítrico 1,5% - 3 L) durante 2,40 minutos e uma lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Para a impregnação foram utilizados 3 L da solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) por 20 minutos, seguida de duas lavagens de 30 segundos em 3 L de água destilada cada. A revelação foi feita em duas etapas, ambas utilizando 1,5 L de solução para revelação (Na_2CO_3 3% e formaldeído 0,02%), durando a primeira etapa o tempo de surgimento das primeiras bandas e a segunda até a obtenção do padrão de revelação desejado. Por fim, a placa foi colocada em 3 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5%) por cinco minutos e lavada em 3 L de água destilada durante um minuto e mantida à temperatura ambiente para secar. Todos os procedimentos foram realizados dentro de bandejas plásticas sob agitação em mesa agitadora orbital MA-140.

Após a revelação dos fragmentos de DNA gerados pelas análise de AFLP, foi contabilizado locos polimórficos revelados, mediante atribuição dos respectivos scores; (1) presença e (0) ausência, considerando orientação em linhas a sequência dos pares de bases. Os dados obtidos a partir dos marcadores moleculares foram usados na construção de uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard (D_j), dado pela seguinte expressão:

$$D_j = 1 - \left(\frac{a}{a + b + c} \right)$$

Sendo: a , b e c , presença de banda em ambos os genótipos, presença de banda no primeiro e ausência no segundo, ausência no primeiro e presença no segundo, respectivamente.

Optou-se pelo uso deste coeficiente, pois além de suas propriedades matemáticas, possibilita evidenciar diferenças intraespecíficas e desconsidera a ausência de bandas como sinônimo de similaridade genética.

Para obtenção do dendrograma, a matriz de dissimilaridade foi utilizada no método

de agrupamento hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA). Pelo UPGMA a distância entre os grupos é determinada pela média das distâncias entre pares de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos, sendo uma expressão geral para este método:

$$d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i + n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i + n_j} d_{jk}$$

Em que: $d_{(ij)k}$ é a distância entre o grupo (ij) , com tamanho interno n_i e n_j , respectivamente, caracterizando i, j e k como indivíduos ou grupos (CRUZ et al., 2014).

Tanto as matrizes de dissimilaridade como os dendrogramas foram obtidos com o auxílio do software estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). O software R também foi empregado para gerar a matriz dos valores cofenéticos e testar a adequação da análise de agrupamento aos dados originais.

Para a obtenção das análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) foi utilizado o pacote vegan (OKSANEN et al., 2013) do software R. No nMDS o objetivo é acomodar os indivíduos em um pequeno número de eixos predeterminados, de modo a melhor representar a relação de similaridade entre os indivíduos. Deste modo, foi utilizado o algoritmo isoMDS visando representar cada indivíduo em duas dimensões de tal forma que as distâncias entre eles fossem preservadas ao máximo. O procedimento partiu de uma organização inicial que, iterativamente, reorganizou os indivíduos de maneira a diminuir o stress (STandard RESiduals Sum of Squares). O stress (S) é uma função que informa a magnitude da perda de informação na matriz de similaridade com a utilização do procedimento, sendo esta uma medida do quanto as posições dos indivíduos em uma configuração n-dimensional desviam-se das reais distâncias (similaridades) após o escalonamento. O stress pode ser interpretado pelo valor de $R^2 = 1 - S^2$.

A distribuição da variação genética entre e dentro de *H. chartacea*, de acordo com o tratamento utilizando na indução à mutação foi quantificada pela análise da variância molecular (AMOVA) pelo programa Genes (CRUZ, 2013).

A abordagem bayesiana implementada no software Structure v.2.4 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizada para revelar a estrutura dos genótipos de *H. chartacea*. O número de iterações utilizadas no burn-in e MCMC (Markov Chain Monte Carlo) foram de 50.000 e 100.000, respectivamente. Nas análises, foi considerado o modelo de mistura com frequências correlacionadas e testados valores de agrupamento (K) variando de 1 à 7 com quatro

repetições idênticas para cada valor de K testado. O valor mais provável de K foi determinado pelo critério ΔK descrito por Evanno et al. (2005). Para o cálculo do valor ΔK foi utilizado o programa Structure Harvester (EARL; VONHOLDT 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica

Os genótipos foram avaliados por 49 descritores, sendo 47 descritores qualitativos e 2 descritores quantitativos (diâmetro do pseudocaule e comprimento da terceira folha). Dos 47 descritores qualitativos, apenas 28 apresentaram poder de discriminar os indivíduos: ALP, CPC, CER, IAN, LFO, LIM, CFI, CFS, TCP, CMP, CLD, CLV, FBL, CBL, CIB, PIH, CI, TR, LI, FE, CEB, CRA, CBE, CBI, CSE, CPE, OCI e PF.

Por meio do gráfico de dissimilaridade (Figura 8) foi possível observar a formação de pelo menos três grupos distintos. Estas diferenças puderam ser melhor observadas também nas colorações das inflorescências obtidas em alguns dos genótipos (29,32 e 35) destes grupos, conforme representado na Figura 9, onde o coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,8235$. A linha horizontal tracejada representa o corte estimado pelo método de Mojema (1977).

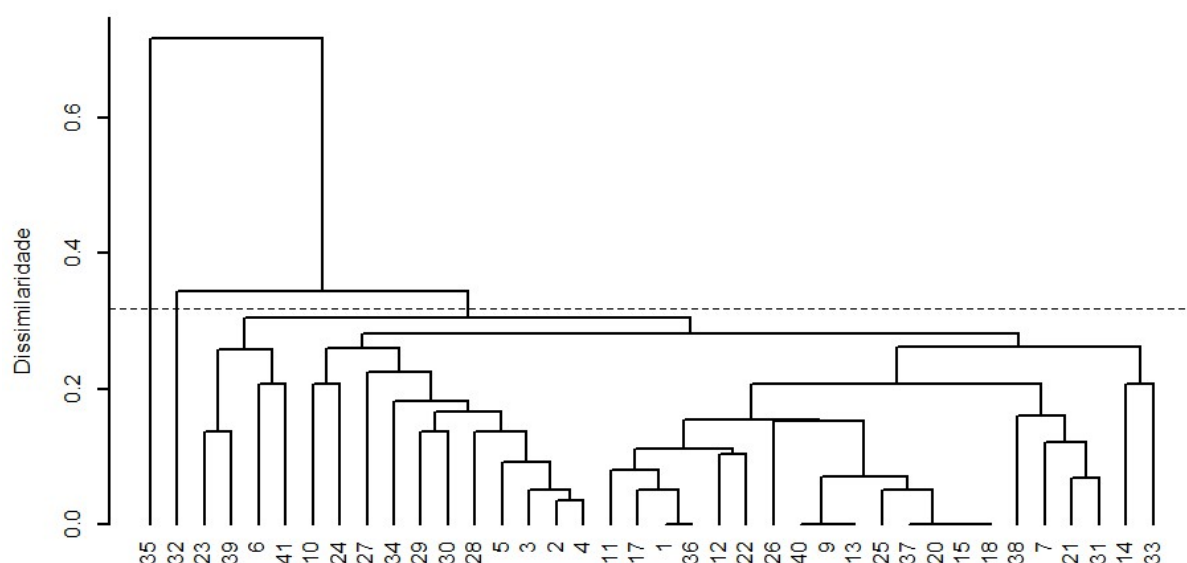


Figura 8: Análise de agrupamento UPGMA, a partir das dissimilaridades de 38 genótipos de *H. chartacea*, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e o complemento aritmético do índice de coincidência simples. Manaus, AM. 2017.



Figura 9: Inflorescências de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. (A) Genótipo 29; (B) Genótipo 32; (C) Genótipo 35. Manaus, AM. 2017.

A análise de descritores morfológicos qualitativos pelo método de otimização de Tocher, permitiu a formação de apenas dois grupos distintos (Tabela 4). O genótipo 35, foi o único a permanecer sozinho em um único grupo, evidenciando assim que o mesmo possui caracteres morfológicos distintos dos demais. Para Cruz; Carneiro (2006), grupos formados por apenas um genótipo, apontam na direção de que tal indivíduo seja mais divergente em relação aos demais.

Tabela 4: Agrupamento dos genótipos de *H. chartacea* pelo método de otimização de Tocher, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e o complemento aritmético do índice de coincidência simples. Manaus, AM. 2017.

Grupos	Genótipos
1	1, 36, 17, 20, 37, 15, 18, 13, 40, 9, 25, 11, 26, 22, 7, 31, 21, 5, 12, 38, 3, 28, 4, 34, 2, 30, 33, 29, 27, 39, 6, 23, 10, 14, 24, 41, 32
2	35

As diferenças morfológicas ficam ainda mais evidenciadas na figura 10, pela representação gráfica dos dados de dissimilaridades dos 38 genótipos de *H. chartacea*,

baseado em caracteres morfológicos qualitativos, quantitativos e algoritmo de Gower, pelo método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,8552$. A linha horizontal tracejada representa o corte estimado pelo método de Mojema (1977).

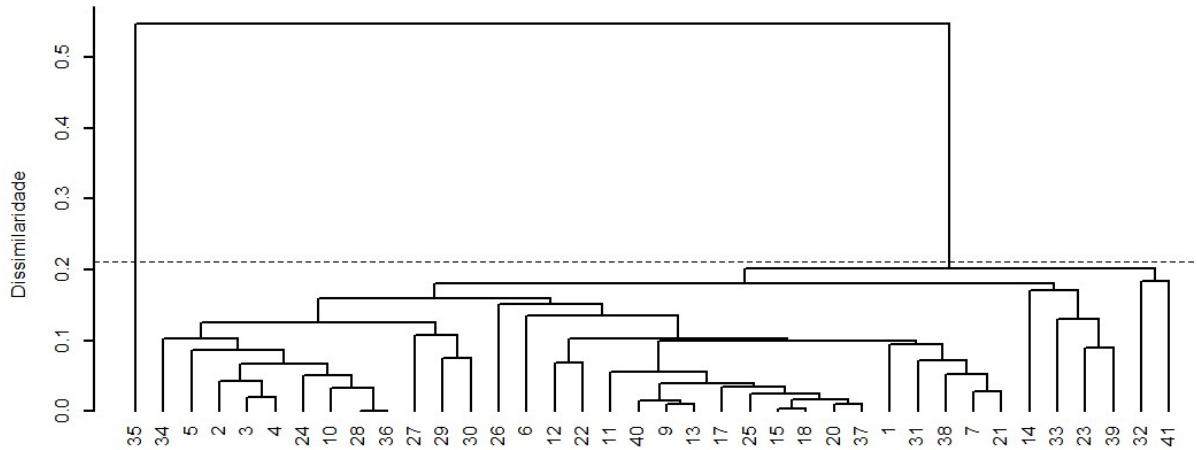


Figura 10: Análise de agrupamento UPGMA, a partir das dissimilaridades de 38 genótipos de *H. chartacea*, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e quantitativos e algoritmo de Gower. Manaus, AM. 2017.

A representação filogenética proporcionada pelo método UPGMA foi semelhante a formalização dos grupos pelo método otimização de Tocher (Tabela 4) para os caracteres qualitativos, onde apenas o genótipo 35 ficou separado em um grupo isolado.

Considerando a análise conjunta dos descritores morfológicos qualitativos e quantitativos, também foi possível agrupar geneticamente os genótipos estudados, porém observamos a divisão em 3 grupos distintos (tabela 5). O grupo 1 reuniu a maioria dos genótipos enquanto que o grupo 3 foi composto apenas pelo genótipo 35.

Tabela 5: Agrupamento dos genótipos de *H. chartacea* pelo método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo algoritmo de Gower. Manaus, AM. 2017.

Grupos	Genótipos
1	28, 36, 15, 18, 20, 37, 25, 9, 40, 13, 17, 11, 22, 7, 21, 5, 31, 38, 1, 12, 6, 39, 4, 3, 2, 27, 30, 29, 34, 24, 14, 33, 23, 26
2	32, 41
3	35

Conforme foi constatado por meio das avaliações morfológicas realizadas, não houve presença de pilosidade no pseudocaule (Tabela 6) em nenhum dos genótipos. A presença de pelos é uma característica importante na produção de helicônias, especialmente quando em excesso, porque vai interferir negativamente nas atividades de manuseio e transporte pós colheita, necessitando de limpeza adicional, já que a presença de pelos promove a retenção de detritos (PEREIRA, 2012; CASTRO et al., 2007).

Tabela 6: Caracterização de 41 genótipos de *H. chartacea*, considerando análise de descritores morfológicos do pseudocaule. Manaus, AM. 2017.

Genótipos	ALP	DPC (cm)	CPC	CER	IAN	Genótipos	ALP	DPC (cm)	CPC	CER	IAN
1	Médio	34.44	Verde escuro	Muita	Fraca	23	Grande	30.00	Verde escuro	Muita	Fraca
2	Médio	36.25	Verde médio	Muita	Aus.	24	Médio	28.50	Verde claro	Muita	Aus.
3	Médio	36.00	Verde médio	Muita	Aus.	25	Médio	26.08	Verde médio	Muita	Média
4	Médio	35.00	Verde médio	Muita	Aus.	26	Médio	58.22	Verde médio	Muita	Média
5	Médio	23.32	Verde médio	Muita	Aus.	27	Grande	26.50	Verde médio	Muita	Aus.
6	Médio	25.99	Verde escuro	Muita	Fraca	28	Médio	27.25	Verde claro	Muita	Aus.
7	Médio	27.25	Verde médio	Muita	Fraca	29	Grande	33.00	Verde médio	Muita	Fraca
9	Médio	29.32	Verde médio	Muita	Fraca	30	Médio	30.00	Verde médio	Muita	Aus.
10	Médio	25.75	Verde claro	Muita	Aus.	31	Médio	29.25	Verde médio	Muita	Média
11	Médio	26.22	Verde médio	Muita	Aus.	32	Grande	26.50	Verde claro	Muita	Média
12	Médio	29.50	Verde médio	Muita	Média	33	Grande	29.50	Verde médio	Muita	Fraca
13	Médio	38.22	Verde médio	Muita	Fraca	34	Médio	26.50	Verde médio	Muita	Aus.
14	Grande	27.52	Verde médio	Média	Fraca	35	Médio	28.00	Verde médio	Pouca	Fraca
15	Médio	26.52	Verde médio	Muita	Fraca	36	Médio	27.08	Verde Escuro	Muita	Fraca
17	Médio	26.72	Verde médio	Muita	Fraca	37	Médio	23.78	Verde médio	Muita	Fraca
18	Médio	26.72	Verde médio	Muita	Fraca	38	Médio	28.25	Verde médio	Muita	Aus.
20	Médio	26.00	Verde médio	Muita	Fraca	39	Grande	28.50	Verde escuro	Muita	Fraca
21	Médio	27.25	Verde médio	Muita	Aus.	40	Médio	26.08	Verde médio	Muita	Fraca
22	Médio	28.99	Verde médio	Muita	Fraca	41	Grande	35.16	Verde escuro	Muita	Fraca

ALP = Altura da planta; DPC = Diâmetro do pseudocaule; CPC = Cor do pseudocaule; CER = Cerosidade do pseudocaule; IAN = Intensidade de antocianina. **Não polimórficas:** Pilosidade do pseudocaule (PIL): ausente

A variação morfológica naturalmente observada entre indivíduos e populações de helicônias é expressiva e tem dificultado a identificação taxonômica dentro do grupo. Isto torna quase impraticável o uso de chaves de identificação das espécies sem fotografias coloridas e por esta razão foi adotado a Carta de cores de Munsell (2012), para classificar estes genótipos poliploides, pois possibilita a detecção de nuances de coloração e garante a repetibilidade das avaliações e análises.

A altura das plantas (ALP) de todos os genótipos foi superior a 1,5 m, o que pode dificultar no manuseio e preparo das hastes florais durante a pós-colheita, porém esta é uma característica já relatada para esta variedade e os valores obtidos para o comprimento das hastes florais estão dentro do exigido pelo mercado de acordo com Albuquerque et al. (2010). Mesmo apresentando altura superior a 1,5 m observamos que o clone 18 (Figura 11) apresentou estatura menor que os demais, assim como inflorescências reduzidas. Esta característica pode ser melhor explorada em projetos de paisagismo que apresentem composição florística em ambientes reduzidos, ou mesmo para compor arranjos florais com distintos níveis.



Figura 11: Alterações Altura da planta e no tamanho da inflorescência do genótipo 18, de *H. chartacea* var. Sexy Pink.

Hastes grandes, com comprimento acima de 1,5 m, necessitaram de um manuseio cuidadoso para evitar tombamento ou rupturas indesejáveis. Hastes de grande tamanho, ocorrem predominantemente nas espécies com inflorescências pendentes, embora também tenham sido observadas em outras espécies de helicônias como *H. aurea*, *H. bihai*, *H. bourgaeana*, *H. caribaea*, *H. pseudoamygdiana*, e *H. velloziana* (ANDERSSON, 1981, 1985, 1989; ARISTIGUIETA, 1961; DANIELS; STILES, 1979; SANTOS, 1978).

Em relação ao diâmetro do pseudocaule (DPC), observa-se na Tabela 6 que houve uma grande variação, de 23,32 mm (genótipo 5) à 58,22 (genótipo 26). De acordo com Lamas

(2002) e Farias et al. (2013), o DPC merece atenção devido a sua influência na resistência da flor, manuseio, seleção, embalagem e durabilidade pós colheita. Estudo realizado por Castro et al. (2007) com 30 genótipos de helicônias, classificou hastes florais de *H. chartacea* como grandes, o que indica um alto grau de dificuldade para o manuseio e exigindo cuidados especiais, para o embalamento e transporte.

Ambas características, diâmetro e o comprimento da haste, têm grande importância na resistência da flor aos ventos enquanto estas estão no campo, no transporte do campo para o local de tratamento pós colheita das hastes florais, seleção, embalagem e à durabilidade pós-colheita, visto que hastes com diâmetros maiores são também mais rígidas. De acordo com Albuquerque et al. (2010) e Guimarães et al. (2010), isto se deve também a reserva de carbono contida na haste, utilizada para prolongar a longevidade potencial das flores. Neste sentido, Hermans et al. (2006) e Castro et al. (2007) afirmam que quanto maior o comprimento e o diâmetro da haste, maior também será a durabilidade pós colheita.

Uma explicação a variação no diâmetro das hastes, se dá justamente pela ação da duplicação cromossômica nos genótipos avaliados. Vakili (1967) utilizou a colchicina para induzir a poliploidia em plantas de bananeira e observou que o agente antimitótico aumentou a taxa de mortalidade e retardou o crescimento das plantas, mas induziu a duplicação do número de cromossomos. De acordo com o autor, as plantas tetraplóides eram mais altas e mais robustas do que as plantas diploides, mas cresciam mais lentamente com folhas mais inclinadas e sistema radicular menos desenvolvido.

A presença de cerosidade em grande quantidade foi constante na maioria dos genótipos avaliados (Figura 12 A), com exceção do genótipo 35 (Figura 12 B), que apresentou cerosidade nos pseudocauls mais jovens e conforme se desenvolviam perdiam esta característica. Pereira (2012) avaliando progênies de meio irmãos de *Heliconia* ssp. observou que esta característica se mantinha nos híbridos avaliados, no entanto, apenas os híbridos provenientes de *H. chartacea* apresentaram cerosidade no pecíolo das folhas. Tais resultados são apresentados por Borém; Miranda (2005), onde o autor salienta que uma das teorias da herdabilidade é que as características que se desenvolvem em um curto período de tempo estariam menos sujeitas as variações do ambiente e, dessa forma, apresentariam maior herdabilidade do que as sujeita a um maior período durante a vida da planta. Como as helicônias são espécies de ciclo curto, estando assim por menos tempo em campo e sofrendo menos interferência do ambiente, estas características estão mais evidentes.



Figura 12: Pseudocaule de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. (A) Genótipo 27, (B) Genótipo 35. Setas mostram a presença de cerosidade. Manaus, AM. 2017.

É importante salientarmos a importância da caracterização de genótipos pelos descritores morfo-agronômicos, uma vez que este conhecimento permite a adoção quase que imediata de genótipos com características de interesse por parte dos produtores e programas de melhoramento da espécie ou mesmo para discriminação, identificação e caracterização de genótipos potenciais para serem designados como variedades (BLIND, 2016; JOSHI et al., 2010; PRAKASH et al., 2014).

Outro descritor morfológico avaliado e que apresentou resultado atrativo para o mercado foi a alteração do limbo foliar do genótipo 35. Pudemos constatar que, ao contrário do que se pode observar nas plantas do tratamento controle e nos demais genótipos avaliados (Figura 13 A), o genótipo 35 se apresentou com as bordas do limbo inteiras e com coloração mais vívida (Figura 13 B), característica esta que aumenta as possibilidades de utilização deste genótipo no paisagismo, uma vez que visualmente, ele se torna mais atrativo. A presença de cera na face superior e inferior do limbo foliar foi observada também exclusivamente nos indivíduos deste genótipo, o que confere a estes indivíduos uma proteção extra contra as perdas por transpiração.



Figura 13: Alterações no limbo foliar de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. (A) Genótipo 12, (B) Genótipo 35. Manaus, AM. 2017.

Por outro lado, observamos que durante a floração do clone 26 (Figura 14) foi verificado a perda das folhas por necrose, um aspecto morfológico crucial. As folhas são os tecidos de maior eficiência fotossintética que irão produzir fotoassimilados que são transportados para as regiões dreno e propiciarão melhores florações. Outro ponto a ser considerado é que uma das principais causas fisiológicas de deterioração dos produtos vegetais é a perda de água, que provoca amarelecimento, enrugamento dos tecidos e, consequentemente, perda de valor comercial.

A maior parte dos vegetais possui entre 80 a 90% de umidade em relação ao peso, uma vez que há ausência de folhagem, as taxas fotossintéticas serão extremamente reduzidas diminuindo o tempo de permanência destas inflorescências no campo e a manutenção das touceiras, isso porque o vapor de água produzido pelo processo de respiração celular, tende a escapar pelos espaços intercelulares levando a deterioração prematura dos produtos (HARDENBURG et al., 1986).



Figura 14: Alterações no limbo foliar de *H. chartacea* var. Sexy Pink. (A,B) Genótipo 26. Setas indicam a perda das folhas. Manaus, AM. 2017.

As avaliações do comprimento da terceira folha (CFO) demonstraram uma variação de 57,56 cm (genótipo 40) à 94,50 cm (genótipo 34) e apenas o genótipo 6 apresentou folhas com largura superior a 30 cm (Tabela 7).

Dentre os descritores correspondentes a área foliar evidenciados na Tabela 7, não foi apresentado variação para: Posição das folhas (PFO); Presença de manchas no limbo da muda (PML); Forma da base do pecíolo (FBP); Margem da base escariosa (MBE) e Forma da Margem do pecíolo (FMP). Neste caso, todos os genótipos apresentaram folhas arcadas, sem manchas, com pecíolo estreito de margens eretas e fechadas e ausência de base escariosa.

Inúmeros parâmetros subjetivos, como beleza, exotismo e coloração contrastante, têm sido citados nos trabalhos com plantas ornamentais, como atributos utilizados para a indicação de uso de uma espécie como flor de corte, porém, uma série de caracterizações se fazem necessárias para padronização destas para o produtor e consequentemente para o consumidor final. Segundo Broschat et al. (1984), as inflorescências podem ser colhidas quando atingirem adequado estágio de maturidade, pois a abertura adicional das brácteas não ocorre após o corte. Desse modo, as helicônias dependendo do efeito desejado, devem ser colhidas, quando uma a três brácteas estejam abertas.

Tabela 7: Caracterização de 41 genótipos de *H. chartacea*, considerando análise de descritores morfológicos da folha. Manaus, AM. 2017.

Genótipo	CFO	LFO	LIM	CFI	CFS	TCN	CMP	CLD	CLV	FBL	CBL	CIB
1	70.87	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
2	79.50	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Am. esver.
3	83.75	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Am. esver.
4	80.50	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde escuro	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Am. esver.
5	76.10	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde escuro	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
6	73.10	Larga	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
7	79.75	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
9	67.77	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
10	85.75	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Am. esver.
11	82.69	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
12	85.00	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
13	65.74	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
14	67.82	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Am. esver.
15	85.82	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
17	87.24	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
18	82.24	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
20	71.00	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
21	80.50	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
22	80.43	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
23	79.25	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde claro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
24	81.00	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Am. esver.
25	76.56	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
26	73.36	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
27	84.50	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
28	87.75	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
29	85.25	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
30	83.50	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
31	93.00	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
32	87.00	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Am. esver.
33	91.00	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
34	94.50	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Verde	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
35	83.00	Mediana	Não Rasgado	Verde médio	Verde escuro	Verde claro	Púrpura	Média	Média	Amb. Afíadas	Variável	Verde médio
36	88.56	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Purpura	Aus	Aus	Amb. redondas	Variável	Verde claro
37	61.37	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Verde claro	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
38	80.25	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde médio
39	78.25	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro
40	57.56	Mediana	Rasgado	Verde médio	Verde médio	Am. esver.	Púrpura	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Variável	Verde claro
41	83.73	Mediana	Rasgado	Verde escuro	Verde escuro	Verde médic	Verm.rosado	Aus.	Aus.	Amb. redondas	Desiguais	Verde claro

CFO = Comprimento da terceira folha; LFO = Largura da terceira folha; LIM = Limbo; CFI = Cor verde da face inferior da folha; CFS = Cor verde da face superior da folha TCN = Tonalidade da cor da face inferior da nervura principal; CMP = Cor da margem do pecíolo; CLD = Cerosidade do limbo na superfície dorsal da folha; CLV = Cerosidade do limbo na superfície ventral da folha; FBL = Forma da base do limbo; CBL = Comparação das dimensões da base do limbo; CIB = Cor interna das bainhas.

Albuquerque et al. (2010) relata sobre a importância e do interesse que compradores e empresários do segmento da Floricultura Tropical de corte têm demonstrado em padronizar o

tamanho da haste de flores tropicais visando ao consumidor final. Estes autores fornecem uma lista para classificação por escala de pontos que permite a definição das espécies em pouco adequadas (abaixo de 25 pontos), moderadamente adequadas (entre 25 e 35 pontos) e adequadas (acima de 35 pontos) ao uso como flores de corte. Seguindo estes parâmetros, a *H. chartacea* é classificada como moderadamente adequada, devido as inúmeras restrições em todos os aspectos avaliados, destacando se as dificuldades de embalagem, esta característica também foi relatada por Watson; Smith (1979).

Os dados apresentados na Tabela 8 mostram que mais uma vez o genótipo 35 se destacou dos demais em relação a posição da inflorescência. A *H. chartacea* var. Sexy Pink apresenta inflorescências pendentes, o genótipo 35 por sua vez produziu inflorescências eretas, e mais compactas, com menos de 40 cm de comprimento (CI), o que segundo Albuquerque et al. (2010), colocaria este genótipo em um outro nível e o classificaria como “adequado” para a comercialização como flor de corte.

Os demais genótipos necessitariam de um embalagem individual em função do seu tamanho, o que exigiria um manuseio cuidadoso para evitar a ruptura do eixo onde se inserem as brácteas, já que os genótipos apresentaram torção da ráquis o que tornaria o processo de preparo pós colheita excessivamente lento, além do uso de proteção às brácteas, recursos que incluem um componente adicional ao preço de venda.

Para os descritores das inflorescências não houve polimorfismo para: Comprimento da 2ª bráctea (CB): média; Largura da segunda bráctea (LB): estreita; Ângulo da 1ª bráctea em relação ao pedúnculo (ABP): $> 90^\circ$; Visualização da ráquis (VR): Visível; Forma do ápice da bráctea (FAB): afilado; Pilosidade das brácteas (PB): ausente; Simetria da bráctea (SB): Assimétrica; Número de brácteas na inflorescência madura (NBI): Média; Cor da base do perigônio (CBP): Creme; Cor dos lóbulos do perigônio (CLP): laranja-amarelada; Presença de antocianina no perigônio (PAP): ausente; Presença de Pólen (PPO): ausente; Ovário: Cor do fruto maduro (OCM): azul arroxeado.

Tabela 8: Caracterização de 41 genótipos de *H. chartacea*, considerando análise de descritores morfológicos da inflorescência. Manaus, AM. 2017.

Genótipos	PIH	CI	TR	LI	FE	CEB	CRA	CBE	CBI	CSE	CPE	OCI	PF
1	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa escuro	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
2	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
3	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
4	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
5	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
6	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde escuro	Verde escuro	Creme	Longo
7	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa alaran.	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
9	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
10	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa escuro	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
11	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa escuro	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
12	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa escuro	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Médio
13	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID
14	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Pouca	Rosa alaran.	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
15	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
17	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa escuro	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
18	Pendente	Média	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
20	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID
21	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa alaran.	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
22	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa bebê	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
23	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Pouca	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa claro	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
24	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa alaran.	Rosa alaran.	Rosa claro	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
25	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
26	Pendente	Grande	Pres.	Média	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa claro	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
27	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa claro	Rosa claro	Rosa claro	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
28	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa bebê	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
29	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Média	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
30	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Pouca	Rosa escuro	Rosa alaran.	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
31	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa alaran.	Rosa bebê	Verde médio	Verde médio	Creme	Longo
32	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa alaran.	Rosa bebê	Am. esver.	Am. esver.	Creme	Longo
33	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Pouca	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde claro	Verde médio	Am.	Longo
34	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Pouca	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa bebê	Verde escuro	Verde escuro	Creme	Longo
35	Ereta	Média	Aus.	Média	Pres.	Pouca	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Am. esver.	Am. esver.	Creme	Longo
36	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID
37	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID
38	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa alaran.	Rosa bebê	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
39	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa claro	Rosa alaran.	Verde claro	Verde claro	Creme	Longo
40	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID	NID
41	Pendente	Grande	Pres.	Larga	Variável	Muita	Rosa escuro	Rosa escuro	Rosa bebê	Verde escuro	Verde escuro	Creme	Médio

PIH = Posicionamento da inflorescência em relação a haste; CI = Comprimento da inflorescência; TR = Torção da ráquis; LI = Largura da inflorescência; FE = Folha na extremidade (1ª bráctea); CEB = Cerosidade das brácteas; CRA = Cor da ráquis; CBE = Cor da bráctea externa; CBI = Cor da bráctea interna; CSE = Cor da Sépala; CPE = Cor da Pétala; OCI = Ovário: Cor do fruto imaturo; PF = Período de florescimento. *NID = Não identificado – Os genótipos não emitiam floração até o fim da avaliação.

Os genótipos 13, 20, 36, 37 e 40, ao final dos dois anos do período de avaliação, ainda não haviam emitido inflorescências (Tabela 8). As helicônias são flores tropicais de corte e a haste floral é o produto final de importância comercial utilizada em arranjos e preparo de

buquê, desta forma para o produtor o maior número de haste floral representa menor custo de produção, maior competitividade e maior rentabilidade. Conforme Broschat; Donselman (1983), as espécies neotropicais de helicônias, produzem inflorescências terminais, após a emissão de 4 a 5 folhas, o que não foi observado para estes genótipos. Como a *H. chartacea* apresenta as bordas do limbo rasgadas e os genótipos 13, 20, 36, 37 e 40 não apresentaram inflorescência, uma outra utilização para estes clones seria a composição paisagística como folhagens, já que sua exotividade permite esta finalidade.

O comprimento da bráctea (CB) classificado como médio (11 a 40 cm) é importante, devido normalmente representar o maior destaque nos arranjos de flores e, por conseguinte, na apreciação do cliente. Como não houve alterações nesta característica, podemos afirmar que não houve perda de uma das principais características comerciais desta espécie.

A ausência de pilosidade nas brácteas (PB), é uma característica positiva, isso porque a presença de pelos interfere sobretudo no manuseio, preparo e transporte. O prejuízo ao manuseio se deve ao fato de ocorrer à formação de uma camada protetora nas brácteas, que pode minimizar os benefícios do tratamento de condicionamento efetuado para a retirada do calor de campo e restauração da turgescência de flores colhidas. A camada pilosa pode também abrigar pequenos insetos, resíduos de inseticidas e partículas de pó, acarretando em um intenso manuseio e preparo, aumentando os custos de produção. Outro ponto negativo da presença de pilosidade em relação ao transporte é que o atrito das inflorescências ocasiona a queda localizada de pelos em algumas brácteas, prejudicando o aspecto da inflorescência e comprometendo sua qualidade. Adicionalmente Broschat; Donselman (1983) alertam para a necessidade de embalagens que se mantenham secas para um transporte adequado, e a pilosidade permite o armazenamento nas brácteas de excessiva umidade, podendo migrar para as embalagens.

As Figuras 15 e 16, apresentam as inflorescências dos 33 genótipos que obtiveram floração ao final das avaliações, onde é possível observar particularidades entre os genótipos e destacar aspectos desejáveis.



Figura 15: Inflorescências dos genótipos de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. De 1 à 25: Genótipos poliploides. Manaus, AM. 2017.



Figura 16: Continuação. Inflorescências dos genótipos de *H. chartacea* var. Sexy Pink advindas de ensaio de indução da poliploidia in vitro por duplicação somática pela utilização da colchicina. De 26 a 41: Genótipos poliploides. 42: Área de cultivo. Manaus, AM. 2017.

O período para emissão da primeira inflorescência variou bastante entre os genótipos. Seguindo a caracterização proposta por Guimarães et. al. (No prelo), os genótipos 12 e 41 apresentaram inflorescência até oito meses após o plantio (sete e oito meses respectivamente) e foram assim classificados como pertencentes ao grupo de floração comum período médio, enquanto os demais genótipos floraram somente após os oito meses, sendo assim classificados como possuindo período para floração longo.

Lamas (2002), enfatiza que o ponto de colheita de uma flor equivale a um estágio de abertura em que esta poderá completar seu desenvolvimento com sua colocação somente em água. Este estágio de desenvolvimento necessário para colheita varia muito em função da região, época do ano, condições de cultivo (campo ou estufa), variedade e distância do

mercado. Portanto, a colheita deve seguir recomendações regionais, atendendo padrões de qualidade definidos especificamente para cada material vegetal o que sustenta esse tipo de caracterização feito para estes genótipos poliploides.

6.2 Caracterização Estomática

A importância de se conhecer o valor dos parâmetros genéticos para estes caracteres poderá contribuir para futuros programas de melhoramento genético em helicônias. Como os dados apresentaram distribuição normal (teste de Lilliefors), nenhuma transformação foi necessária. Os caracteres que apresentam o CVg superior ao CVe indicam melhores condições para ganhos na seleção através de métodos simples de melhoramento, como a seleção massal (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992). As estimativas do CVg são de suma importância por expressar a quantidade de variação existente entre os genótipos. Deste modo, a variação genética dos genótipos, apesar dos baixos índices obtidos, pôde ser confirmada, existindo a possibilidade de ganhos expressivos no processo de produção de muda da espécie. A razão entre CVg/CVe assumiu valores superiores à unidade (1,08) para densidade estomática (Tabela 9), valores considerados ideais para a seleção segundo Cruz; Carneiro (2014).

Tabela 9: Quadrados médios e parâmetros genéticos referentes à densidade estomática (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DQ) e a funcionalidade estomática (FUN), avaliados em 37 genótipos de *H. chartacea*. Manaus, AM. 2017.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios			
		DE	DP	DQ	FUN
Genótipo (C)	36	4254,8177 ^{ns}	6,9917**	6,4243**	0,0876**
Região da folha (R)	1	3361480,1521**	262,3650**	69,4693**	0,0000 ^{ns}
CxR ¹	36	3240,8273**	3,0500**	1,3582 ^{ns}	0,0252 ^{ns}
Resíduo	148	145,2623	1,5506	1,0253	0,0247
Parâmetros genéticos					
Média		136,9350	19,6232	10,6391	1,8638
CVe (%) ²		8,80	6,35	9,52	8,43
Var. Genotípica		168,9984	0,6569	0,8443	0,0104
Componente de variância CxR		1031,8550	0,4998	0,1110	0,0002
Var. residual		145,2623	1,5506	1,02526	0,0247
Herdabilidade (%)		23,83	56,37	78,86	71,21
CVg (%) ³		9,4935	4,1304	8,6368	5,4711
CVg/CVe ⁴		1,0786	0,6509	0,9075	0,6491

^{ns}; **, * não significativo, $p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente, pelo teste F. ¹interação genótipos x região da folha; ²Coefficiente de variação experimental; ³Coefficiente de variação genético; ⁴Razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação experimental.

Como pode ser observado na Tabela 9, apenas a densidade estomática (DE) apresentou a razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação experimental maior que a unidade. Neste caso, ganhos seletivos devem ser mais expressivos se praticados para densidade estomática e menores para diâmetro polar dos estômatos e funcionalidade estomática.

As variáveis DP, DQ e FUN apresentaram boa herdabilidade ($> 50\%$), sendo esta uma condição favorável à seleção. Altos valores de herdabilidade sugerem grandes possibilidades de ganho genético, tendo em vista que o progresso esperado com a seleção depende da herdabilidade, da intensidade de seleção e do desvio padrão fenotípico do caráter, segundo Cruz; Carneiro (2014).

Os resultados relacionados à densidade estomática (DE) apresentaram interação entre as regiões da folha e entre os fatores estudados (Tabela 9). O fato da região das folhas ser significativo para DE indica que a densidade estomática é significantemente diferente de acordo com a região da folha avaliada. Do mesmo modo, CxR ser significativo para DE indica que os genótipos têm classificações diferentes de acordo com a região da folha, ou seja, genótipos com maiores densidades estomáticas abaxiais não são aqueles que possuem as maiores DE adaxiais. Observa-se também que não há diferença significativa da DE entre os genótipos estudados.

As mensurações de DP e DQ também se mostraram altamente significativa, porém, apenas a DP apresentou interação entre os fatores. O DQ é uma importante característica adaptativa das plantas em situação de estresses em relação aos seus estômatos. Khan et al., (2003) afirmam que alterações na forma dos estômatos afeta diretamente a funcionalidade dos mesmos, visto que a forma mais elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto que a forma mais esférica está, frequentemente, associada a estômatos com baixa funcionalidade e de igual maneira, ambas formas são obtidas de acordo com o maior ou menor DQ respectivamente.

Estudos semelhantes foram realizados por Yukawa et al., (1992), que avaliaram diferenças no DQ dos estômatos do gênero *Dendrobium*, e observaram variações entre diferentes indivíduo bem como entre os indivíduos da mesma espécie. Para estes autores o diâmetro equatorial pode ser vantajoso como marcador taxonômico de espécies. Yordanova et al., (2005) também observaram alterações no DQ de estômatos de cevada (*Hordeum vulgare*)

em situação de alagamento, entretanto, Striker et al. (2005), não identificaram mudanças na quantidade e no tamanho de estômatos em legumes de regiões alagadas. Desta forma, pode-se sustentar que as modificações estomáticas não são muito claras para todas as espécies, mesmo expostas ao mesmo tipo de alteração ambiental, e que estudar alteração anatômica dos estômatos com diferentes situações, pode contribuir tanto na caracterização de diferentes materiais cultivados quanto sua adaptabilidade em condições adversas.

Observando a tabela 10, onde é apresentada a matriz de correlação entre as variáveis relacionadas as análises estomáticas, é possível verificar que existe boa correlação ($r \geq 0,5$) entre os descritores diâmetro polar (DP) dos estômatos e diâmetro equatorial (DQ) dos estômatos. Esta correlação é comum, visto que quanto maior o diâmetro polar, maior será a abertura do estômato e conseqüentemente o diâmetro equatorial do mesmo.

Quanto menor for a correlação entre variáveis, menor será seu aproveitamento para capacidade combinatória de caracteres. As correlações que apresentaram valores $r \leq 0$, indicam dificuldade para aprimoramento combinatório de tais características, visto que há predominância de atuação para o componente ambiental. Ainda nessa diretriz, podemos destacar a funcionalidade estomática (FUN), que apresentou correlação negativa com o diâmetro equatorial, tanto na parte abaxial quanto na parte adaxial das folhas. Segundo Miglioranza; Oliveira (2013), a relação entre os DQ e FUN fornece um bom indicativo do formato dos estômatos, e a relação com a taxa transpiratória das plantas.

De acordo com os resultados desta pesquisa, podemos deduzir que estômatos menos elipsoides possuem maior funcionalidade e podem apresentar uma menor transpiração, embora não tenha sido testada neste trabalho esta hipótese. O importante dos resultados da FUN está na redução da transpiração (BARRIOS; HERNÁNDEZ, 2003; SOUZA et al., 2010). Vários autores têm relatado que a redução da transpiração foi observada em plantas que apresentaram alta funcionalidade estomática (BOEGER, WISNIEWSKI, 2003; SANTIAGO et al., 2001; SOUZA et al., 2007; CASTRO et al., 2009).

Tabela 10: Coeficientes de correlação entre a densidade estomática (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DQ) e a funcionalidade estomática (FUN), avaliadas em 37 genótipos de *H. chartacea* nas regiões adaxial⁽¹⁾ e abaxial⁽²⁾ das folhas.

Caracteres	DP ¹	DQ ¹	FUN ¹	DE ²	DP ²	DQ ²	FUN ²
DE ¹	- 0,0348	- 0,1941	0,1679	0,5405**	- 0,1411	- 0,1062	0,0568
DP ¹		0,5452**	0,1422	- 0,0819	0,3994*	0,3880*	- 0,2600
DQ ¹			- 0,7446**	- 0,2103	0,6014**	0,7093**	- 0,6504**
FUN ¹				0,1347	- 0,3633*	- 0,5082**	0,5572**
DE ²					- 0,2139	- 0,0693	- 0,1033
DP ²						0,8773**	- 0,5728**
DQ ²							- 0,8888**

**, * : Significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

Os estômatos dos genótipos apresentaram morfologia tetracítica e células-guarda sem alterações significativas; porém, possuíram uma menor densidade estomática, além de um tamanho maior que os estômatos apresentados pelo tratamento controle (Figura 17; Tabela 11). Estas diferenças no tamanho e número de estômatos por área têm sido características comuns apresentadas por diversos materiais vegetais submetidos à poliploidização, sendo utilizadas como características base na identificação de indivíduos poliploides em diversos estudos (CAVALCANTE FILHO, 2011; GLOWACKA et al., 2010; VIEHMANNOVÁ et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

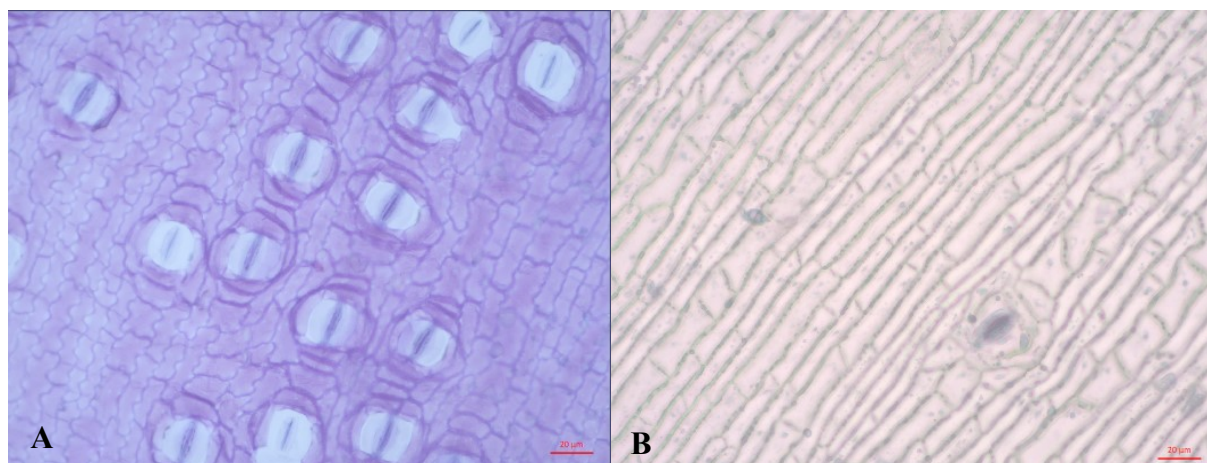


Figura 17: Formato dos estômatos e das células guarda dos genótipos poliploides de *H. chartacea* var. Sexy Pink, na parte Abaxial (A) e Adaxial (B). Barra = 20 µm. Manaus, AM. 2017.

As maiores DE foram observadas nos genótipos 1 e 14 para parte adaxial das folhas enquanto que para parte abaxial, os genótipos 10, 12 e 14 foram os que apresentaram valores mais elevados. Os menores valores foram verificados nos genótipos 7 e 35 para parte adaxial e 7 e 13 para parte abaxial das folhas. O genótipo 7 foi o único que apresentou os menores

valores de DE tanto na parte adaxial quanto abaxial das folhas, com 1,43 e 150,79 estômatos por milímetro quadrado respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11: Médias estimadas da densidade estomática (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DQ) e a funcionalidade estomática (FUN), avaliadas em 37 genótipos de *H. chartacea* em diferentes regiões da folha. Manaus, AM. 2017.

Genótipos	Regiões da folha							
	Adaxial				Abaxial			
	DE	DP	DQ	FUN	DE	DP	DQ	FUN
1	28,57 a ¹	21,78 a	10,24 b	2,13 a	249,52 d	17,20 b	9,35 b	1,95 a
2	11,27 d	20,84 a	11,34 a	1,85 b	260,79 c	19,73 a	10,54 a	1,88 a
3	18,73 b	20,30 b	11,93 a	1,72 b	264,13 c	17,45 b	9,19 b	1,90 a
4	10,00 d	18,66 b	10,31 b	1,83 b	268,41 c	16,84 b	8,91 b	1,89 a
5	9,43 e	21,59 a	12,21 a	1,77 b	287,30 b	20,09 a	11,43 a	1,76 b
6	10,95 d	19,09 b	10,73 b	1,78 b	239,37 d	17,22 b	8,86 b	1,96 a
7	1,43 f	22,73 a	11,38 a	2,00 a	150,79 g	19,35 a	10,21 a	1,90 a
9	16,67 c	19,56 b	10,66 b	1,84 b	299,05 b	16,23 b	7,93 b	2,06 a
10	20,16 b	20,50 a	10,23 b	2,01 a	385,87 a	18,78 a	10,89 a	1,73 b
11	15,56 c	19,94 b	11,29 a	1,77 b	289,37 b	19,08 a	10,75 a	1,78 b
12	16,03 c	19,47 b	10,01 b	1,95 a	365,56 a	17,13 b	8,77 b	1,95 a
13	11,11 d	20,56 a	10,72 b	1,94 a	159,05 g	19,18 a	9,34 b	2,07 a
14	31,90 a	20,54 a	10,40 b	1,98 a	358,57 a	18,73 a	9,91 b	1,89 a
15	6,67 e	19,09 b	8,90 b	2,19 a	207,46 e	17,85 b	8,87 b	2,01 a
17	14,13 d	19,69 b	11,52 a	1,71 b	276,03 c	16,56 b	8,92 b	1,86 a
18	7,14 e	20,09 b	10,62 b	1,90 a	258,10 c	18,26 b	9,73 b	1,89 a
20	17,94 b	20,78 a	12,63 a	1,65 b	268,57 c	19,90 a	11,54 a	1,72 b
21	11,75 d	19,79 b	9,82 b	2,02 a	287,46 b	15,37 b	7,32 b	2,11 a
22	7,62 e	22,18 a	12,38 a	1,80 b	260,63 c	17,57 b	10,98 a	1,62 b
23	11,59 d	21,20 a	12,45 a	1,70 b	218,57 e	19,85 a	11,98 a	1,66 b
24	18,73 b	20,98 a	10,88 b	1,93 a	309,68 b	19,08 a	10,85 a	1,76 b
25	7,94 e	21,30 a	11,28 a	1,89 a	237,78 d	18,03 b	10,66 a	1,69 b
26	18,89 b	21,09 a	11,00 b	1,92 a	242,38 d	16,03 b	8,27 b	1,94 a
27	14,76 c	18,19 b	10,43 b	1,76 b	224,29 e	17,82 b	9,08 b	1,98 a
28	17,94 b	21,17 a	11,88 a	1,80 b	275,24 c	19,62 a	11,07 a	1,77 b
29	11,07 d	20,77 a	11,30 a	1,86 b	244,13 d	18,82 a	9,57 b	1,97 a
30	16,35 c	21,53 a	11,85 a	1,82 b	269,05 c	18,84 a	10,97 a	1,72 b
31	19,37 b	21,79 a	11,83 a	1,84 b	264,60 c	19,80 a	11,19 a	1,79 b
32	18,57 b	21,29 a	11,30 a	1,88 a	251,43 d	18,59 a	10,33 a	1,82 b
33	15,87 c	21,78 a	10,62 b	2,06 a	273,33 c	18,89 a	8,99 b	2,10 a
34	8,25 e	21,10 a	11,73 a	1,80 b	307,46 b	19,87 a	12,20 a	1,63 b
35	0,79 f	20,75 a	12,74 a	1,64 b	183,97 f	20,97 a	12,48 a	1,68 b
36	11,59 d	21,28 a	12,59 a	1,70 b	196,35 f	21,24 a	12,31 a	1,73 b
38	13,65 d	22,17 a	11,75 a	1,89 a	258,89 c	20,24 a	11,09 a	1,83 b
39	9,84 d	23,62 a	11,72 a	2,02 a	270,95 c	17,80 b	8,37 b	2,13 a
40	19,84 b	20,23 b	11,40 a	1,78 b	246,35 d	20,16 a	11,65 a	1,73 b
41	11,59 d	18,85 b	10,25 b	1,88 a	209,05 e	17,70 b	8,46 b	2,09 a
Média	13,88	20,71	11,2	1,86	259,99	18,54	10,08	1,86
CVe (%)	14,87	6,34	9,23	8,5	6,56	6,33	9,89	8,4

¹Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott, a 5% de probabilidade; ²Coefficiente de variação experimental.

Castro et al. (2009) relatam que uma maior quantidade de estômatos por unidade de área foliar pode conferir a espécie em estudo, uma alta adaptabilidade a ambientes secos ou de pouca disponibilidade de água. Logo, uma maior DE pode permitir uma abertura estomática em um espaço de tempo menor, permitindo uma captação adequada de CO₂ e reduzindo o tempo em que esses estômatos ficam abertos, diminuindo, consequentemente a transpiração, permitindo uma melhor adaptação das plantas às condições de pouca disponibilidade de água (MIGLIORANZA; OLIVEIRA, 2013).

Uma maior funcionalidade estomática pode ser associada com a redução da transpiração, pois os estômatos se tornam mais elípticos (BATISTA et al., 2010; CASTRO et al., 2009; SOUZA et al., 2010), a redução da transpiração pode ainda ser associada com uma maior DE, que frequentemente é observada em condições de maior quantidade de radiação e de menor disponibilidade de água (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003; CASTRO et al., 2009; SANTIAGO et al., 2001; SOUZA et al., 2007). Dessa forma, entre as variedades com maiores valores para a FUN e DE, destacam-se os genótipos 1, 12 e 14 (Tabela 11), sendo que as melhores médias foram obtidas pelo genótipo 14, tanto para parte adaxial quanto para parte abaxial, sendo o único a expressar esta característica, demonstrando que esse genótipo apresenta os estômatos mais funcionais.

A DE foi em média 94,73% maior na parte abaxial comparada a parte adaxial. A densidade estomática da epiderme adaxial pode ser menos responsiva às variações ambientais devido à radiação ser diretamente incidente sobre esta (CASTRO et al., 2009) e a transpiração ocorrer principalmente pela epiderme da face abaxial (STRECK, 2003).

Apesar dos valores obtidos para DP e DQ terem sido altamente significativos para as regiões das folhas e terem apresentado interação entre os fatores (Tabela 9), genótipos que apresentaram menores DE podem apresentar menor adaptabilidade as alterações ambientais, uma vez que a dimensão e a posição dos estômatos também afetam na absorção de CO₂. A redução no tamanho dos estômatos é um evento reconhecidamente importante na regulação das trocas gasosas, uma vez que folhas com estômatos menores apresentam maior eficiência no uso da água por apresentarem um menor tamanho dos poros estomáticos, condicionando assim uma menor perda de água por transpiração (BOEGER, WISNIEWSKI, 2003; NEJAD, VAN MEETEREN 2005; PEARCE et al., 2006).

Contudo, alterações no comportamento estomático, associados aos aspectos de dimensão e densidade, são características muito variáveis em plantas em função do ambiente (MELO et al., 2004), da constituição genética da espécie (ALVES et al., 2001; CAMARGO, MARENCO, 2011), e frequentemente em plantas submetidas a diferentes condições de estresses (CASTRO et al., 2005).

5.2 Citometria de fluxo

O conteúdo de DNA dos 37 genótipos poliploides de *H. chartacea* var. Sexy Pink está representado na Tabela 12, e pode ser melhor visualizado na Figura 18. O teste de médias mostrou diferenças significativas entre os genótipos avaliados.

Tabela 12: Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo em genótipos de *H. chartacea* induzidos à poliploidia utilizando os tratamentos 1 – controle (T1), tratamento 2 – 0,01% de colchicina (T2), tratamento 3 – 0,05% de colchicina (T3) e tratamento 4 – 0,1% de colchicina (T4), Manaus, AM. 2017.

Genótipo	Trat.	Nível de Ploidia	Conteúdo de DNA (pg)		Genótipo	Trat.	Nível de Ploidia	Conteúdo de DNA (pg)	
1	T2	Diploide	1,220	m ²	22	T2	Diploide	3,443	e
2	T2	Diploide	1,163	m	23	T1	Mixoploide	3,337	e
3	T3	Mixoploide ¹	3,130	g	24	T2	Mixoploide	3,383	e
4	T3	Mixoploide	4,200	a	26	T2	Mixoploide	1,213	m
5	T3	Mixoploide	3,860	c	27	T3	Diploide	3,053	g
6	T1	Mixoploide	3,117	g	28	T3	Mixoploide	3,170	g
7	T2	Mixoploide	4,020	b	29	T1	Mixoploide	2,897	h
9	T2	Mixoploide	3,257	f	30	T2	Mixoploide	3,947	b
10	T1	Mixoploide	3,083	g	31	T4	Mixoploide	3,803	c
11	T2	Mixoploide	3,983	b	32	T3	Mixoploide	1,283	m
12	T3	Tetraploide	1,783	k	33	T3	Tetraploide	1,637	l
13	T2	Tetraploide	2,003	j	34	T1	Mixoploide	3,890	c
14	T3	Diploide	1,167	m	35	T3	Mixoploide	4,280	a
15	T1	Mixoploide	3,760	c	36	T2	Tetraploide	2,167	i
16	T1	Diploide	1,197	m	38	T2	Mixoploide	3,793	c
17	T2	Mixoploide	3,253	f	39	T1	Mixoploide	3,603	d
18	T1	Mixoploide	3,947	b	40	T3	Diploide	1,027	n
20	T3	Diploide	1,223	m	41	T1	Mixoploide	3,693	d

¹ Mixoploide: Plantas com tendência a Tetraploide; ²Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott, a 5% de probabilidade;

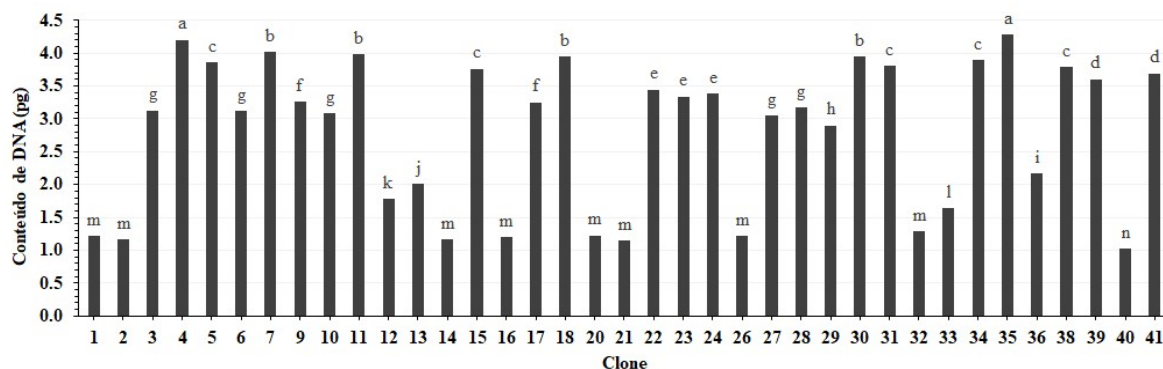


Figura 18: Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo em genótipos de *H. chartacea* induzidos à poliploidia. Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

Nas plantas superiores, Loureiro; Santos (2004) explicam que o crescimento e divisão celular é um processo cíclico. No modelo de ciclo celular apresentado por Howard; Pelc (1986), o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2. Durante o período de crescimento celular (fase G1) uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haploide de cromossomas) em DNA nuclear, possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e na fase seguinte (fase G2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível 4C. Os resultados expressos na Tabela 12 e na Figura 18 apresentaram clara relação entre o conteúdo de DNA e o nível de ploidia dos materiais avaliados, quando comparados com pico G1, permitindo assim a separação dos diferentes genótipos de acordo com seu nível de ploidia. O conteúdo 2C de DNA nuclear dos genótipos diploides variou de 1,03 a 1,28 pg, enquanto que nos gens tetraploides a variação ficou entre 1,64 e 2,16 pg e nos mixoploides entre 2,90 e 4,28 pg. O menor conteúdo de DNA foi encontrado no genótipo 40, diploide com 1,03pg, e o maior conteúdo de DNA para o genótipo 35, mixoploide com 4,28 pg, ambos pertencentes ao tratamento 3 (0,1% de colchicina).

Mesmo plantas que não receberam o tratamento com colchicina apresentaram variação no conteúdo de DNA (mixoploides), o que provavelmente ocorreu devido a uma variação somaclonal proveniente do cultivo in vitro desse material, o que não descarta a confiabilidade dos dados obtidos, uma vez que não há nenhum exemplar tetraploide entre os genótipos do tratamento controle. Este fenômeno tem sido observado em várias plantas durante a cultura de tecidos (REZENDE et al., 2008; SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2008). A variabilidade genética é normalmente chamada variação somaclonal em clones propagados in vitro

(LARKIN; SCOWCROFT, 1981), que é uma variação fenotípica de origem genética, ou seja, uma variação cromossômica que se torna herdável nas gerações seguintes, ou epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material sofre, quando submetido ao cultivo in vitro (ILLG, 1990), variações essas existentes entre somagenótipos (soma = vegetativo; genótipo = cópia idêntica).

Lakshmanan et al. (2007), mencionam que a causa exata da variação somaclonal em micropropagação é desconhecida, embora se acredite que as alterações acima citadas e outras como as proporções de auxina-citocinina durante o cultivo e o stress por conta das condições in vivo, sejam os responsáveis. Os mesmos autores ressaltam que plantas propagadas in vitro podem ser expostas a níveis elevados de stress oxidativo dada pelas reações que ocorrem com o oxigênio metabolizado, isto pode causar danos ao DNA incluindo a instabilidade em determinados pontos. Provavelmente devido a estas razões, as alterações morfológicas podem ocorrer durante a micropropagação, embora muitas destas alterações podem sofrer uma reversão para um estado normal, quando as plantas forem transferidas para o solo e o stress aos quais elas estavam sendo submetidas for regulado. Estas mudanças podem não estar estritamente associadas a alterações genéticas, mas estar relacionados com alterações transitórias na metilação do DNA que podem ser modificadas de acordo com as condições das plantas.

Os coeficientes de variação encontrados para os picos G1 variaram de 2,33 a 6,70 % (Tabela 13), caracterizando resultados adequados, uma vez que os genótipos avaliados apresentaram grande variação no conteúdo de DNA celular e consequentemente, sucesso no experimento de poliploidização induzida. Segundo Galbraith et al. (2002), coeficientes de variação de até 5 % podem ser tomados como aceitáveis devido ao alto grau de resolução da citometria de fluxo. Quanto menor o coeficiente de variação menor é a largura do pico e maior é a precisão dos experimentos. Apenas dois genótipos apresentaram resultados acima do que pode ser considerado como adequado, mas estes dois pela análise são mixoploides, ou seja, ainda não possuem seu conteúdo de DNA completamente definido, podendo nas futuras gerações tender a diploide ou a tetraploide e essa variação pode ter causado este resultado um pouco mais elevado.

Tabela 13: Coeficiente de Variação estimado por citometria de fluxo de genótipos induzidos à poliploidia de *H. chartacea* var. Sexy Pink. Manaus, AM. 2017.

Tratamento	Genótipos	C.V.	Tratamento	Genótipos	C.V.
T1	6	3,76 c	T2	26	3,45 c
T1	10	3,64 c	T2	30	3,42 c
T1	15	3,21 c	T2	36	4,23 c
T1	16	4,13 c	T2	38	3,73 c
T1	18	3,59 c	T3	3	5,16 b
T1	23	4,42 c	T3	4	3,87 c
T1	29	3,02 c	T3	5	3,57 c
T1	34	3,17 c	T3	12	3,99 c
T1	39	3,42 c	T3	14	3,76 c
T1	41	3,81 c	T3	20	4,05 c
T2	1	3,43 c	T3	21	3,81 c
T2	2	3,08 c	T3	27	3,92 c
T2	7	4,86 b	T3	28	3,98 c
T2	9	4,38 c	T3	32	4,84 b
T2	11	4,06 c	T3	33	6,70 a
T2	13	2,33 c	T3	35	4,11 c
T2	17	6,68 a	T3	40	3,95 c
T2	22	4,91 b	T4	31	4,61 b
T2	24	4,50 c			

Tratamentos com colchicina: T1= controle, sem adição de colchicina na solução de imersão; T2 = 0,01%; T3 = 0,05% e T4 = 0,1%. Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste Scott – Knott, a 5% de probabilidade

Na Figura 19 podemos observar os histogramas dos genótipos, controle - diploide, mixoploide e tetraploide, obtidos pela indução com colchicina e o ganho genético obtido pela duplicação cromossômica desses genótipos. Podemos observar na Figura 19 A um histograma do genótipo 1 (um), diplóide (2x), com a formação de dois picos, o pico G1- maior e bem característico e G2 – de menor proporção. O pico G2 apresenta o dobro do DNA nuclear do pico G1. Na Figura 19 B temos o histograma do genótipo 41, um mixoploide (2x + 4x) que representa um material com diferentes níveis de ploidia (células diploides e tetraplóides) na mesma amostra. Na Figura 19 C podemos observar a formação de apenas um pico, exatamente na posição entre os picos G1 e G2 são formados, caracterizando um material tetraploide (4x).

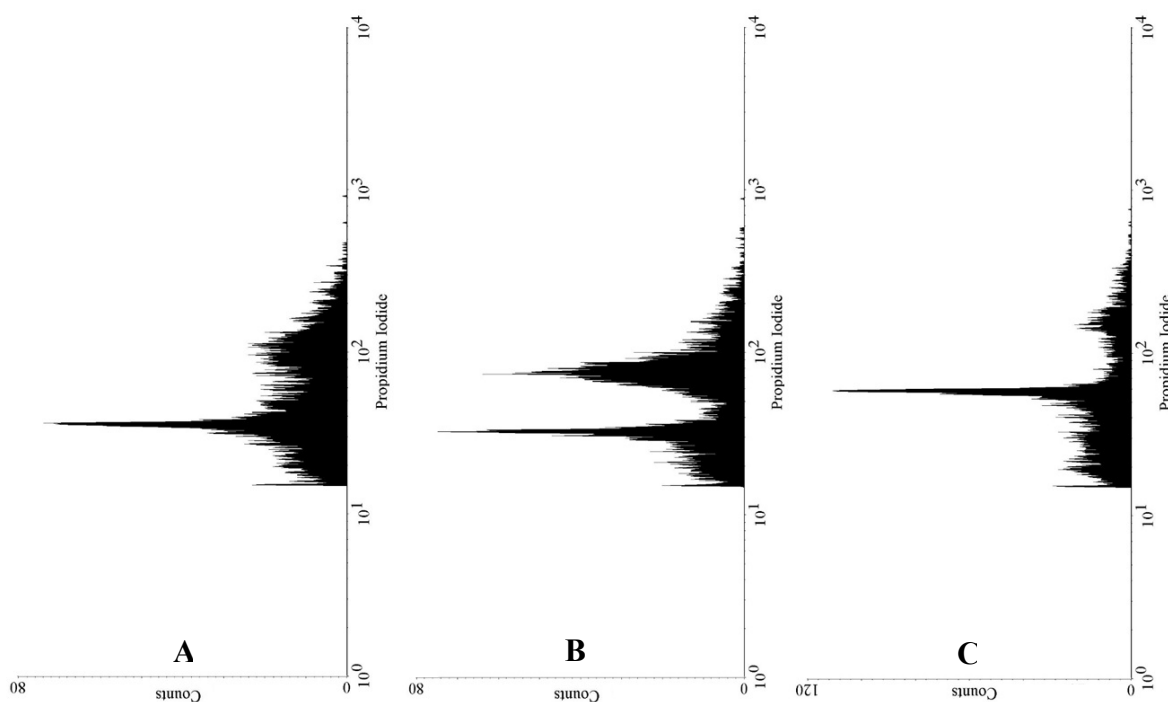


Figura 19: Diferentes níveis de ploidia em *H. chartacea* var. Sexy Pink: A) Diploide (2x); B) Mixoploide (2x + 4x) e C) Tetraploide (4x). Manaus, AM. 2017.

A pesar dos genótipos terem sido avaliados com três anos de cultivo, esta técnica permitiu a identificação de 24 indivíduos mixoploides. Normalmente, indivíduos mixoploides não são interessantes em um programa de melhoramento genético porque tendem a se tornarem na maioria das vezes diplóides com o passar dos ciclos, uma vez que as células diploides se multiplicam a taxas mais altas do que as células tetraplóides, porém esta convergência irá depender do nível de mixoploidia presente nas células. Este é o principal problema do uso da colchicina como agente antimitótico, já que esta substância age apenas de maneira eficiente nas células que não são divisíveis. Assim, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado e é comum o aparecimento de plantas mixoploides, que apresentam variações em diferentes níveis no número de cromossomos (RODRIGUES et al., 2011). Portanto, a escolha do material genético a ser utilizado e a variação na concentração, tempo de exposição e formas de aplicação desse agente antimitótico são requisitos indispensáveis em qualquer programa de melhoramento genético para a duplicação cromossômica.

Foi possível também a identificação de quatro indivíduos tetraploides (genótipos 12, 13, 33 e 36) um resultado interessante comparado ao tamanho do stande avaliado.

5.3 AFLP

A extração de amostras de DNA dos genótipos poliploides de *H. chartacea* var. Sexy Pink foi realizada de maneira satisfatória com o nitrogênio líquido. Na figura 20 são observadas amostras de DNA extraído dos 37 genótipos, os quais demonstram a boa quantidade e qualidade do DNA.

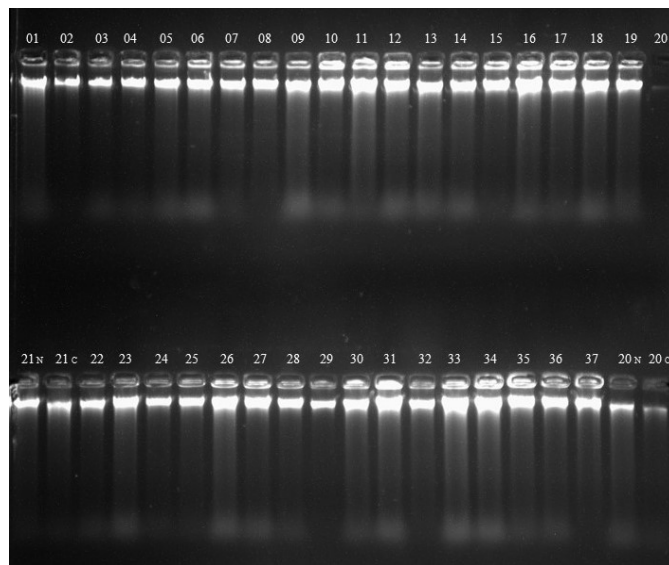


Figura 20: Revelação do DNA dos 37 genótipos de *H. chartacea* var. Sexy Pink em gel-agarose. Manaus, AM. 2017. (Extração feita com N=Nitrogênio líquido, C= CTAB).

Entre as 19 combinações de oligonucleotídeos utilizados, três foram selecionados para a análise de todas as amostras por apresentarem maior número de locos polimórficos e melhor quantidade de amplificação de bandas. As três combinações dos *primers* utilizados para a análise de AFLP revelaram um total de 519 bandas, variando entre 100 e 800 pares de bases. O número total de locos por *primer* variou de 157 a 188 (Tabela 14). Xia et al. (2007), destacam que a porcentagem de locos polimórficos tem sido utilizada como medida de diversidade genética em alguns trabalhos com populações naturais e marcadores dominantes.

Tabela 14: Polimorfismo obtido em genótipos de *H. chartacea* a partir de três combinações de oligonucleotídeos utilizando marcadores AFLP. Manaus, AM. 2017.

Combinações de oligonucleotídeos	Total de locos	Locos Polimórficos	Polimorfismo (%)	Gama de tamanho (bp)
E+ACA/M+CGC	174	158	90,81	100 - 800
E+AAC/M+CCA	157	157	100,00	
E+ACA/M+CCA	188	175	93,09	
Total	519	490	94,41	-

A técnica de AFLP pode detectar um número de polimorfismos com apenas um ou dois pares de iniciadores, neste caso e por causa do número de indivíduos avaliados, as três combinações selecionadas foram suficientes para alcançar uma boa quantidade de locos polimórficos.

O padrão de amplificação é variável, pois depende das condições laboratoriais, dos reagentes, da combinação de *primers* analisada e também da habilidade do laboratorista em manusear a técnica AFLP, no entanto apresenta maior reproducibilidade comparada ao marcador RAPD. Não obstante, vários autores têm relatado que o protocolo de extração do DNA, pode influenciar e determinar a qualidade do DNA de trabalho e etapas consequentes (VUYLSTEKE et al., 2007).

O uso dos três primers mostrou-se satisfatório para a detecção de polimorfismo entre os genótipos poliploides de *H. chartacea* var. Sexy Pink. Sharma et al. (2011), em estudo realizado com *Pongamia pinnata*, observaram um total de 254 bandas polimórficas a partir de 4 combinações de primers AFLP, das quais, 145 (57,1%) eram polimórficos, enquanto que, em avaliação de diversidade genética em cajazeira (*Spondias mombin*), 145 fragmentos foram obtidos a partir de 21 primers RAPD, apresentando 79,3% de polimorfismo (LIMA et al., 2011).

As relações de similaridade genética entre os genótipos foram caracterizadas na forma de um dendrograma construído a partir do complemento aritmético da distância genética de Jaccard, com base em dados dos 490 fragmentos de AFLP (Figura 21). A linha horizontal tracejada representa o corte estimado pelo método de Mojema (1977).

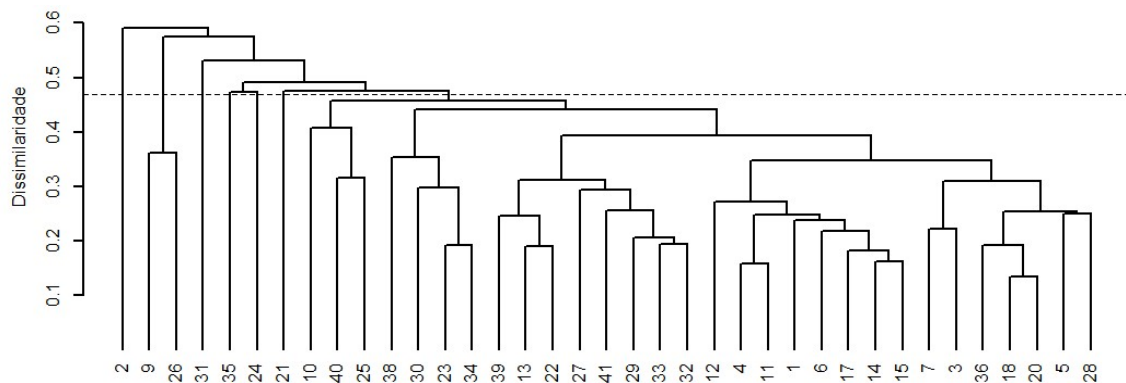


Figura 21: Análise de agrupamento UPGMA a partir do complemento aritmético da distância genética de Jaccard para 37 genótipos de *H. chartacea*.. Manaus, AM. 2017.

Pelo dendrograma podemos observar a formação de 5 grupos distintos, sem uma correlação clara com tratamentos mutagênicos. O que vale ressaltar é que nos quatro primeiros grupos formados, todos os indivíduos foram classificados como mixoploides pela citomertria de fluxo, o que poderia explicar essa separação uma vez que estes indivíduos não teriam seu conteúdo de DNA completamente definido, e como os mixoplóides tendem a se tornarem diploides ou tetraploides com o passar do tempo, genótipos mixoploides que permaneceram no grupo maior onde estes indivíduos com conteúdo de DNA definido estão, poderiam estar progredindo e mais próximos dessa tendência evolutiva. Meléndez-Ackerman et al. (2005) utilizando o marcador AFLP, para inferir processos microevolutivos em *Heliconia bihai*, concluíram que variações genéticas nesta espécie de helicônia são mais consistentes com seleção e fragmentação do habitat do que por deriva genética. No presente estudo, as variações são consequência da indução de poliploidia nestes genótipos.

Através do método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard (Tabela 15), os genótipos foram divididos em três grupos, dois deles com indivíduos isolados, grupo 2 com o genótipo 2 e grupo 3 com o genótipo 26. Podemos ressaltar que o genótipo 26 foi o que apresentou o maior diâmetro do pseudocaule (58,22 cm), quase o dobro da média observada (29,47 cm), uma indicação de poliploidia, já que os poliploides normalmente são maiores que os diploides progenitores.

Tabela 15: Agrupamento dos genótipos de *H. chartacea* pelo método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Manaus, AM. 2017.

Grupos	Genótipos
1	18, 20, 36, 28, 5, 3, 7, 15, 6, 17, 11, 14, 4, 12, 1, 32, 33, 39, 22, 29, 41, 27, 30, 13, 23, 25, 10, 40, 34 38, 21, 24, 35, 9, 31
2	2
3	26

A partir da dispersão gráfica feita pela análise de escalonamento multidimensional não-métrico das distâncias genéticas entre os genótipos de *H. chartacea* (Figura 22), observou-se que os genótipos 2 e 26 foram os genótipos mais divergentes, apresentando maior distanciamento genético em relação aos demais genótipos. Nesta análise, é possível observar que devido as semelhanças genéticas, muitos genótipos ficaram reunidos e/ou mais próximos uns dos outros, sendo que as distâncias representadas tiveram ajustamento satisfatório em comparação as distâncias genéticas originais ($R^2 = 0,974$).

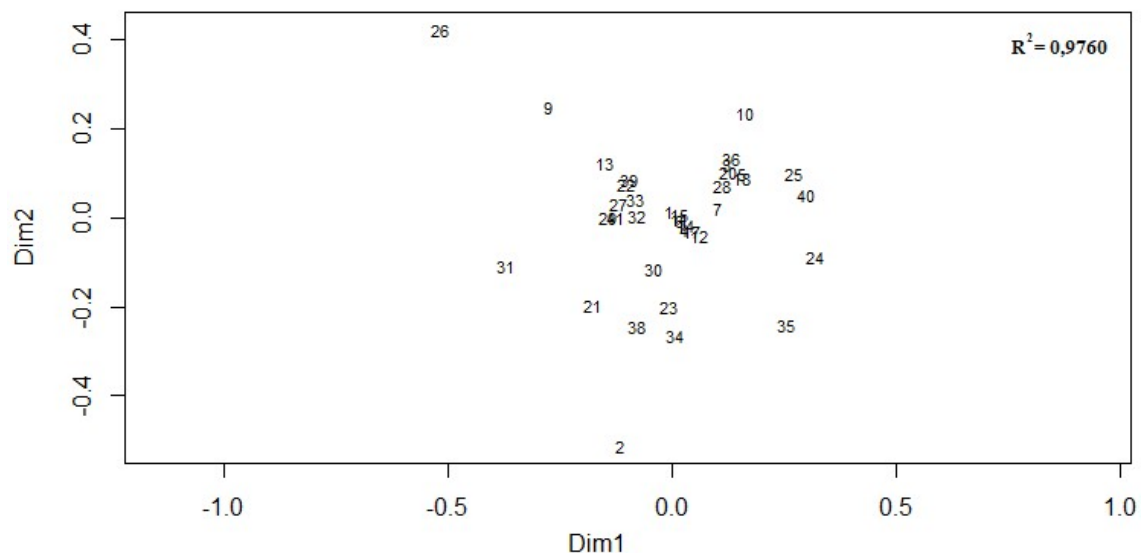


Figura 22. Análise de escalonamento multidimensional não-métrico das distâncias genéticas entre os genótipos de *H. chartacea*. Manaus, AM. 2017.

Para determinar os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional, foi feita a análise bayesiana pelo software Structure e, de acordo com o método ΔK descrito por Evanno et al. (2005), o número mais provável de agrupamentos foi $K = 3$ (Figura 23).

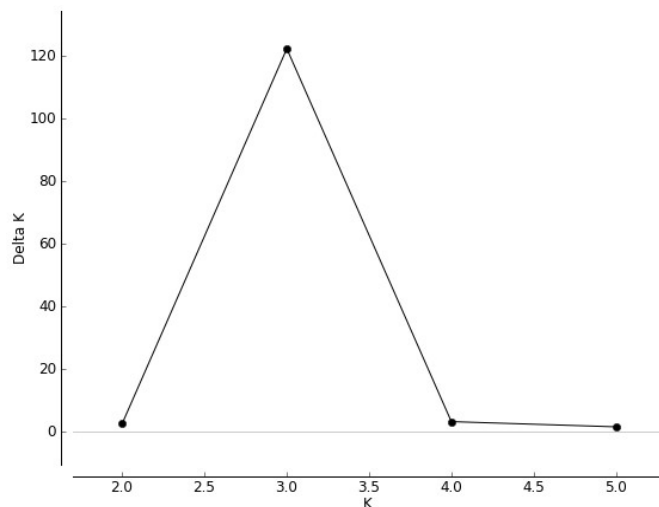


Figura 23: Valores de agrupamento (K) mais prováveis obtidos pelo método de Evano et. al (2005). Manaus, AM. 2017.

A visualização gráfica da estrutura populacional pelo software Structure (Figura 23) permitiu identificar três possíveis grupos formados pelos genótipos poliploides, com pelo menos sete indivíduos bem definidos. Esta divisão de grupos não deixa muito clara a separação entre os indivíduos classificados anteriormente como diploides, mixoploides e tetraploides, uma vez que os genótipos diploides (1,2,14,16,20,22,27 e 40) encontram-se divididos nos três possíveis grupos. Podemos inferir apenas que a condução inicial do experimento in vitro possa ter gerado uma variação somaclonal não mensurável, ou detectável pelos métodos anteriores, o que levaria aos resultados observados nesta análise.

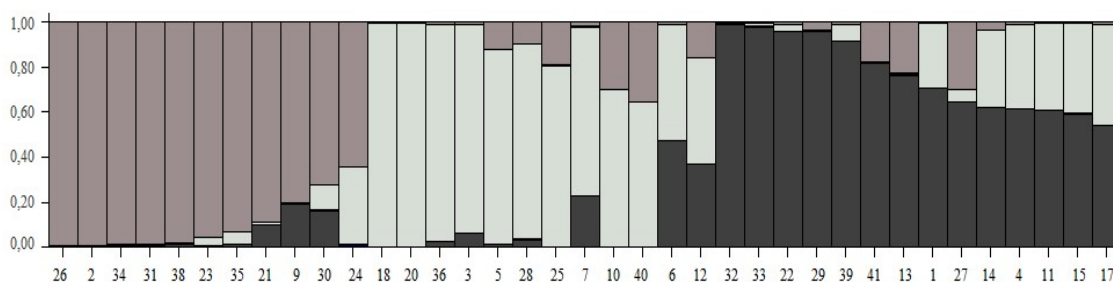


Figura 24: Estrutura populacional empregando o software Structure a partir de 37 genótipos de *H. chartacea*, considerando o número de agrupamentos como K=3.

A quantidade de variação genética obtida pela análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 16) mostrou que 99,67% da variabilidade genética encontra-se dentro dos tratamentos com colchicina analisados, e apenas 0,33% entre os tratamentos dos genótipos de *H.*

chartacea.

Tabela 16: Variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA entre e dentro de tratamentos de indução a mutação em *H. chartacea*.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	Componente de Variância	% da Variação
Entre Tratamentos	3	75,0066	0,2436	0,333
Dentro de Tratamentos	33	72,9830	72,9830	99,67
Total	36	73,1517	73,2266	100,00
Fst = 0,0033				

Os resultados da diversidade genética obtidos neste trabalho evidenciaram que o uso de diferentes tratamentos não foi o responsável pela variação genética observada. Em outras palavras, as diferenças entre os tratamentos de colchicina aplicados não explicam (ou explicam somente 0,333%) a variação genética observada entre os genótipos, e que o subcultivo sucessivo in vitro desta espécie, ou doses reduzidas do agente mutagênico seriam capazes de gerar um certo grau de variabilidade.

Esse tipo de estudo e caracterização se faz necessário, e os genótipos de *H. chartacea* var. Sexy Pink examinados e classificados como geneticamente distintos serão utilizados na seleção de genótipos potenciais para programa de melhoramento genético e futuramente na obtenção de novas variedades.

6. CONCLUSÕES

Como os genótipos 13, 20, 36, 37 e 40 não apresentaram inflorescências durante os dois anos de avaliação, foram considerados inaptos para futuros trabalhos de seleção e melhoramento que vizem apenas a produção de inflorescências, porém podem ser utilizados em outros programas voltados ao paisagismo devido a exotividade de suas folhagens.

O genótipo 18 apresentou uma altura da planta e tamanho das inflorescências menores que os demais clones, mostrando-se promissor para futuras pesquisas voltadas ao paisagismo.

O clone 26 apresentou o maior diâmetro de pseudocaule porém, durante a floração manifestou perda das folhas por necrose, o que ocasiona perdas fotossintéticas significativas.

O genótipo 35 foi o que apresentou as maiores variações morfológicas com alterações na posição e coloração da inflorescência, além de possuir as bordas do limbo foliar inteiras, o que torna este genótipo interessante.

Os estômatos dos genótipos apresentaram morfologia sem alterações significativas, porém, os genótipos tetraploides revelaram uma menor densidade estomática, além de um tamanho maior de estômatos comparado aos apresentados pelo tratamento controle e pelos mixoploides.

As combinações dos primers utilizados para a análise de AFLP revelaram um total de 519 bandas, mostrando ser muito eficiente na caracterização dos clones estudados.

A quantidade de variação genética obtida pela análise de variância molecular mostrou que 99,67% da variabilidade genética dentro dos tratamentos com colchicina analisados, e apenas 0,33% entre os tratamentos dos clones de *H. chartacea*, evidenciando os efeitos aleatórios deste agente mutagênico.

A técnica de citometria de fluxo permitiu a identificação de 4 genótipos tetraploides e 11 mixoploides, contribuindo com as demais técnicas empregadas na identificação de genótipos potenciais para novos programas de melhoramento genético e futuramente na obtenção de novas variedades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, A. **Negócio em Flores**. Segundo IBRAFLO, mercado brasileiro de ornamentais cresceu mais de 6% em 2016. Disponível em: <http://www.negocioscomflores.com.br/artigos-gratis/segundo-ibraflor-mercado-brasileiro-de-ornamentais-cresceu-mais-de-6-em-2016/>>. Acessado em: 24/06/2017.

AL AFAS, N.; *et al.* **Clonal variation in stomatal characteristics related to biomass production of 12 Poplar (Populus) clones in a short rotation coppice culture**. *Environmental and Experimental Botany*, v. 58, p. 279-286, Dez/2006.

ALBUQUERQUE, A.W., *et al.* **Produção de helicônia Golden Torch influenciada pela adubação mineral de orgânica**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, v. 14, n. 10. Oct/2010

ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 381 p. 1971.

ALVES, E. S.; *et al.* **Anatomic studies on *Tradescantia* hybrid genotype 4430 leaves: changes caused by urban air pollution**. *Revista Brasileira de Botânica*, Ribeirão Preto: Sociedade Botânica, v. 24, p. 561-566, 2001.

AMORIM, E. P.; *et al.* **Divergência genética em genótipos de girassol**. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1637-1644, Dez/2007.

ANDERSSON, L. **Revision of *Heliconia* sect. *Heliconia* (Musaceae)**. *Nordian Journal of Botany*, v. 1, p. 759-784, Dez/1981.

_____. **Revision of *Heliconia* subgen. *Stenochlamys* (Musaceae-Heliconioideae)**. *Opera Botanica*, Copenhagen, v. 82, p.1-123, 1985.

_____. **An evolutionary scenario for the genus *Heliconia***. In: *Tropical forests, botanical dynamics, speciation and diversity*. Nova York, p. 173-184. Dez/1989.

ARISTEGUIETA, L. **El genero *Heliconia* en Venezuela**. Instituto Botánico. Dirección de Recursos Naturales Renovables. Ministerio de Agricultura y Cria, Caracas, 32 p. 1961.

ARMSTRONG, J.M.; ROBERTSON, R.W. **Studies of colchicineinduced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. II. Comparison of characters in tetraploid and diploid.** Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, v. 2, n. 4, p. 371-378, Jul/1960.

ARRIEL, N. H. C.; *et al.* **Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 5, p. 801-809, May/2006.

ARRUDA, R. S. **Distribuição geográfica e variabilidade genética em *Heliconia acuminata* na Amazônia Central.** 96 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA / Universidade Federal do Amazonas - UFAM - Biologia Tropical e Recursos Naturais. Manaus,. Jun/2008.

BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N. **Ginger: The genus *Zingiber*.** Boca Raton, Flórida, USA, CRC press, 551 p. 2005.

BARANOVA, M.A. **Principles of comparative stomatographic studies of flowering plants.** The Botanical Review, Bronx, v. 58, p. 49–99. Jan/1992.

BARRIOS, E. P.; HERNÁNDEZ, B. C. R. **Phenology, growth and response to light of *ciuelamexicana* (*Spondiaspurpurea* L., Anacardiaceae).** Economy Botany, New York, v. 57, n. 4, p. 481- 49. 2003.

BATISTA, L. A.; *et al.* **Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico.** Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 41, n. 03, p. 475-481, 2010.

BECK, S. L.; *et al.* **Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild).** Botanical Journal of the Linnean Society, London, v. 141, p. 177-181, Jul-Set/2003.

BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I.; *et al.* **Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by in vitro mutagenesis.** Euphytica, v. 176, p. 105-112, Set/2010.

BERRY, F.; KRESS, W.J. **Heliconia: an identification guide.** Washington & London, Smithsonian Institution Press, 334 p. Mar/1991.

BERTAN, I.; *et al.* **Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo.** Revista Brasileira de Agrociência, Fortaleza, v. 12, p. 279-286, 2006.

BEZERRA, F. C. **Floricultura: aspectos gerais e técnicos de cultivo para flores tropicais**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 39 p. 1997.

BINGHAM, E. T. **Stomatal chloroplasts in alfalfa at four ploidy levels**. Crop Science, Madison, v. 8, p. 509-510, Feb/1968.

BLIND, A. D. **Diversidade genética em acessos de *Luffa cylindrica* baseado em análise molecular e caracteres morfo-agronômicos**. Mar/2016. 108 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese). - Agronomia Tropical - Universidade Federal do Amazonas. 2016.

BOAVENTURA, Y. M. S.; *et al.* **Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de *Coffea***. Revista Brasileira de Botânica, Ribeirão Preto, v. 4, p. 15-21, 1981.

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. **Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) no sul do Brasil**. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo: Sociedade Botânica, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BORÉM, A. MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 2.ed, Viçosa, MG: Editora Universidade Federal de Viçosa, 525 p. 2005.

BREWBAKER, J.L. **Colchicine induction of tetraploidy in *Trifolium* species**. Agronomy Journal, Madison: American Society of Agronomy, Inc. v. 44, p. 592-594, 1952.

BROSCHAT, T. K., *et al.* **Andromeda, a red and orange *Heliconia* for cut-flower use**. Agricultural Experiment Stations. Institute of Food and Agricultural Science. University of Florida, Gainesville, circular S-309, 5 p. 1984.

BROSCHAT, T. K. DONSELMAN, H. M. **Production and postharvest culture of *Heliconia psittacorum* flowers in South Florida**. Proceedings of Florida State Horticultural Society, Tallahassee, v. 96. p. 272-273, 1983.

BUSSIS, D.; *et al.* **Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions**. Functional Plant Biology, São Paulo, v. 33, p. 1037–1043, Nov/2006.

CAMARGO, M. A. B.; **Características Estomáticas em Espécies Arbóreas da Amazônia Central**. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação) - Área de concentração Botânica. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – Manaus: UFAM. 2009.

CAMARGO, M. A. B.; MARENCO, R. A. **Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia.** Acta Amazônica. Manaus, v. 41, n. 2. 2011.

CARPENTER K.J. **Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms.** American Journal of Botany, California: v. 92, p. 1595–1615, Out/2005.

CARVALHO, C. G. P.; *et al.* **Análise de trilha sob multicolinearidade em pimentão.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 34, n. 4, p. 603-613, 1999.

CASTRO, C. E. F. **Helicônia para exportação: aspectos técnicos da produção.** Brasília, Embrapa – SPI, 43 p. 1995.

CASTRO, C. E. F.; *et al.* **Espécies de helicônia como flores de corte.** Revista Brasileira de Horticultura Ornamental. São Paulo, v. 12, n.2, p. 87-96, 2007.

CASTRO, E.M.; *et al.* **Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos.** Horticultura Brasileira. Lavras, v. 23, p. 846-850, 2005.

CASTRO, E.M.; *et al.* **Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos.** Lavras: UFLA, 234 p. 2009.

CAVALCANTI FILHO, G. J. F. **Indução de Poliploidia in vitro com aplicação de *Heliconia bihai*.** 64 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Jan/2011.

COSTA, A. S.; *et.al.* **Heliconia genotypes under partial shade: II. Evaluation of flowering stems.** Acta Horticulturae, v. 813, p. 171-176. 2009.

CRESTE S.; *et al.* **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining.** Plant Molecular Biology Reporter. Canada, v. 19, p. 299-306. Dez/2001.

CRILEY, R. A. **Propagation methods for gingers and heliconias.** Bulletin Heliconia Society International. USA, v. 2, p. 6-7, 1988.

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York: p. 1157-1172. 1981.

CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 394 p. 2005.

_____. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 188 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) Genética e Melhoramento de Plantas – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 1990.

_____. **Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics**. Acta Scientiarum, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271 - 276, 2013.

_____. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 285 p. 2006.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed., v. 2, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 668 p. 2014.

_____. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 585 p. 2006.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 480 p. 2004.

CRUZ, C. D.; *et al.* **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.1, p. 377-413. 2004.

DAHLGREN, R. M. T.; *et al.* **The families of the Monocotyledons**. Springer-Verlag: Springer Berlin Heidelberg, p. 350-358. 1985.

DANIELS, G.S.; STILES F.G. **The Heliconia taxa of Costa Rica: Keys e Descriptions**. San José: Departamento de Historia Natural, Museo Nacional de Costa Rica, v. 15. 1979.

DAVIS, J.M. **Luffa sponge gourd production practices for temperate climates**. HortScience, Virgínia, v. 29 (4), p. 263-266. April/1994.

DHOOGHE, E.; *et al.* **Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 104, p 359–373. Mar/2011.

DIXON, W. E.; MALDEN, W. **Colchicine with special reference to its mode of action and effect on bone marrow.** Journal of Physiology, v. 37, p. 50-76, May/1908.

DOBKIN, D.S. **Flowering patterns of long-lived *Heliconia* inflorescences: Implications for visiting and resident nectarivores.** Oecologia: Springer Berlin Heidelberg, v. 64, p. 245-254. Oct/1984.

DOLEZEL, J. **Applications of flow cytometry for the study of plant genomes.** Journal of Applied Genetics, Poznan, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. **Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size.** Annals of Botany, Oxford: Oxford University Press, v. 95, p. 99-110, 2005.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. **Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method.** Conservation Genetics Resources, Dordrecht, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2011.

EIGSTI, O. J. **A Cytological study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants.** Proceedings of the National Academy of Science United States of America, v. 24, n. 2, p. 56-63, Feb/1938.

EIGSTI, O. J.; DUSTIN, P. Jr. **Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry.** Ames, Iowa, United States of America: The Iowa State College Press, 470 p. 1955.

ELLIOTT, F. **Mejoramiento de plantas - citogenética.** Mexico: Compañía Editorial Continental, 474 p. 1967.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants.** John Willey & Sons: New York, 376 p. 1960.

ESCANDÓN, A. S.; *et al.* **Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. In vitro colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidensis*.** Eletronic Journal of Biotechnology: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, vol. 8, n. 2, Aug/2005

EVANNO, G.; *et al.* **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.** Molecular Ecology, Austin, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, Jul/2005.

EVANS, A. M. **The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne.** The New Phytologist, Oxford, v. 54, p. 149-162, 1955.

FAO/IAEA (Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency). **Mutant varieties database**, 2010. Disponível em: <http://mvgs.iaea.org/Search.aspx>. Acessado em: 30 de abril de 2016.

FARIA, P. N.; *et al.* **Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas.** Horticultura Brasileira, Vitoria da Conquista, v. 30, n. 3, p. 428-432. Jul-Set/2012.

FARIAS, A.P.; *et al.* **Produtividade da *Heliconia psittacorum* x *Heliconia pathocircinada* cv. Golden Torch sob diferentes fontes de adubação orgânica.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v. 17, p. 713-720, 2013.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development.** New York: Macmillan Publishing Company, 536 p. 1987.

FERNAU, M.E.; SAMSON, P.J. **Use of cluster analysis to define periods of similar meteorology and precipitation hemistry in Eastern North America. Part I: Transport patterns.** Journal of Applied Meteorology, Michigan, v. 29, p. 735-761, Aug/1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220 p. 1998.

GALBRAITH, D.W.; *et al.* **Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues.** Science, Washington ,v. 220, p. 1049-1051, Jun/1983.

GALBRAITH, D.W.; *et al.* **Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants.** Current Protocols in Cytometry. New York: John Wiley, 365 p. May/2001.

GANGA, M.; CHEZHIYAN, N. **Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa spp.*).** Journal of Horticultural Science & Biotechnology, London, v. 77, n. 5, p. 572-575, May/2002.

GANTAIT, S.; *et al.* **Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella.** Plant Cell Tissue Organ Culture, v. 106 (3), p. 485–493. Set/2011.

GIRALDO, L. M. L. **Caracterización de dos genotipos de heliconias propagadas *in vitro* y estabilidad genética de *H. caribaea* mediante marcadores moleculares AFLP.** Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) – Biologia Vegetal. Universidad del Quindío. Armenia, 83 p. Aug/2014

GŁOWACKA, K.; *et al.* ***In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species.** Industrial Crops and Products, v. 32, p. 88-96, Set/2010.

GOMES FILHO, A.; *et al.* **Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.).** Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá, v. 32, n. 4, p. 627-633. 2010

GONG, X.; RICHMAN, M.B. **On the application to growing season precipitation data in North America East of the rockies.** Journal of Climate, Oklahoma, v.8, p.897-931, Apr/1995

GOWER, J.C. **A general coefficient of similarity and some of its properties.** Biometrics, Arlington, v. 27, p. 857-874, Dec/1971.

GRANER, E.A. **Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca.** Bragantia, Campinas, v.2, p.1-14, Jan/1942.

_____. **Tratamento de mandioca pela colchicina. I. Nota preliminar sobre poliploidia indicada pela diferença de tamanho dos estômatos.** Jornal de Agronomia, Piracicaba, v. 3, p. 83-98, 1940.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 142 p. 1989.

GUIMARÃES, W. N. R. **Marcadores moleculares e descritores qualitativos na caracterização de espécies de *Heliconia* (Heliconiaceae).** 127 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) - Biotecnologia, Fundação Universidade Estadual do Ceará, Recife. 2011.

GUIMARÃES, A. A.; *et al.* **Fisiologia pós-colheita de *Heliconia* spp.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 5, p. 38-49, Dez/2010.

HEIKO, R. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos.** Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) – Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 91 p. Nov/2001.

HERMANS, C.; *et al.* **How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation?** Trends in Plant Science, v. 11, p. 610-617. Dec/2006.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. **Domestication, genomics and the future for banana.** Annals Botany, v. 100, p. 1073-1084. Nov/2007.

HOWARD, A.; PELC, S. R. **Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage.** International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine. v. 49, p. 207-218, 1986.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPq, p. 287-295. 1990.

IPGRI (1996). **Descriptors for Banana (*Musa* spp.).** IPGRI, Rome. Disponível em: <http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publications/descriptors_en.pdf>. Acessado em: 15/03/2015.

JOSHI, B. K.; *et al.* **Evaluation of sponge gourd landraces in line with the reliability of names given by farmers.** Nepal Journal of Science and Technology. v. 11, p. 9-16. 2010.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **2013: Balanço do comércio exterior da floricultura Brasileira. Contexto e Perspectiva. Boletim de análise conjuntural do Mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil.** Hortica. São Paulo. Jan/2014.

_____. **S. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil - Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil no período de janeiro a dezembro de 2007.** Hortica, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.hortica.com.br>>. Acessado em: 13/09/2012.

_____. **Estudo da competitividade e eficiência da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais da Amazônia – região norte.** Manaus: SEBRAE/AM, 2008.

_____. **Estudo sobre a competitividade e eficiência da cadeia da floricultura da Amazônia** (Sumário Executivo). Manaus/AM: SEBRAE/AM, 2010.

_____. **Inteligência Comercial no Mercado de Flores**. Palestra apresentada no Seminário Setorial Mercado de Flores da 14ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria – FRUTAL / Flor Brazil 2007. Fortaleza, Set/2007.

KAENSAKSIRI T.; *et al.* **In vitro induction of poluploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban**. Plant Cell Tissue Organ Cult. v. 107, p. 187–194, Nov/2011.

KHAN, P.S.; *et al.* **Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions**. Biologia Plantarum, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, Mar/2003.

KIYUNA, I.; *et al.* **Comércio exterior da floricultura Brasileira em 2010: situação crítica**. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo, v. 6, n. 2, Feb/2011.

KRESS, W. J. **The phylogeny and classification of the Zingiberales**. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 77, n.4, p. 698-721, 1990.

KRESS, W. J.; *et al.* **Heliconias - Llamaradas de la selva colombiana**. Cristina Uribe Editores, Bogota. 200 p, 1999.

KRESS, W. J.; *et al.* **Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence**. Systematic Biology. Oxford, v. 50 n. 6, p. 926-944, Nov-Dec/2001.

KRESS, W. J.; SPECHT, C. D. **The Evolutionary and biogeographic origin and diversification of the tropical monocot order zingiberales**. Aliso, Claremont, v. 22, n. 1, p. 619-630, 2006.

KRZANOWSKI, W. J.; MARRIOTT, F. H. C. **Multivariate Analysis Part 2**. Oxford: Jonh Wiley, 212 p. 1995.

KUMAR, P. P.; *et al.* **Genetic analyses of *Heliconia* species and cultivars with Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marckers**. Journal of the American Society for Horticultural Science. v. 123, n. 1, p. 91-97. 1998.

LAKSHMANAN, V.; *et al.* **Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shorts of banana using RAPD and ISSR markers.** Electronic Journal of Biotechnology, Valparaíso, v. 10, n. 1, Jan/2007.

LAMAS, A. M. **Floricultura Tropical – Tecnologia de Produção.** Maceió. 65 p. 2004.

_____. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo.** SEBRAE/PE (Série Empreendedor), Recife, 88 p. 2002.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. **Somaclonal variation: a novel source of genetic variability from cell cultures for improvement.** Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 60, p. 197-214, Oct/1981.

LEE, G. J.; *et al.* **Variation in the Phenotypic Features and Transcripts of Color Mutants of Chrysanthemum (Dendranthema grandiflorum) Derived from Gamma ray Mutagenesis.** Journal of Plant Biology, v. 51, n. 6, p. 418-423, Nov/2008.

LIMA, A. T.; *et al.* **Molecular characterization of caja, Spondias mombin (Anacardiaceae), by RAPD markers.** Genetics and Molecular Research, v. 10, n. 4, p. 2893 - 2904, Nov/2011.

LIMA, E. C.; *et al.* **Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev. 2008.

LOGES, V.; *et al.* **C. Ornamental Attributes of Heliconia Plants for Landscape Design in Brazil.** Acta Horticulturae. v. 743, p. 75-80, 2007.

LOGES, V.; *et al.* **Colheita, pós-colheita e embalagens de flores tropicais em Pernambuco.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 23, n. 3, p. 699-702, Jul-Set/2005.

LOPES, M. S.; *et al.* **Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP).** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Uberlândia, v.5, n.29, p.56-60. 2002.

LOPES, R. H.; CAVALCANTE, K. V. **Agricultura familiar no Amazonas e diversificação produtiva.** Eixo Temático A: Sustentabilidade dos Biomas Brasileiros e as Políticas Públicas. In: X Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica. Vitória – ES. Set/2013.

LOPES, R.; *et al.* **Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal.** Boletim de Biotecnologia, São Paulo, v. 77, p. 18-29, Jan/2004.

_____. **Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo I. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal.** Boletim de Biotecnologia. Jan/2005.

LUZ, P. B.; *et al.* **Cultivo de flores tropicais.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 62-72. 2005.

MADAIL, R. H.; *et al.* **Estimativa do conteúdo de DNA de diferentes acessos de bananeira: relações entre nível de ploidia e grupos genômicos.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 4, p. 977-983, Dez/2015.

MAGALLANES, *et al.* **Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 20, n. 4, p. 480-484, Out-Dez/1996.

MARCHIORO, V. S.; *et al.* **Herdabilidade e correlações para caracteres de panícula em populações segregantes de aveia.** Revista Brasileira Agrociência, Brasília, DF, v. 9, n. 4, p. 323-328, Out-Dez/2003.

MARQUELLI, L. P. **Análise filogenética de acessos do gênero *Heliconia* L. (Heliconiaceae) utilizando marcadores moleculares.** 88 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, Abr/2009.

MELÉNDEZ-ACKERMAN E. J.; *et al.* **Microevolutionary processes inferred from AFLP and morphological variation in *Heliconia bihai* (Heliconiaceae).** International Journal of Plant Sciences, Chicago, v. 166, n. 5, p. 781-794. Set/2005.

MELO, H. C., *et al.* **Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre características anatômicas das folhas de milho (*Zea mays* L.) “Saracura” BRS-4154.** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, v. 3, p. 333-342. 2004.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons,** Clarendon Press, Oxford, v. 2. 1950.

MIGLIORANZA, E.; OLIVEIRA, E. C. **Dimensões e densidade estomática em diferentes variedades de mandioca.** Cultivando o Saber. Cascavel, v. 6, n. 4, p. 201 - 213, 2013.

MOITA NETO, J. M. **Estatística multivariada: uma visão didática-metodológica.** Revista de Filosofia e Ensino, São Paulo, v. 1, n. 1, May/2004.

MOJEMA, R. **Hierarchical grouping methods and stopping rules: An evaluation.** The Computer Journal, v. 20, p. 359-363, Jan/1977.

MORGAN, E.R.; *et al.* **Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. *japonica* . Royal Blue. plants.** New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Auckland, v. 31, p. 65-68, Feb/2003.

MOSCA, J. L.; *et al.* **Helicônia: Descrição, Colheita e Pós-Colheita.** EMBRAPA, Doc. 91. 33 p. 2004.

MOTOS, J. Flores de Corte. Lajeado, 2000. Disponível em:
<<http://www.portaldoagrovit.com.br>> Acessado em: 27/12/2011.

MUNSELL. **Munsell plant tissue color book.** 2012

MURASHIGE, T.; NAKANO, R. **Tissue Culture as a Potential Tool in Obtaining Polyploid Plants.** Journal of Heredity, v. 57, n. 4, p. 115-118, 1966.

NAKAI, T. **Notulae ad Plantas Asiae Orientalis.** Journal of Japanese Botany, v. 17, p.1-15, 1941.

NASS, L.L. **Recursos Genéticos Vegetais.** Brasília: Embrapa Cenargen, 858 p. 2007.

NEJAD, A.R.; VAN MEETEREN, U. **Stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* grown at high relative air humidity.** Physiologia Plantarum, v. 125, p. 324-332, Oct/2005.

NTULI, R.; ZOBOLO, A. M. **Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmata* and *Lagenaria sphaerica* plants.** African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 20, p. 3548-3652, Oct/2008.

OKSANEN, J.; *et al.* **Vegan: Community Ecology Package: R package 2.0-10,** 2013.

OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. C. P. **Floricultura: caracterização e mercado**. Série Documentos do ETENE, n. 16. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007.

PAIVA, W. O. de. **Cultura de helicônias**. Fortaleza: EMBRAPA -CIIPAT, 20 p. (EMBRAPA-CLIPAT. Circular Técnica, 2). 1998.

PANT, D.D. **On the ontogeny of stomata and other homologous structures**. Plant Sciences, Series (Allahabad), v. 1, p. 1–24, 1965.

PAULA, C. C. **Cultivo de bromélia**. Viçosa: Aprenda fácil, 139 p., 2000.

PEARCE, D.W.; *et al.* **Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment**. Tree Physiology, v. 26, p. 211-218, Feb/2006.

PEDERSEN, L. B.; KRESS, W. J. **Honeyeater (Meliphagidae) pollination and the floral biology of Polynesian Heliconia (Heliconiaceae)**. Plant Systematics and Evolution. v. 216, p. 1-21, Mar/1999.

PEREIRA, F. R. A. **Caracterização morfoagronômica e molecular de meio irmãos de *Heliconia bihai* L., *H. chartacea* Lane ex Barreiros e *H. walgueriana* Petersen**. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Agronomia, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, Fev/2012.

PESEK, J.; BAKER, R.J. **Comparison of predict and observed responses to selection for yield in wheat**. Canadian Journal of Plant Sciences, v. 51, n. 3, p. 187-192, May/1971.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: EDUEM, 1995.

PRAKASH, K., *et al.* **Pharmaceutical particle technologies: an approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability**. Asian Journal of Pharmaceutical Science, v. 9, p. 304-316, Dec/2014.

PRIA, A. D. **Setor de flores escapa da crise e cresce 6% ao ano**. Globo Rural – Edição do dia 18 de setembro de 2016. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/globo-rural/noticia/2016/09/setor-de-flores-escapa-da-crise-e-cresce-6-ao-ano.html>>. Acessado em: 24/07/2017.

PRITCHARD, J.K.; *et al.* **Inference of population structure using multilocus genotype data**. Genetics, v. 155, n. 2, p. 945-959, Jun/2000.

QUEIRÓZ, M. A. **Germoplasma de Cucurbitáceas no Brasil**. In: 51 Congresso brasileiro de olericultura. Horticultura Brasileira, Viçosa, v. 29, n. 2, Jul/2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acessado em 28/09/2014.

RAMALHO, M.A.P.; *et al.* **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: Editora da UFG, 271p. 1993.

RAMOS, S.R.R.; *et al.* Divergência genética em germoplasma de abóbora procedente de diferentes áreas do Nordeste. **Horticultura Brasileira**. Vol 18: 195-199. 2000.

RAO, R.C. **Advanced Statistical Methods in Biometric Research**. New York: J. Wiley, 390 p. 1952.

RESENDE, M. D. V.; *et al.* **Genética e melhoramento da erva-mate**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, Documento 25. 33p. 1995.

REZENDE, R. K. S.; *et al.* **Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 3, p.821-827, Maio-Jun/2008.

RIBEIRO JUNIOR, J.I. **Análise Estatística no SAEG**. Viçosa: UFV, 301 p., 2001.

RODRIGUES, F. A.; *et al.* **Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant**. African Journal of Biotechnology. v. 10, n. 62, p. 13476-13481, Oct/2011.

ROSSMANN, H. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos**. 80 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2001.

ROUX N, DOLEZEL J, SWENNEN R, ZAPATA-ARIAS FJ. **Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimera in *Musa* spp**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 66, p. 189-197, Sep/2001.

SAKAGUTI, E. S. **Utilização de técnicas de análise multivariada na avaliação de cruzamentos dialéticos em coelhos.** 94 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1994.

SANTANA, J. R. F.; *et al.* **Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 2, p. 640-644, Mar-Abr/2008.

SANTIAGO, E. J. A.; *et al.* **Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade.** Ciência e Agrotecnologia, v. 25, n. 05, p. 1035-1042, Set-Out/2001.

SANTOS, E. **Revisão das espécies de gênero *Heliconia* L. (Musaceae) espontâneas na região fluminense.** Rodriguésia, v. 45, p. 99-221, 1978.

_____. **Revisão das espécies do gênero *Heliconia* L. (Musaceae s. l.) espontâneas na Região Fluminense.** 116 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Botânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1977.

SARI, N.; *et al.* **Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.).** Scientia Horticulturae, Amsterdam, v. 82, n. 3-4, p. 265-277, Dec/1999.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. **Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas.** Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 151-157, Abr-May/2004.

SEBRAE, **Mercado de flores e plantas movimenta R\$ 3,8 bilhões no País.** Disponível em: <<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=199&cod=10808941>>. Acessado em: 27/04/2012. 2014.

_____, **O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais.** Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-mercado-brasileiro-de-flores-e-plantas-ornamentais,456649f6ced44510VgnVCM1000004c00210aRCRD>>. Acessado em: 24/06/2017.

SHARMA, S. S.; *et al.* **Assessment of genetic diversity of biodiesel species *Pongamia pinnata* accessions using AFLP and three endonuclease-AFLP.** Plant Molecular Biology Reporter, v. 29, n. 1, p. 12-18, Mar/2011.

SHEELA, V. L. **Flowers for trade**. v.10, Horticultural Science Series. Ed.: Prof. K.V. Peter; Forework Dr. M.L. Chaudhary. New India Publishing, 369p. 2008.

SILVA, P.A.K.X.M.; *et al.* **Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, p. 105-111, Jan-Mar/2000.

SILVA, S. O.; *et al.* **Catálogo de Germoplasma de Bananeira (*Musa* spp.)**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas. 1999.

SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L. **Morfoanatomia das brácteas em *Heliconia* (Heliconiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo, Brasil**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 18., n. 2, p. 261-270, Aug/2004.

SIMIONI, C. **Seleção para aumento da produção de gementas não reduzidos e poloploidização sexual em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)**. 223 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Fev/2004.

SLEPER, D. A.; POEHLMAN, J. M. **Breeding field crops**. Ames, Iowa, U.S.A.: Blackwell Publishing, 424 p. 2006.

SOKAL, R. R., ROHLF, F.J. **The comparison of dendograms by objective methods**. *Taxonomy*, v. 11, p. 33-40, Feb/1962.

SOUSA, G. O.; *et al.* **Crescimento de *Heliconia psittacorum* cv. Golden Torch em função de doses de calcário dolomítico**. *Revista de Ciências Agrárias*, Belém, n. 52, p. 49-59, Jul-Dez/2009.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M.A. **Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia**. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22. n.3, p. 516-520, Jul-Set/2004.

SOUZA, G. S.; *et al.* **Estrutura foliar e de cloroplastídeos em *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker em diferentes condições de qualidade de luz**. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 05. p. 78-80, Jul/2007.

SOUZA, T. C.; *et al.* **Leaf plasticity in successive selection cycles of ‘Saracura’ maize in response to soil flooding**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília v. 45, n.1, p.16-24, Jan/2010.

STACE, C. A. **Cuticular studies as an aid to plant taxonomy.** Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany, v. 4, p. 3–78. 1965.

STRECK, N. A. **Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue.** Revista Brasileira de Agrociência, v. 09, n. 04, p. 317-322, Out-Dez/2003.

STRIKER, G.G.; *et al.* **Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill.** Plant and Soil, The Hague, v. 276, p. 301-311, Oct/2005.

TAYLOR, J.; WHITE, S. A. **Observations of hummingbird feeding behavior at flowers of *Heliconia beckneri* and *H. tortuosa* in southern Costa Rica.** Ornithologia Neotropical v. 18, p. 133-138. 2007.

TIMONIN, A. K. **On the taxonomic value of stomatal characteristics and evolution of the stomatal complexes in flowering plants.** Bjull. Moscovsk. Byulleten' Moskovskogo Obshchestva Ispytatelei Prirody. Otdel Biologicheskii. v. 91, p. 72–81. 1986.

TORRES, A. C.; *et al.* **Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* in vitro.** Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 23, n. 5, p. 789-792, Jul/2005.

UNEMOTO, L. K.; *et al.* **Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum*.** Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá, v. 31, n. 3, p. 503-508. 2009.

VAKILI N. G. **The Experimental Formation of Polyploidy and its Effect in the Genus *Musa*.** American Journal of Botany, California, v. 54, n. 1, p. 24-36, Jan/1967.

VAN COTTEN, W. R. J. **A classification of stomatal types.** Botanical Journal of the Linnean Society, v. 63, p. 235–246, Jul/1970.

VAN DUREN, M.; *et al.* **Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques.** Euphytica, v. 88, n. 1, p. 25-34, 1996.

VAN HARTEN, A. M. **Mutation breeding: theory and practical applications.** Ucraina: Cambridge University Press, 353 p. 1998.

VASCONCELOS, E. S.; *et al.* **Método alternativo para análise de agrupamento.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 42, p. 1421-1428, Out/2007.

VENCOVSKY, R. **Alguns aspectos teóricos e aplicados a cruzamentos dialélicos de variedades.** 112 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1970.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 496p. 1992.

VICHIATO, M. R. M.; *et al.* **Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl.** Revista Ceres. v. 53, n. 310, p. 541-548, Nov-Dez/2006.

VICHIATO, M. R. M.; *et al.* **Indução e identificação de tetraplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae).** Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 38, n. 4. p. 385-390, Out-Dez/2007.

VIEHMANNOVÁ, I.; *et al.* **In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*).** Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 97, p. 21-25, Apr/2009.

VILLA, V. B. **Análise citomorfoanatômica e eletroforética de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X (*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt).** 76 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1995.

VOS, P.; *et al.* **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** Nucleic Acids Research, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov/1995.

VUYLSTEKE, M.; *et al.* **AFLP technology for DNA fingerprinting.** Nature Protocols, v. 2, n. 6, p. 1387-1398. 2007.

WANG, C.; LEI, J. **In vitro induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel.** African Journal of Agricultural Research, Nigeria, v.7, n.25, p.3712-3718, Jul/2012.

WATSON, D. P.; SMITH, R. R. **Ornamental Heliconias.** Cooperative Extension Service. University of Hawai, Honolulu, Circular 482. 12 p. 1979.

WEYERS, J. D. B.; MEIDNER, H. **Methods in Stomatal Research.** Longman Scientific and Technical, Essex. 233 p. 1990.

WILKINSON, H. P. **The plant surface (mainly leaf).** In C. R. Metcalfe and L. Chalk [eds.], *Anatomy of the dicotyledons*, Clarendon Press, Oxford, 2nd ed., vol. 1, p. 97– 165. 1979.

WRIGHT, J. W. **Introduction to Forest genetics.** New York: Academic Press. 463 p. 1976.

XIA, X., *et al.* **Significant reduction of surface solar irradiance induced by aerosols in a suburban region in northeastern China.** *Journal of Geophysical Research*, v. 112, Jul/2007.

YEMETS, A. I.; BLUME, Y. B. **Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs.** *The Open Horticulture Journal*, v.1, p.15-20 15, Oct/2008.

YORDANOVA, R.Y.; *et al.* **Effects of short-term soil flooding on stomata behaviour and leaf gas exchange in barley plants.** *Biologia Plantarum*, Prague, v. 49, p. 317-319, Jun/2005.

YUKAWA, T.; *et al.* **Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systematic significance.** *American Journal of Botany*, v. 79, p. 946-952, Aug/1992.

ZHANG, O. Y.; *et al.* **In vitro induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.)** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 101, p. 41-47, Apr/2010.

ANEXOS

Tabela 17: Matriz de dissimilaridade entre genótipos de *H. chartacea*, baseado em dados moleculares de AFLP e o complemento aritmético da distância genética de Jaccard. Manaus, AM. 2017.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	17	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
1	0.00	0.55	0.36	0.28	0.39	0.23	0.31	0.46	0.46	0.26	0.32	0.36	0.24	0.23	0.25	0.37	0.37	0.42	0.30	0.43	0.47	0.47	0.62	0.36	0.35	0.32	0.37	0.50	0.27	0.29	0.45	0.48	0.37	0.44	0.30	0.47	0.33	0.00
2	0.55	0.00	0.63	0.55	0.62	0.56	0.58	0.64	0.64	0.53	0.55	0.61	0.58	0.55	0.55	0.60	0.61	0.60	0.59	0.56	0.68	0.63	0.73	0.61	0.56	0.60	0.56	0.55	0.56	0.58	0.56	0.60	0.62	0.56	0.58	0.61	0.59	0.55
3	0.36	0.63	0.00	0.37	0.33	0.35	0.22	0.50	0.30	0.32	0.36	0.48	0.34	0.33	0.32	0.27	0.29	0.53	0.44	0.48	0.46	0.34	0.62	0.41	0.31	0.46	0.45	0.57	0.40	0.41	0.54	0.47	0.27	0.53	0.44	0.35	0.45	0.36
4	0.28	0.55	0.37	0.00	0.40	0.30	0.35	0.49	0.46	0.16	0.28	0.40	0.26	0.22	0.23	0.35	0.35	0.46	0.33	0.41	0.46	0.43	0.62	0.40	0.37	0.36	0.36	0.52	0.31	0.32	0.44	0.44	0.38	0.45	0.34	0.46	0.36	0.28
5	0.39	0.62	0.33	0.40	0.00	0.35	0.35	0.53	0.40	0.38	0.33	0.49	0.41	0.37	0.38	0.25	0.22	0.51	0.45	0.46	0.48	0.33	0.64	0.48	0.25	0.48	0.42	0.56	0.41	0.43	0.51	0.53	0.29	0.51	0.45	0.40	0.49	0.39
6	0.23	0.56	0.35	0.30	0.35	0.00	0.31	0.46	0.43	0.26	0.27	0.43	0.22	0.18	0.25	0.36	0.32	0.42	0.35	0.37	0.49	0.43	0.62	0.41	0.29	0.39	0.36	0.46	0.30	0.34	0.44	0.48	0.33	0.40	0.35	0.48	0.37	0.23
7	0.31	0.58	0.22	0.35	0.35	0.31	0.00	0.53	0.38	0.31	0.32	0.43	0.29	0.27	0.27	0.32	0.34	0.47	0.39	0.44	0.38	0.37	0.63	0.37	0.34	0.42	0.41	0.55	0.38	0.37	0.47	0.43	0.30	0.49	0.40	0.36	0.41	0.31
9	0.46	0.64	0.50	0.49	0.53	0.46	0.53	0.00	0.58	0.47	0.50	0.48	0.49	0.46	0.50	0.54	0.52	0.61	0.47	0.54	0.64	0.61	0.36	0.51	0.51	0.48	0.49	0.55	0.45	0.43	0.57	0.62	0.53	0.55	0.44	0.62	0.48	0.46
10	0.46	0.64	0.30	0.46	0.40	0.43	0.38	0.58	0.00	0.44	0.43	0.48	0.46	0.46	0.46	0.35	0.37	0.51	0.48	0.52	0.49	0.40	0.63	0.48	0.40	0.54	0.52	0.53	0.50	0.49	0.59	0.57	0.33	0.56	0.49	0.42	0.54	0.46
11	0.26	0.53	0.32	0.16	0.38	0.26	0.31	0.47	0.44	0.00	0.24	0.40	0.24	0.22	0.21	0.35	0.35	0.45	0.34	0.41	0.45	0.43	0.62	0.38	0.33	0.34	0.33	0.49	0.28	0.28	0.43	0.44	0.35	0.43	0.32	0.47	0.36	0.26
12	0.32	0.55	0.36	0.28	0.33	0.27	0.32	0.50	0.43	0.24	0.00	0.44	0.28	0.24	0.26	0.36	0.35	0.46	0.37	0.39	0.45	0.47	0.62	0.42	0.32	0.41	0.33	0.50	0.34	0.37	0.43	0.45	0.38	0.44	0.37	0.46	0.41	0.32
13	0.36	0.61	0.48	0.40	0.49	0.43	0.43	0.48	0.40	0.44	0.00	0.40	0.40	0.39	0.42	0.49	0.48	0.49	0.19	0.50	0.50	0.56	0.59	0.37	0.49	0.35	0.46	0.50	0.31	0.30	0.53	0.54	0.47	0.52	0.29	0.53	0.34	0.36
14	0.24	0.58	0.34	0.26	0.41	0.22	0.29	0.49	0.46	0.24	0.28	0.40	0.00	0.16	0.18	0.40	0.39	0.44	0.34	0.41	0.45	0.44	0.63	0.37	0.37	0.35	0.38	0.53	0.31	0.34	0.42	0.43	0.38	0.43	0.35	0.44	0.36	0.24
15	0.23	0.55	0.33	0.22	0.37	0.18	0.27	0.46	0.46	0.22	0.24	0.39	0.16	0.00	0.18	0.35	0.33	0.47	0.31	0.41	0.47	0.46	0.62	0.39	0.31	0.37	0.33	0.48	0.29	0.30	0.43	0.45	0.32	0.43	0.30	0.45	0.35	0.23
17	0.25	0.55	0.32	0.23	0.38	0.25	0.27	0.50	0.46	0.21	0.26	0.42	0.18	0.18	0.00	0.36	0.36	0.44	0.36	0.36	0.43	0.41	0.64	0.38	0.35	0.35	0.35	0.51	0.30	0.32	0.39	0.42	0.39	0.41	0.34	0.41	0.36	0.25
18	0.37	0.60	0.27	0.35	0.25	0.36	0.32	0.54	0.35	0.35	0.36	0.49	0.40	0.35	0.36	0.00	0.13	0.54	0.45	0.47	0.47	0.31	0.67	0.48	0.25	0.50	0.42	0.55	0.44	0.43	0.52	0.55	0.18	0.52	0.44	0.39	0.47	0.37
20	0.37	0.61	0.29	0.35	0.22	0.32	0.34	0.52	0.37	0.35	0.35	0.48	0.39	0.33	0.36	0.13	0.00	0.52	0.43	0.46	0.49	0.32	0.64	0.46	0.22	0.48	0.40	0.55	0.43	0.41	0.51	0.56	0.20	0.51	0.43	0.41	0.47	0.37
21	0.42	0.60	0.53	0.46	0.51	0.42	0.47	0.61	0.51	0.45	0.46	0.49	0.44	0.47	0.44	0.52	0.00	0.44	0.45	0.49	0.50	0.66	0.38	0.52	0.46	0.50	0.51	0.46	0.47	0.45	0.54	0.54	0.48	0.49	0.53	0.43	0.42	
22	0.30	0.59	0.44	0.33	0.45	0.35	0.39	0.47	0.48	0.34	0.37	0.19	0.34	0.31	0.36	0.45	0.43	0.44	0.00	0.46	0.49	0.54	0.60	0.36	0.43	0.31	0.42	0.49	0.27	0.23	0.50	0.54	0.41	0.48	0.21	0.52	0.32	0.30
23	0.43	0.56	0.48	0.41	0.46	0.37	0.44	0.54	0.52	0.41	0.39	0.50	0.41	0.41	0.36	0.47	0.46	0.45	0.46	0.00	0.55	0.46	0.65	0.47	0.44	0.46	0.27	0.49	0.40	0.43	0.19	0.51	0.50	0.31	0.47	0.53	0.43	0.43
24	0.47	0.68	0.46	0.46	0.48	0.49	0.38	0.64	0.49	0.45	0.45	0.50	0.45	0.47	0.43	0.47	0.49	0.49	0.49	0.55	0.00	0.47	0.69	0.43	0.52	0.52	0.55	0.64	0.50	0.49	0.55	0.47	0.47	0.53	0.52	0.46	0.48	0.47
25	0.47	0.63	0.34	0.43	0.33	0.43	0.37	0.61	0.40	0.43	0.47	0.56	0.44	0.46	0.41	0.31	0.32	0.50	0.54	0.46	0.47	0.00	0.67	0.51	0.39	0.51	0.51	0.62	0.51	0.51	0.49	0.53	0.34	0.52	0.55	0.31	0.51	0.47
26	0.62	0.73	0.62	0.62	0.64	0.62	0.63	0.36	0.63	0.62	0.62	0.59	0.63	0.62	0.64	0.67	0.64	0.66	0.60	0.65	0.69	0.67	0.00	0.58	0.65	0.59	0.59	0.60	0.60	0.60	0.67	0.70	0.64	0.66	0.60	0.68	0.60	0.62
27	0.36	0.61	0.41	0.40	0.48	0.41	0.37	0.51	0.48	0.38	0.42	0.37	0.37	0.39	0.38	0.48	0.46	0.38	0.36	0.47	0.43	0.51	0.58	0.00	0.45	0.31	0.45	0.55	0.29	0.31	0.47	0.49	0.47	0.48	0.35	0.47	0.26	0.36
28	0.35	0.56	0.31	0.37	0.25	0.29	0.34	0.51	0.40	0.33	0.32	0.49	0.37	0.31	0.35	0.25	0.22	0.52	0.43	0.44	0.52	0.39	0.65	0.45	0.00	0.49	0.38	0.53	0.39	0.42	0.49	0.53	0.29	0.48	0.42	0.43	0.47	0.35
29	0.32	0.60	0.46	0.36	0.48	0.39	0.42	0.48	0.54	0.34	0.41	0.35	0.35	0.37	0.35	0.50	0.48	0.46	0.31	0.46	0.52	0.51	0.59	0.31	0.49	0.00	0.42	0.56	0.20	0.21	0.45	0.48	0.51	0.46	0.32	0.51	0.26	0.32
30	0.37	0.56	0.45	0.36	0.42	0.36	0.41	0.49	0.52	0.33	0.33	0.46	0.38	0.33	0.35	0.42	0.40	0.50	0.42	0.27	0.55	0.51	0.59	0.45	0.38	0.42	0.00	0.46	0.35	0.38	0.32	0.53	0.43	0.40	0.40	0.54	0.42	0.37
31	0.50	0.55	0.57	0.52	0.56	0.46	0.55	0.55	0.53	0.49	0.50	0.50	0.53	0.48	0.51	0.55	0.55	0.51	0.49	0.49	0.64	0.62	0.60	0.55	0.53	0.56	0.46	0.00	0.49	0.51	0.55	0.64	0.55	0.46	0.50	0.66	0.55	0.50
32	0.27	0.56	0.40	0.31	0.41	0.30	0.38	0.45	0.50	0.28	0.34	0.31	0.31	0.29	0.30	0.44	0.43	0.46	0.27	0.40	0.50	0.51	0.60	0.29	0.39	0.20	0.35	0.49	0.00	0.19	0.43	0.49	0.43	0.41	0.26	0.51	0.23	0.27
33	0.29	0.58	0.41	0.32	0.43	0.34	0.37	0.43	0.49	0.28	0.37	0.30	0.34	0.30	0.32	0.43	0.41	0.47	0.23	0.43	0.49	0.51	0.60	0.31	0.42	0.21	0.38	0.51	0.19	0.00	0.46	0.51	0.41	0.44	0.24	0.49	0.28	0.29
34	0.45	0.56	0.54	0.44	0.51	0.44	0.47	0.57	0.59	0.43	0.43	0.53	0.42	0.43	0.39	0.52	0.51	0.45	0.50	0.19	0.55	0.49	0.67	0.47	0.49	0.45	0.32	0.55	0.43	0.46	0.00	0.48	0.55	0.36	0.49	0.52	0.44	0.45
35	0.48	0.60	0.47	0.44	0.53	0.48	0.43	0.62	0.57	0.44	0.45	0.54	0.43	0.45	0.42	0.55	0.56	0.54	0.54	0.51	0.47	0.53	0.70	0.49	0.53	0.48	0.53	0.64	0.49	0.51	0.48	0.00	0.55	0.55	0.53	0.45	0.49	0.48
36	0.37	0.62	0.27	0.38	0.29	0.33	0.30	0.53	0.33	0.35	0.38	0.47	0.38	0.32	0.39	0.18	0.20	0.54	0.41	0.50	0.47	0.34	0.64	0.47	0.29	0.51	0.43	0.55	0.43	0.41	0.55	0.55	0.00	0.55	0.40	0.38	0.46	0.37
37	0.44	0.56	0.53	0.45	0.51	0.40	0.49	0.55	0.56	0.43	0.44	0.52	0.43	0.43	0.41	0.52	0.51	0.48	0.48	0.31	0.53	0.52	0.66	0.48	0.48	0.46	0.40	0.46	0.41	0.44	0.36	0.55	0.55	0.00	0.			

Tabela 18: Matriz de dissimilaridade entre genótipos de *H. chartacea*, baseado em caracteres morfológicos qualitativos e o complemento aritmético do índice de coincidência simples. Manaus, AM. 2017.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	17	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
1	0,00	0,34	0,41	0,38	0,31	0,21	0,24	0,28	0,28	0,17	0,14	0,27	0,38	0,24	0,10	0,24	0,20	0,24	0,17	0,24	0,41	0,28	0,24	0,31	0,38	0,34	0,34	0,21	0,31	0,34	0,41	0,69	0,00	0,20	0,21	0,28	0,27	0,24
2	0,34	0,00	0,07	0,03	0,10	0,28	0,17	0,21	0,24	0,31	0,31	0,40	0,34	0,24	0,38	0,24	0,47	0,14	0,34	0,31	0,24	0,24	0,41	0,17	0,17	0,14	0,10	0,21	0,28	0,34	0,21	0,79	0,00	0,47	0,21	0,34	0,40	0,31
3	0,41	0,07	0,00	0,03	0,10	0,34	0,24	0,14	0,17	0,24	0,38	0,27	0,28	0,17	0,31	0,17	0,33	0,21	0,34	0,34	0,17	0,17	0,34	0,24	0,10	0,21	0,17	0,28	0,34	0,28	0,14	0,79	0,00	0,33	0,28	0,28	0,27	0,38
4	0,38	0,03	0,03	0,00	0,07	0,31	0,21	0,17	0,21	0,28	0,34	0,33	0,31	0,21	0,34	0,21	0,40	0,17	0,31	0,34	0,21	0,21	0,38	0,21	0,14	0,17	0,14	0,24	0,31	0,31	0,17	0,76	0,00	0,40	0,24	0,31	0,33	0,34
5	0,31	0,10	0,10	0,07	0,00	0,24	0,14	0,10	0,28	0,21	0,28	0,20	0,31	0,14	0,28	0,14	0,27	0,10	0,24	0,34	0,28	0,14	0,31	0,21	0,14	0,17	0,14	0,17	0,38	0,31	0,17	0,72	0,00	0,27	0,21	0,31	0,20	0,34
6	0,21	0,28	0,34	0,31	0,24	0,00	0,17	0,21	0,41	0,31	0,28	0,27	0,41	0,24	0,31	0,24	0,33	0,21	0,28	0,24	0,48	0,28	0,38	0,31	0,34	0,28	0,31	0,24	0,34	0,38	0,28	0,76	0,00	0,33	0,24	0,28	0,27	0,21
7	0,24	0,17	0,24	0,21	0,14	0,17	0,00	0,10	0,41	0,28	0,24	0,13	0,31	0,14	0,28	0,14	0,20	0,10	0,24	0,28	0,38	0,17	0,34	0,17	0,28	0,17	0,21	0,14	0,34	0,31	0,31	0,69	0,00	0,20	0,21	0,24	0,13	0,31
9	0,28	0,21	0,14	0,17	0,10	0,21	0,10	0,00	0,31	0,17	0,28	0,00	0,21	0,03	0,17	0,03	0,07	0,14	0,21	0,28	0,31	0,07	0,24	0,24	0,17	0,21	0,24	0,17	0,38	0,21	0,21	0,69	0,00	0,07	0,24	0,21	0,00	0,34
10	0,28	0,24	0,17	0,21	0,28	0,41	0,41	0,31	0,00	0,14	0,28	0,33	0,41	0,34	0,21	0,34	0,40	0,34	0,28	0,34	0,21	0,34	0,31	0,34	0,17	0,38	0,31	0,41	0,34	0,38	0,24	0,83	0,00	0,40	0,28	0,28	0,33	0,38
11	0,17	0,31	0,24	0,28	0,21	0,31	0,28	0,17	0,14	0,00	0,14	0,07	0,34	0,21	0,07	0,21	0,13	0,21	0,14	0,31	0,34	0,21	0,17	0,28	0,24	0,38	0,31	0,28	0,41	0,31	0,24	0,72	0,00	0,13	0,17	0,24	0,07	0,38
12	0,14	0,31	0,38	0,34	0,28	0,28	0,24	0,28	0,28	0,14	0,00	0,20	0,45	0,31	0,17	0,31	0,27	0,21	0,10	0,31	0,48	0,28	0,24	0,28	0,38	0,34	0,31	0,21	0,34	0,41	0,38	0,76	0,00	0,27	0,17	0,34	0,20	0,34
13	0,27	0,40	0,27	0,33	0,20	0,27	0,13	0,00	0,33	0,07	0,20	0,00	0,27	0,07	0,07	0,07	0,07	0,20	0,07	0,33	0,40	0,13	0,13	0,33	0,27	0,33	0,33	0,27	0,53	0,20	0,20	0,53	0,00	0,07	0,27	0,20	0,00	0,47
14	0,38	0,34	0,28	0,31	0,31	0,41	0,31	0,21	0,41	0,34	0,45	0,27	0,00	0,17	0,28	0,17	0,20	0,34	0,38	0,34	0,31	0,21	0,34	0,34	0,38	0,31	0,38	0,31	0,38	0,21	0,34	0,66	0,00	0,20	0,41	0,34	0,27	0,45
15	0,24	0,24	0,17	0,21	0,14	0,24	0,14	0,03	0,34	0,21	0,31	0,07	0,17	0,00	0,14	0,00	0,00	0,17	0,24	0,31	0,28	0,03	0,21	0,28	0,21	0,24	0,28	0,14	0,34	0,17	0,24	0,66	0,00	0,00	0,28	0,24	0,07	0,34
17	0,10	0,38	0,31	0,34	0,28	0,31	0,28	0,17	0,21	0,07	0,17	0,07	0,28	0,14	0,00	0,14	0,00	0,28	0,14	0,31	0,34	0,17	0,14	0,34	0,31	0,38	0,38	0,24	0,38	0,24	0,31	0,66	0,00	0,00	0,24	0,24	0,07	0,34
18	0,24	0,24	0,17	0,21	0,14	0,24	0,14	0,03	0,34	0,21	0,31	0,07	0,17	0,00	0,14	0,00	0,00	0,17	0,24	0,31	0,28	0,03	0,21	0,28	0,21	0,24	0,28	0,14	0,34	0,17	0,24	0,66	0,00	0,00	0,28	0,24	0,07	0,34
20	0,20	0,47	0,33	0,40	0,27	0,33	0,20	0,07	0,40	0,13	0,27	0,07	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,13	0,40	0,33	0,07	0,07	0,40	0,33	0,40	0,40	0,20	0,47	0,13	0,27	0,47	0,00	0,00	0,33	0,27	0,07	0,47
21	0,24	0,14	0,21	0,17	0,10	0,21	0,10	0,14	0,34	0,21	0,21	0,20	0,34	0,17	0,28	0,17	0,27	0,00	0,24	0,31	0,31	0,17	0,31	0,17	0,21	0,21	0,10	0,07	0,28	0,34	0,28	0,72	0,00	0,27	0,10	0,34	0,20	0,31
22	0,17	0,34	0,34	0,31	0,24	0,28	0,24	0,21	0,28	0,14	0,10	0,07	0,38	0,24	0,14	0,24	0,13	0,24	0,00	0,31	0,45	0,28	0,21	0,31	0,31	0,34	0,34	0,28	0,41	0,34	0,34	0,69	0,00	0,13	0,21	0,28	0,07	0,38
23	0,24	0,31	0,34	0,34	0,34	0,24	0,28	0,28	0,34	0,31	0,31	0,33	0,34	0,31	0,31	0,31	0,40	0,31	0,31	0,00	0,48	0,34	0,38	0,28	0,34	0,21	0,28	0,34	0,31	0,21	0,28	0,79	0,00	0,40	0,28	0,14	0,33	0,24
24	0,41	0,24	0,17	0,21	0,28	0,48	0,38	0,31	0,21	0,34	0,48	0,40	0,31	0,28	0,34	0,28	0,33	0,31	0,45	0,48	0,00	0,28	0,38	0,31	0,17	0,38	0,28	0,31	0,31	0,38	0,31	0,79	0,00	0,33	0,38	0,38	0,40	0,45
25	0,28	0,24	0,17	0,21	0,14	0,28	0,17	0,07	0,34	0,21	0,28	0,13	0,21	0,03	0,17	0,03	0,07	0,17	0,28	0,34	0,28	0,00	0,17	0,28	0,21	0,28	0,28	0,10	0,31	0,21	0,24	0,69	0,00	0,07	0,28	0,28	0,13	0,38
26	0,24	0,41	0,34	0,38	0,31	0,38	0,34	0,24	0,31	0,17	0,24	0,13	0,34	0,21	0,14	0,21	0,07	0,31	0,21	0,38	0,38	0,17	0,00	0,41	0,31	0,45	0,41	0,24	0,38	0,31	0,34	0,66	0,00	0,07	0,28	0,31	0,13	0,45
27	0,31	0,17	0,24	0,21	0,21	0,31	0,17	0,24	0,34	0,28	0,28	0,33	0,34	0,28	0,34	0,28	0,40	0,17	0,31	0,28	0,31	0,28	0,41	0,00	0,28	0,17	0,21	0,24	0,31	0,31	0,31	0,79	0,00	0,40	0,28	0,28	0,33	0,31
28	0,38	0,17	0,10	0,14	0,14	0,34	0,28	0,17	0,17	0,24	0,38	0,27	0,38	0,21	0,31	0,21	0,33	0,21	0,31	0,34	0,17	0,21	0,31	0,28	0,00	0,24	0,17	0,28	0,34	0,31	0,17	0,83	0,00	0,33	0,31	0,28	0,27	0,34
29	0,34	0,14	0,21	0,17	0,17	0,28	0,17	0,21	0,38	0,38	0,34	0,33	0,31	0,24	0,38	0,24	0,40	0,21	0,34	0,21	0,38	0,28	0,45	0,17	0,24	0,00	0,14	0,24	0,31	0,24	0,24	0,79	0,00	0,40	0,31	0,28	0,33	0,24
30	0,34	0,10	0,17	0,14	0,14	0,31	0,21	0,24	0,31	0,31	0,33	0,38	0,28	0,38	0,28	0,40	0,10	0,34	0,28	0,28	0,28	0,41	0,21	0,17	0,14	0,00	0,17	0,31	0,31	0,17	0,76	0,00	0,40	0,21	0,38	0,33	0,31	
31	0,21	0,21	0,28	0,24	0,17	0,24	0,14	0,17	0,41	0,28	0,21	0,27	0,31	0,14	0,24	0,14	0,20	0,07	0,28	0,34	0,31	0,10	0,24	0,24	0,28	0,24	0,17	0,00	0,21	0,31	0,34	0,69	0,00	0,20	0,17	0,38	0,27	0,31
32	0,31	0,28	0,34	0,31	0,38	0,34	0,34	0,38	0,34	0,41	0,34	0,53	0,38	0,34	0,38	0,34	0,47	0,28	0,41	0,31	0,31	0,31	0,38	0,31	0,34	0,31	0,31	0,21	0,00	0,34	0,41	0,72	0,00	0,47	0,28	0,34	0,53	0,28
33	0,34	0,34	0,28	0,31	0,31	0,38	0,31	0,21	0,38	0,31	0,41	0,20	0,21	0,17	0,24	0,17	0,13	0,34	0,34	0,21	0,38	0,21	0,31	0,31	0,31	0,24	0,31	0,31	0,34	0,00	0,24	0,72	0,00	0,13	0,38	0,21	0,20	0,34
34	0,41	0,21	0,14	0,17	0,17	0,28	0,31	0,21	0,24	0,24	0,38	0,20	0,34	0,24	0,31	0,24	0,27	0,28	0,34	0,28	0,31	0,24	0,34	0,31	0,17	0,24	0,17	0,34	0,41	0,24	0,00	0,76	0,00	0,27	0,31	0,28	0,20	0,31
35	0,69	0,79	0,79	0,76	0,72	0,76	0,69	0,69	0,83	0,72	0,76	0,53	0,66	0,66	0,66	0,66	0,47	0,72	0,69	0,79	0,79	0,69	0,66	0,79	0,83	0,79	0,76	0,69	0,72	0,72	0,76	0,00	1,00	0,47	0,69	0,79	0,53	0,83
36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
37	0,20	0,47	0,33	0,40	0,27	0,33	0,20	0,07	0,40	0,13	0,27	0,07	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,13	0,40	0,33	0,07	0,07	0,40	0,33	0,40	0,40	0,20	0,47	0,13	0,27	0,47	0,00	0,00	0,33			