

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HIBRIDAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NA SENESCÊNCIA DE GÉRBERA
VISANDO O SILENCIAMENTO DE GENES E
MELHORAMENTO GENÉTICO

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2012.

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HIBRIDAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NA SENESCÊNCIA DE GÉRBERA
VISANDO O SILENCIAMENTO DE GENES E
MELHORAMENTO GENÉTICO

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO

Orientadora: Profa. PhD. Magali Ferrari Grando
Coorientadora: PhD. Sandra Cristina Kothe Milach

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2012.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

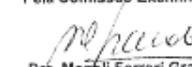
"Hibridação e Identificação de genes envolvidos na senescência de gérmen
visando o silenciamento de genes e melhoramento genético"

Elaborada por

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Doutor em Agronomia – Área de Produção Vegetal"

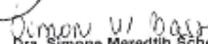
Aprovada em: 30/03/2012
Pela Comissão Examinadora


Dra. Magali Ferrari Grando
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora

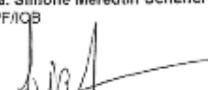

Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coordenadora PPGAgro


Dra. Sandra Cristina Kothe Milach
Pioneer Sementes
Co-orientadora


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
UPF/IOB


Dra. Marcia Maria Auxiliadora Naschenverg
Pinheiro Margis
UFRGS


Dra. Lizete Augustin
FAMV/UPF

CIP – Catalogação na Publicação

C268h Cardoso, Raquel Dalla Lana
Hibridação e identificação de genes envolvidos na senescência
de gérbera visando o silenciamento de genes e melhoramento
genético / Raquel Dalla Lana Cardoso. – 2012.
166 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. PhD. Magali Ferrari Grando
Coorientadora: PhD. Sandra Cristina Kothe Milach
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo
Fundo, 2012.

1. Gérbera. 2. Plantas ornamentais – Melhoramento genético –
Rio Grande do Sul. I. Grando, Magali Ferrari, orientadora. II.
Milach, Sandra Cristina Kothe, coorientadora. III. Título.

CDU: 635

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Sandra Cristina Kothe Milach e Magali Ferrari Grando, pelos ensinamentos, exemplo de vida e profissionalismo, por acreditarem em meu potencial, pelo incentivo a sempre buscar novos desafios e experiências, pelo carinho e amizade.

À CAPES pela concessão de bolsa que viabilizou minha formação e profissionalização e principalmente pela maravilhosa experiência vivenciada em estágio nos EUA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade e pelo aprimoramento profissional.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia que contribuíram para minha formação e construção do conhecimento, em especial, à Simone Scheffer-Basso e Vilson Klein.

À Universidade de Passo Fundo e à Universidade da Califórnia/ EUA, pela disponibilização de infraestrutura para a realização dos experimentos.

Aos colegas do PPGAgro e à todos os amigos conquistados no decorrer desta jornada, obrigada pelo convívio, pela motivação e pelo carinho.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Marilei Suzin, Clarício Machado e Maico Savoldi, pela amizade, cooperação e auxílio nos experimentos.

À professora Dra. Lizete Augustin, pelos conhecimentos, sugestões, apoio e incentivo a desvendar os mistérios da gérbera.

As estudantes dos cursos de Ciências Biológicas, Amábile Scorteganha, e de Agronomia, Renata Costenaro, pela dedicação e colaboração na realização dos experimentos.

Ao pesquisador da USDA/ARS, Cai-Zhong Jiang, pela confiança, pela oportunidade e orientação nos experimentos realizados na Universidade da Califórnia.

Aos colegas e pesquisadores do Mann Louis Laboratório, em especial à Linda Donnelly, da USDA/ARS, pelos ensinamentos, auxílio nos experimentos realizados, troca de experiência, carinhosa acolhida e amizade.

Aos meus pais, Cladimir e Eliane, meus avós e demais familiares, pela vida, carinho, alegria, por sempre serem meu porto seguro, e pelo incentivo a persistir na busca de meus sonhos e ideais durante toda minha jornada acadêmica.

Ao meu marido Ricardo Moreira, pelo amor e apoio incondicional, incentivo a alçar novos voos em busca de conhecimento e aceitar minha longa ausência durante o estágio no exterior, pelo companheirismo durante todos os momentos alegres e difíceis no decorrer desta jornada.

À Mari Viecelli, secretária da PPGAGRO, e à Aline Rocha, da Divisão de Pós-Graduação da UPF, por serem sempre tão prestativas e pelo auxílio e no preparo de tantos documentos.

Aos grandes amigos, que souberam entender a ausência e dar apoio nos momentos difíceis, e torcer por esta conquista.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão.

E, principalmente, a DEUS, por sempre estar presente iluminando meus caminhos.

SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas	vii
Lista de figuras	x
Lista de siglas, abreviaturas, símbolos e unidades	xiv
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Caracterização da espécie	8
2.2 Aspectos morfológicos do capítulo e sistema reprodutivo em gérbera	8
2.3 Hibridação e melhoramento genético	12
2.3.1 Melhoramento genético em gérbera	16
2.4 Novas tecnologias no melhoramento	20
2.4.1 Técnicas moleculares utilizadas no estudo da expressão gênica	22
2.4.2 Etiquetas de Sequência Expressa (EST).....	22
2.4.3 Silenciamento gênico e sua aplicação	23
2.4.3.1 Silenciamento gênico pós-transcricional	24
2.4.3.2 RNA anti-senso	26
2.4.3.3 RNA interferência (RNAi)	27
2.4.3.4 Silenciamento gênico por indução viral (VIGS)	28
2.5 Senescência floral	32
 CAPÍTULO I	
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	37
1 INTRODUÇÃO.....	39
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Experimento 1 – Hibridação em gérbera	43
2.2 Experimento 2 – Germinação de sementes e segregação da progênie	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1 Experimento 1 – Hibridação em gérbera	56
3.2 Experimento 2 – Germinação de sementes e segregação da progênie	69
4 CONCLUSÕES.....	84

CAPÍTULO II

RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	87
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
4 CONCLUSÕES.....	121

CAPÍTULO III

RESUMO.....	122
ABSTRACT.....	124
1 INTRODUÇÃO.....	125
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	129
2.1 Experimento 1 – Avaliação da eficácia de diferentes métodos de inoculação de <i>Agrobacterium</i> para VIGS em gérbera	133
2.2 Experimento 2 – Avaliação de diferentes concentrações do meio de infiltração para otimizar a técnica VIGS em gérbera	135
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	136
3.1 Experimento 1 – Avaliação da eficácia de diferentes métodos de inoculação de <i>Agrobacterium</i> para VIGS em gérbera	136
3.2 Experimento 2 – Avaliação de diferentes concentrações do meio de infiltração para otimizar a técnica VIGS em gérbera	139
4 CONCLUSÕES.....	144
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Hibridação artificial em gérbera: formação de sementes e segregação da progênie

Tabela		Página
1	Denominação, procedência e características gerais dos acessos de gérbera	44
2	Composição química das soluções nutritivas utilizadas nas fertilizações de gérbera	45
3	Esquema dialélico envolvendo GWC, A7 e A8, seus híbridos F1's e recíprocos	51
4	Número de capítulos em que houve formação de sementes quando apenas protegidos e quando submetidos a polinização manual com pólen da mesma planta (geitonogamia), porém de diferentes capítulos.....	57
5	Número de sementes formadas nos capítulos submetidos polinização com pólen da mesma planta	58
6	Média de flores do raio, sementes formadas e percentagem de sementes formadas nos capítulos dos genótipos A7, A8 e Green White Center, submetidos polinização com pólen da mesma planta (geitonogamia).....	59
7	Viabilidade média do pólen (VMP) de diferentes acessos de gérbera, número, média (MS) e frequência (F) de sementes formadas em cruzamentos envolvendo a cv. Green White Center (GWC) e o acesso A8, como genitores femininos e diferentes acessos de gérbera como genitores masculinos.....	62
8	Análise de variância para influência de genitor masculino e dias de polinização (blocos) na formação de sementes em gérbera.....	63
9	Análise de variância para influência de genitor feminino, masculino, interação destes na formação de sementes em gérbera	64
10	Número de sementes formadas em cruzamentos envolvendo os genitores femininos, Green White	

	Center (GWC) e A8, e diferentes genitores masculinos	65
11	Porcentagem média do número de sementes obtidas em cruzamentos de gérbera envolvendo diferentes genitores femininos e masculinos.....	67
12	Média de produção de semente de três genitores de gérbera, de seus híbridos F ₁ 's dos recíprocos	68
13	Análise de variância da produção de sementes de gérbera para um dialelo envolvendo três genitores, seus híbridos F ₁ 's e recíprocos.....	69
14	Número de sementes semeadas (NS), número de sementes germinadas (NSG) e frequência (F) de semente germinadas aos 30 e 60 dias, para diferentes cruzamentos envolvendo como genitores femininos a cv. White Green Center (GWC), A7 e A8, e como genitores masculinos a cv. GWC, A7 e A8	70
16	Distribuição em classes*, média e desvio padrão dos pais e das progênies obtidas de diferentes cruzamentos de gérbera para o caractere diâmetro de planta	73
17	Distribuição em classes* , média e desvio padrão dos pais e das progênies obtidas de diferentes cruzamentos de gérbera para o caractere estatura de plantas.....	74
18	Distribuição de classes*, média e desvio padrão dos pais e das progênies obtidas de diferentes cruzamentos de gérbera para o caractere comprimento da maior folha	75
19	Distribuição em classe* , média e desvio padrão da progênie obtida de diferentes cruzamentos de gérbera para o caractere largura da folha	76
20	Média, desvio padrão (σ), amplitude e herdabilidade de diferentes caracteres florais avaliados nas haste floral de gérbera (escapo + capítulo) oriundas da progênie obtida do cruzamento entre a Green White Center e A8	78

CAPÍTULO II: Avaliação da expressão de transcritos de etiquetas de sequência expressa e genes relacionados a senescência floral em gérbera

Tabela		Página
1	Denominação, caracterização e aspecto geral do capítulo de gérbera durante os diferentes estádios de senescência em que foram coletadas as corolas de gérbera para os estudos de expressão de genes.....	96
2	Códigos e descrição das etiquetas de sequência expressa investigadas neste estudo	99
3	Sequência dos iniciadores utilizado na PCR para as EST escolhidas e tamanhos dos fragmentos amplificados	100

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Hibridação artificial em gérbera: formação de sementes e segregação da progênie obtida

Figura		Página
1	Processo de hibridação em gérbera.....	47
2	Variáveis avaliadas no escapo: (a) comprimento do escapo e (b) diâmetro do escapo.....	55
3	Variáveis avaliadas no capítulo de gérbera (a) diâmetro do capítulo, (b) diâmetro do centro do capítulo, (c) diâmetro do involúcro e (d) largura do lábio superior da flor do raio.....	55
4	Número de plantas obtidas em diferentes cruzamentos de gérbera e número de plantas sobreviventes em diferentes épocas de avaliação.....	60
5	Capítulo de gérbera da variedade GWC após primeira polinização, em detalhe os estigmas escuros, indicativo de que houve fertilização	66
6	Percentagem de germinação de sementes obtidas nos diferentes cruzamentos realizados para gérbera.....	71
7	Aspecto dos capítulos dos genitores: (A) cultivar de vaso Green White Center e (B) acesso não comercial A8	79
8	Aspecto dos capítulos de gérbera oriundos da progênie originada do cruzamento entre a Green White Center e A8	81

CAPÍTULO II: Avaliação da expressão de transcritos de etiquetas de sequência expressa e genes relacionados a senescência floral em gérbera

Figura		Página
1	Vista externa do Louis Mann Laboratory, Universidade da Califórnia, Davis/ EUA, onde os experimentos de identificação de genes relacionados a senescência floral de gérbera foram desenvolvidos	93

2	Híbrido 32 de <i>Gerbera hybrida</i> (vermelho e com capítulo semidorbrado), utilizado para coleta das amostras para verificação da expressão de sequências e genes relacionados a senescência	94
3	Estádios de desenvolvimento da inflorescência de <i>Gerbera hybrida</i> descritos por Helariutta et al (1993) (a); desenvolvimento das pétalas nos respectivos estádios de desenvolvimento do capítulo (b)	95
4	Aspecto das corolas da flores do raio no estágio 9 e 15 de senescência, respectivamente 9 e 15 dias após a inflorescência ter atingido o estágio comercial	109
5	Perfil eletroforético de PCR de cDNA normalizado, obtido de RNA extraído de corolas de gérbera, em diferentes estádios de senescência do capítulo, para o gene 26s rRNA..	110
6	Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas receptor do tipo proteína kinase (Ger LRR) e SMT 3 proteína tipo ubiquitina (Ger Ubi) e para o gene SAG gérbera	111
7	Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos de cDNA na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências ger Apt2 (proteína contendo o domínio apt2), e os genes associados a senescência em petúnia, MT Petunia, e em <i>Hemerocallis</i> sp., SAG Daylily	112
8	Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas da Thiol protease (Ger thi pro), 26S proteasome ATPase subunit (Ger 26S prot) e o gene SAG Daylily (2)	114
9	Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas da Protease 1 (Ger protease), Beta-	

	galactosidase (Ger B-gal), <i>Putative</i> cisteína proteinase (Ger Cys Prot) e o Gel-Bel 1	115
10	Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas da Enzima precursora do processo vacuolar (Ger vacuolar), Fator de transcrição bHLH para GBOF-1 (Ger bHLH1), Inibidor da cisteína proteinase (Ger Inhibit Cys) e CCAAT-binding transcription factor subunit A (CBF-A) (Ger CCAAT)	116
11	Perfil eletroforético de PCR de cDNA normalizado para proteína semelhante a WD repetitiva (Ger WD), obtido de RNA extraído de corolas de gérbera, em diferentes estádios de senescência	118
12	Perfil eletroforético de PCR de cDNA normalizado para o gene Cyp Ipomea, obtido de RNA extraído de corolas de gérbera, nos diferentes estádios de senescência	119
13	Perfil eletroforético de PCR da expressão de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para as sequências expressas: proteína semelhante a subtilin proteinase (Ger sub pro), <i>Putative</i> serine carboxypeptidase (Ger ser. Carboxyp.), e o gene associado a senescência flora SA4 Daylily.....	119

CAPÍTULO III: Avaliação do uso da técnica de silenciamento gênico por indução viral em gérbera

Figura		Página
1	Vista externa do Louis Mann Laboratory, Universidade da Califórnia, Davis/ EUA, onde os experimentos de identificação de genes relacionados a senescência floral de gérbera foram desenvolvidos	129
2	Capítulos de <i>Gerbera hybrida</i> das variedades utilizadas neste experimento.....	130
3	Esquema das construções do vetor viral Tobacco	

	rattle virus. O vetor para VIGS-TRV compreende dois plasmídeos que codificam os RNAs virais RNA1 e RNA2.....	131
4	Diferentes formas de infiltração contendo a <i>Agrobacterium</i> carregando os vetores virais testadas para VIGS em gérbera.....	134
5	Aspecto do material vegetal em que seria realizada o tratamento 2, injeção da solução de infiltração no rizoma de gérbera	137
6	Aspecto das plantas submetidas aos diferentes métodos de inoculação na avaliação dos 50 dias.	138
7	Avaliação aos 30 dias da visualização do fotobranqueamento em folhas de gérbera submetidas a diferentes concentrações do meio de infiltração.....	140
8	Fenótipo do fotobranqueamento devido ao silenciamento gênico induzido pelo sistema VIGS, em <i>Gerbera hybrida</i> adulta, resultante da inoculação por injeção do meio de infiltração com <i>Agrobacterium</i> contendo o pTRV1 e pTRV2 carregando a sequência para o gene PDS, na concentração de 3.0 O.D. observada 21 dias após a quinta inoculação semanal.....	142

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ARS	Serviço de Pesquisa Agrícola (<i>Agricultural Research Service</i>)
°C	graus Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
CEC	Capacidade Específica de Combinação
CGC	Capacidade Geral de Combinação
CHS	enzima chalcone sintase
cv.	cultivar(es)
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EST	Etiqueta(s) de Sequência (s) Expressa (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
GWC	cultivar de gérbera Green White Center
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
M	Molar(es)
Mg	miligrama(s)
mL	mililitro(s)
mM	milimolar(es)
mRNA	RNA mensageiro
mV	Milivolts
µL	microlitro(s)
µM	micromolar(es)
Nm	nanômetro(s)
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
OD	densidade óptica
Pb	par(es) de base
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
PDS	Fitoene dessaturase
Rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	PCR em tempo real (<i>real time PCR</i>)
Rpm	Rotação por minuto
S	Segundo (s)

SAG	gene associados a senescência (<i>Senescence associated gene</i>)
siRNA	pequeno(s) RNA de interferência (21 a 25 nucleotídeos) (<i>short interfering RNAs</i>)
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
U	unidade(s) de atividade enzimática
UC-Davis	Universidade da Califórnia Campus Davis (University of California – Davis)
UPF	Universidade de Passo Fundo
USDA	Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (<i>United States Department of Agriculture</i>)
VIGS	Silenciamento Gênico por Indução Viral (<i>Virus Induced Gene Silencing</i>)

**HIBRIDAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NA SENESCÊNCIA DE GÉRBERA VISANDO O
SILENCIAMENTO DE GENES E MELHORAMENTO
GENÉTICO**

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO¹

RESUMO – A produção brasileira de gérbera (*Gerbera hybrida* Hort.) é dependente tecnologicamente de empresas multinacionais que realizam o processo de melhoramento e fornecem variedades para o mercado nacional. Assim, o desenvolvimento de programas de melhoramento nacionais podem contribuir para redução de tal dependência, obtenção de cultivares mais adaptadas às condições ambientais brasileiras, e melhores rendimentos. Informações sobre as técnicas de hibridação em gérbera são pouco publicadas devido à importância comercial e pelo fato do melhoramento desta espécie ser realizado principalmente por empresas privadas. Estudos para compreender o sistema reprodutivo de gérbera vem sendo realizados mas a produção de sementes nas hibridações tem sido insatisfatória. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de fornecer subsídios para o melhoramento genético de gérbera, contribuindo para a redução da atual dependência externa quanto aos cultivares de flores comercializadas no país. Três estudos foram realizados: hibridação artificial e seu efeito na formação de sementes e análise da progênie obtida, realizado em ambiente semi-protegido na UPF; avaliação da

¹ Bióloga Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAGRO) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção Vegetal.

expressão de transcritos de etiquetas de sequência expressa e genes relacionados a senescência floral; avaliação da técnica de silenciamento gênico por indução viral, realizadas na Universidade da Califórnia, Davis-EUA. Confirmou-se a ocorrência de geitonogamia na planta e ausência de autoincompatibilidade nos genótipos de gérbera estudados. Devido ao alto CV, não foi detectada significância estatística para capacidade geral e específica de combinação para a formação de sementes. Foi possível gerar populações segregantes e alta herdabilidade foi encontrada para a maioria das características florais avaliadas. Das dezesseis etiquetas de sequência expressa e seis genes associados a senescência floral avaliados, treze apresentaram aumento da expressão e quatro diminuição da expressão com o avançar dos estádios de senescência. A técnica de silenciamento gênico por indução viral pode ser utilizada em gérbera, no entanto, precisa ser otimizada para se obter um silenciamento gênico mais efetivo e assim, ser aplicada em estudos de identificação da função gênica.

Palavras-chave: Autoincompatibilidade, geitonogamia, VIGS, silenciamento gênico, herdabilidade

**HYBRIDIZATION AND IDENTIFICATION OF GENES
INVOLVED IN FLORAL SENESCENCE OF GERBERA
TARGETING THE GENE SILENCING AND BREEDING**

ABSTRACT- The Brazilian production of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) is dependent of multinational companies that perform the breeding process and provide genetic materials for the internal market. Thus, the development of national breeding programs could help to reduce this dependence, to obtain adapted cultivars to Brazilian environmental conditions and improve yield. Information about hybridization techniques are not published because of the commercial importance and due to the fact that breeding is executed by private companies. Studies to understand the reproductive system of gerbera have been made but the seed production in hybridizations has been low. This work was carried out to provide subsidies for the breeding of gerbera, helping to reduce the current dependence of flowers cultivars sold in the country. Three studies were performed: artificial hybridization and its effect on seed formation and analysis of progeny obtained, carried out in semi-protected environment at UPF; evaluation of the expression of transcripts expressed sequence tags and genes related to flower senescence; evaluation of virus-induced gene silencing technique, carried out at the University of California, Davis-USA. The occurrence of geitonogamy and no self-incompatibility were confirmed. The influence the general and specific combining ability for the formation of seeds was not significant. It was possible to generate segregant populations and high herdability was found for most floral traits evaluated. Sixteen

expressed sequence tag and six senescence associated gene were evaluated, thirteen were up regulated and four down regulated with advancing stages of senescence. The virus-induced gene silencing can be used, however, must be optimized to obtain a more effective gene silencing and be applied in studies for identification of gene function.

Key words: Self-incompatibility, geitonogamy, VIGS, gene silencing, herdbability

1 INTRODUÇÃO

A floricultura é uma atividade agrícola de importância econômica e social crescentes no mundo, sendo exigente em tecnologia de produção e com um sistema eficiente e rápido de distribuição e comercialização. A produção mundial de plantas ornamentais movimentava valores próximos a 16 bilhões de dólares por ano ao nível de produtores, enquanto que no varejo, este valor ultrapassa a 44 bilhões de dólares/ano (KIYUNA et al., 2003). Dentro desta cadeia produtiva, a gérbera (*Gerbera hybrida* Hort.) é uma das mais importantes flores-de-corte do mercado internacional, destacando-se especialmente na Europa, Israel, Colômbia e Estados Unidos. A procura por esta ornamental é expressiva. Anualmente, na Califórnia (EUA), são produzidos mais de 60 milhões de hastes de gérbera gerando um faturamento de US\$ 30 milhões/ano, e na Europa, nos leilões holandeses, as vendas excedem 100 milhões de hastes gerando valores superiores a € 100 milhões (TEERI et al., 2006). Segundo Yakoni (2008), a produção de gérbera na maioria dos países, inclusive no Brasil, é dependente da importação de mudas da Holanda, país onde se encontram as principais empresas de melhoramento da espécie.

As modernas cultivares de gérbera são o resultado do melhoramento genético, o qual tem proporcionado a obtenção de genótipos elites com boas características morfológicas e econômicas desejadas comercialmente. No entanto, apesar do sucesso no melhoramento desta ornamental, as técnicas de polinização e hibridação em gérbera são pouco publicadas, devido à importância

comercial dos híbridos gerados por estes procedimentos e o melhoramento de plantas ornamentais vir sendo, principalmente, realizado por empresas privadas. Apesar disso, alguns estudos com hibridação artificial em gérbera foram relatados recentemente (SOUZA et al., 2005; MARIA & CHIS, 2006; CARDOSO et al., 2009). Maria & Chis (2006), realizando hibridações em gérbera, não obtiveram uma produção de sementes satisfatória. Cardoso et al., (2009) também observaram uma baixa frequência de formação de sementes (4%) no cruzamento entre as cultivares comerciais. Os autores sugeriram haver algum tipo de incompatibilidade ou depressão endogâmica, pelo alto grau de parentesco dos parentais, uma vez que no cruzamento entre acessos não comerciais e cultivares esta frequência foi de 50%. Tais resultados motivaram o presente estudo, cuja primeira hipótese foi ser possível realizar fecundação cruzada e autofecundação (pelo uso da geitonogamia) e obter progênies com variabilidade genética para os caracteres desejados comercialmente para gérbera, permitindo a obtenção de novas cultivares.

A longevidade pós-colheita é uma das características comerciais mais importante, pois contribui para diminuir as perdas ao longo da cadeia produtiva, entre a produção e a distribuição, permitindo ao consumidor ter plantas com maior vida de vaso. A senescência floral é um processo fisiológico controlado geneticamente, sendo assim, a segunda hipótese deste trabalho foi que é possível identificar genes diferencialmente expressos no decorrer do período de senescência. A identificação destes genes pode contribuir tanto para o entendimento do processo de senescência, através do

silenciamento gênico, quanto para o desenvolvimento de cultivares com uma maior longevidade pós-colheita pela engenharia genética.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo geral de fornecer subsídios para o melhoramento genético de gérbera de forma a contribuir para a redução da atual dependência externa quanto aos cultivares de flores comercializadas no país, sendo os objetivos específicos:

- 1) Verificar a ocorrência de incompatibilidade em gérbera;
- 2) Avaliar a capacidade combinatória para formação de sementes;
- 3) Estimar o modo de herança e a herdabilidade de caracteres morfológicos de capítulos de gérbera importantes comercialmente;
- 4) Identificar genes relacionados a senescência floral em gérbera;
- 5) Avaliar o uso da metodologia de silenciamento gênico por indução viral em gérbera;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da espécie

A gérbera é uma planta perene, herbácea, da Família Asteraceae. O gênero compreende cerca de trinta espécies distribuídas pela África, Madagascar, Ásia tropical e uma espécie originada nos Andes do Peru, América do Sul (BARROSO, 1991). As modernas cultivares de gérbera apresentam uma grande variabilidade em decorrência do longo processo de melhoramento que vem sendo realizado nesta espécie, originada do cruzamento de *G. jamesonii* e *G. viridifolia*. Dentre estas duas espécies, a primeira é a mais importante contribuidora para as modernas cultivares. Híbridos naturais destas duas espécies não foram encontrados e é possível também que outras espécies de gérberas tenham sido utilizadas pelos melhoristas nos cruzamentos (HANSEN, 1985; HANSEN, 1999; KLOSS et al., 2005a).

2.2 Aspectos morfológicos do capítulo e sistema reprodutivo em gérbera

A gérbera apresenta a típica inflorescência da família Asteraceae, que é o capítulo, que são grandes e solitários e com uma ampla variedade de cores que vão dos tons pastéis, como o creme, rosa, salmão até o vermelho vibrante, laranja e púrpura. Tourjee et al. (1995) estudaram o complexo de segregação da coloração das flores de gérbera e constataram que a distribuição da cor parece ser bimodal,

o que sugere que o controle genético seja determinado por um gene com grande efeito o qual é modificado pela adição de genes de pequeno efeito. Além da variação nas cores das flores do capítulo, há também a variação na cor do centro do capítulo, o qual é classificado como claro ou escuro. A pigmentação escura deve-se ao acúmulo de antocianinas no *pappus*. Kloss et al. (2005b), analisando o modo de herança da cor do disco, constataram que a coloração escura é determinada por um único gene dominante, designado *Dc*, e a coloração clara pelo gene recessivo *dc*. A dominância parece ser completa, pois plantas homozigotas ou heterozigotas para o gene *Dc* apresentam coloração similar.

Botanicamente, o capítulo de gérbera é classificado como actinomorfo, ou seja, de simetria radial (CABRERA & KLEIN, 1973; BARROSO, 1991; ELOMAA & TEERI, 2001). No entanto, comercialmente, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2011) classifica os capítulos de gérbera em simples, semidobrados e dobrados (Figura 1). Cardoso et al. (2009) propuseram o uso de um índice de sobreposição das flores do raio para classificar os capítulos de gérbera em simples, semidobrado e dobrados, e assim, padronizar a classificação a qual é realizada mediante a comparação com figuras do MAPA, sendo subjetiva, o que tem gerado algumas contradições nas classificações.

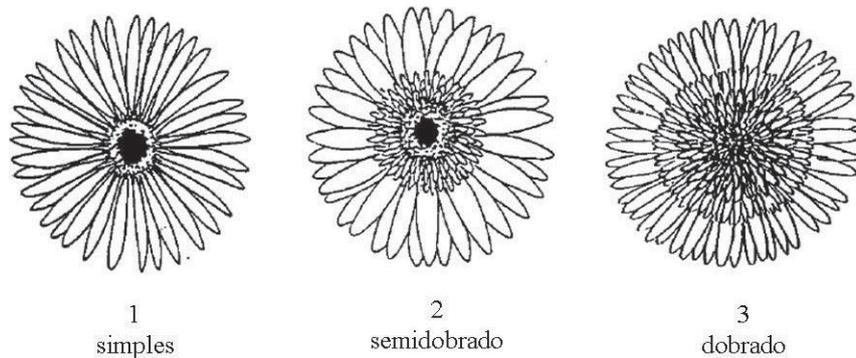


Figura 1 - Tipos de capítulo em gérbera. Fonte: MAPA, 2011.

De acordo com Kloss et al. (2004), o modo de herança dos genes que determinam o tipo de capítulo em gérbera é de dominância incompleta e que gérberas homozigotas dominantes para este gene apresentaram capítulos dobrados, as heterozigotas, capítulos semidobrados e as homozigotas recessivas, capítulos simples. Os capítulos semidobrados, dobrados e pétalas do tipo *spider* são variantes das primeiras cultivares mais rústicas, ou seja, as silvestres, que foram observados por melhoristas durante o cultivo de um grande número de progênes segregantes.

A expressão sexual da planta individual de gérbera, com base nos critérios de Frankel & Galun (1977) é ginomonoica, pois apresenta ambas as flores, hermafroditas e femininas. O capítulo de gérbera abriga três tipos de flores (Figura 2), que diferem quanto a morfologia e expressão sexual: as do raio, femininas, localizadas na parte mais externa do capítulo em uma a três séries radiais, as *trans*, femininas, localizadas entre as flores do raio e do disco, e as do disco, hermafroditas, localizadas no centro do capítulo (ELOMAA & TEERI, 2001; KLOSS et al., 2004, TEERI et al., 2006; CARDOSO,

2007). As flores hermafroditas podem ser férteis ou funcionalmente masculinas, no entanto, a formação de sementes tem sido observada nas flores do raio e *trans* (CARDOSO, 2007).

A gérbera é uma espécie de fecundação cruzada, sendo constatado em seu capítulo a separação espacial das flores conforme sua sexualidade: as femininas (flores do raio e *trans*) são localizadas na periferia do capítulo e as hermafroditas (flores do disco) no centro do capítulo. Também é observada a separação temporal do sexo, ocorrendo protoginia, que é a maturação do pistilo antes das anteras. Estes fatores, juntamente com a protandria, maturação das anteras antes do pistilo, encontrada nas flores do disco induzem à alogamia (CARDOSO, 2007).

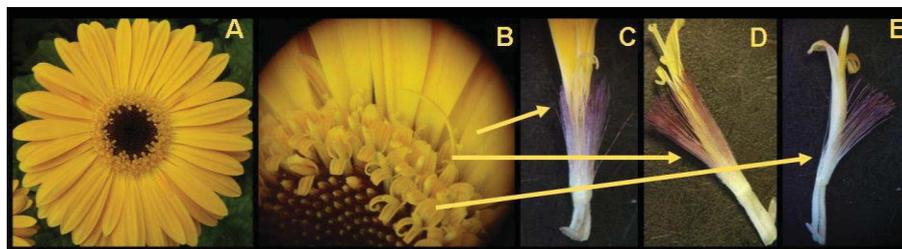


Figura 2 - Tipos de flores encontradas no capítulo de gérbera: (A) vista geral do capítulo; (B) localização dos três diferentes tipos morfológicos de flores (raio, *trans* e disco); (C) flor do raio feminina, fértil (com óvulo) e corola bilabiada-ligulada com lábio externo tridentado e interno bifido; (D) flor *trans*, feminina, com óvulo e corola bilabiado-ligulada com lábio externo tridentado e interno bifido e (E) flor do disco, andróginas, férteis ou estéreis, com corola bilabiada (Fonte: CARDOSO, 2007).

O conhecimento da biologia floral e o modo de reprodução de uma espécie é de extrema importância para hibridação. A hibridação é um processo rotineiramente realizado nos programas de melhoramento

genético por permitir a incorporação de genes, o aumento de variabilidade genética e a produção de híbridos.

2.3 Hibridação e melhoramento genético

A hibridação controlada é uma técnica que possui inúmeras vantagens na síntese de híbridos, pois além de proporcionar o conhecimento da capacidade geral e/ou específica de combinação das matrizes, possibilita o cruzamento entre parentais que apresentam diferenças na floração. Entretanto, a utilização de técnicas não adequadas de coleta, transporte e armazenamento de pólen podem comprometer sua viabilidade, e, conseqüentemente, dificultar a produção de híbridos intraespecíficos e interespecíficos.

A hibridação é uma técnica muito importante para o melhoramento de plantas, uma vez que possibilita a recombinação da variabilidade disponível, permitindo a obtenção de novos materiais, geneticamente superiores. No entanto, para o sucesso desta etapa, é necessário entender as características biológicas do germoplasma, a capacidade combinatória, a segregação e a herança das características de interesse.

O conhecimento e a identificação dos genitores a serem utilizados em hibridações artificiais é uma das mais importantes etapas do melhoramento. A escolha dos genitores com base em caracteres desejáveis per se, é insuficiente para assegurar a obtenção de progênes com alto potencial genético. Dessa forma, a escolha dos parentais se fundamenta em informação genética e em estudos de avaliação da capacidade combinatória, facilita a produção e

identificação de híbridos e populações segregantes promissoras e a, obtenção de progresso genético (LORENCETTI et al., 2005).

As teorias de análise dialélica tiveram início após a introdução dos conceitos de capacidade geral e específica de combinação por Sprague & Tatum (1942). Os autores definiram como capacidade geral de combinação (CGC) o comportamento médio de uma linhagem, cultivar ou outro material genético, em um conjunto de cruzamentos, e como capacidade específica de combinação (CEC) o resultado de uma combinação híbrida em particular que difere do que poderia se prever com base no desempenho médio dos respectivos parentais.

O delineamento genético de cruzamentos dialélicos é uma das formas para a análise da capacidade combinatória. As metodologias de análise dialélica têm por finalidade analisar fornecer estimativas de parâmetros úteis na seleção de parentais para a hibridação e no entendimento dos efeitos gênicos envolvidos na herança dos caracteres (CRUZ et al., 2004). Há vários métodos empregados para análise e interpretação de cruzamentos dialélicos, os quais apresentam peculiaridades e exploram de forma diferenciada os dados, sendo preferida de acordo com os objetivos do pesquisador (CRUZ & REGAZZI, 1997).

Entre os vários métodos propostos para análise dialélica, os principais são o de Jinks & Hayman (1953), o de Gardner & Eberhart (1966), que estuda em detalhes a heterose, e o de Griffing (1956), que fornece informações sobre a capacidade geral e específica de combinação dos genitores em cruzamentos artificiais. Basicamente, os três métodos permitem estimar os efeitos genéticos aditivos e de

dominância, os componentes de variância genética, bem como os parâmetros genéticos como herdabilidade no sentido amplo e restrito e grau médio de dominância.

O método de Griffing (1956) é o mais amplamente utilizado, devido a sua generalidade, uma vez que os parentais podem ser clones, linhas puras, linhas endogâmicas ou populações de autofecundação ou de cruzamento, considerando-se ainda as facilidades de análise e interpretação. Nesta metodologia, as somas dos quadrados de tratamentos são desdobradas em efeitos de capacidade geral, específica de combinação e, dependendo do método, em efeitos recíprocos. CRUZ et al. (2004) relatam diversos tipos de análise dialélica: Balanceados, Parciais, Circulantes, Incompletos e Desbalanceados. Destes, os mais aplicados são os Dialelos Balanceados, propostos Griffing (1956) e Gardner & Eberhart (1966).

A metodologia proposta por Griffing (1956) foi desenvolvida para quatro tipos de tabelas dialélicas, que consistem nos quatro métodos experimentais proposto pelo autor:

Método 1: são incluídos os parentais, o grupo de híbridos F1 e seus recíprocos (todas as p^2 combinações);

Método 2: são incluídos os parentais e o grupo de híbridos F1; $p(p+1)/2$ combinações, faltando os híbridos recíprocos F1;

Método 3: são incluídos o grupo de híbridos F1 e seus recíprocos; $p(p-1)$ combinações, faltando os genitores; e

Método 4: é incluído apenas o grupo de híbridos F1, $p(p-1)/2$ combinações, faltando os genitores e os híbridos F1 recíprocos.

Além dos quatro métodos descritos acima, pode-se considerar ainda, modelo fixo ou aleatório, dependendo dos genótipos utilizados

como genitores. No modelo fixo os parentais são escolhidos criteriosamente em relação a uma população de referência, assim as estimativas obtidas não podem ser extrapoladas para a população. Já no modelo aleatório, os parentais escolhidos ao acaso representam a população de referência, podendo, neste caso, as estimativas obtidas serem extrapoladas para a população.

Segundo Ramalho et al. (1993), a capacidade geral de combinação tem grande importância para o melhorista, uma vez que, com elas é possível obter as informações sobre participação dos efeitos aditivos dos genes na amplitude de variação das gerações segregantes de um dado cruzamento, o que permite a determinação das melhores estratégias para um programa de melhoramento.

O melhoramento de plantas ornamentais vem sendo realizado tradicionalmente por empresas privadas com o objetivo de obter plantas que tenham valor comercial e que sejam competitivas com os híbridos já disponíveis no mercado (SPARNAAIJ, 1976; FILLIETTAZ, 2007). O melhoramento clássico, realizado através de programas de cruzamento (hibridações) e seleção é o mais utilizado para o melhoramento de plantas ornamentais, porém outras técnicas como as mutações (mutações químicas e físicas), variação somaclonal, haploidização, e mais recentemente a engenharia genética, têm oferecido sucesso na produção de cultivares (HAN & LEE, 2002).

As plantas ornamentais são produzidas exclusivamente por seu valor estético. Dessa forma, os programas de melhoramento buscam melhorar atributos qualitativos, como a coloração e forma de flores, longevidade pós-colheita, forma e arquitetura da planta, entre outros. No entanto, com o rápido crescimento da horticultura ornamental, o

objetivo dos melhoristas tem tomado uma nova direção, a busca por novidades não é mais o objetivo principal, a meta é melhorar características quantitativas, uniformidade, produtividade, longevidade, resistência a doenças (SPARNAAIJ, 1976).

2.3.1 Melhoramento genético em gérbera

O melhoramento de gérbera é baseado em cruzamentos sexuais, hibridação e seleção, sendo os genótipos elites propagados através da cultura de tecidos (NAGARAJU et al., 1998; MARIA & CHIS, 2006). Os melhoristas desta espécie tem buscado melhorar propriedades estéticas (coloração e morfologia da flor) e arquitetônicas (ordem e número de órgãos florais, simetria da flor, estrutura da inflorescência). Atualmente, com a grande demanda do mercado, os objetivos estão mais relacionados às características quantitativas e econômicas como produtividade, sincronia de florescimento, tempo de florescimento, vida de vaso (duração pós-colheita), resistência a pragas e doenças principalmente as causadas por fungos, porém este tipo de melhoramento envolve custos altos.

O melhoramento convencional tem oferecido bons resultados devido a grande variabilidade genética entre espécies de gérbera, proporcionando a obtenção de genótipos elite ricos em cores e padrões de coloração dentro do capítulo, combinados com boas características produtivas e econômicas desejáveis comercialmente (SPARNAAIJ, 1976; ELOMAA & TEERI, 2001).

A maioria dos programas de melhoramento genético de gérbera é realizado por empresas da Holanda, Dinamarca, França,

Alemanha, Japão e Israel (KLOSS et al., 2005b), com enfoque para gérbera de corte, não sendo de conhecimento público os materiais genéticos e os métodos de melhoramento utilizados na obtenção destes híbridos, os quais seriam supostamente diploides ($2n=50$) (REYNOIRD et al., 1993; SANE & GOWDA, 2005). Outros países também têm realizado o desenvolvimento de cultivares de gérbera, entre eles Estados Unidos, Itália (OTTAVIANO et al., 1974), Israel, Japão e Holanda, sendo que este último domina todo o mercado internacional (ROGERS & TIJA, 1990).

Este sucesso no melhoramento de gérbera é fruto de muitos estudos já realizados: viabilidade de pólen de gérbera (CARDOSO, 2007), indução de calos e duplicação de cromossomos (MIYOSHI & ASAKURA, 1996), genética quantitativa e populacional (OTTAVIANO et al., 1974), análise de caracteres quantitativos de importância no melhoramento (SCHIVA, 1976), análise da genética quantitativa de dias para o florescimento em gérbera (YU et al., 1991), análise de características morfológicas e variação genética (CHUNG et al., 2001), análise do complexo de segregação da cor da flor (TOURJEE et al., 1995), caracterização e divergência genética com base em marcadores morfológicos (CARDOSO et al., 2007), estudos visando estimar a herdabilidade de caracteres relacionados ao capítulo, escapo e características florais (OTTAVIANO et al., 1974; SCHIVA, 1976; DRENNAN et al., 1986, KLOSS et al., 2004), determinação dos mecanismos moleculares que controlam a identidade floral e pigmentação antocianínica durante o desenvolvimento floral (YU et al., 1999) e modificações no desenvolvimento floral e na estrutura do

capítulo através da transformação de vários cDNAs da família dos genes MADS-box (KOTILAINEN et al., 1999; YU et al., 1999).

Além disso trabalhos relacionadas ao genoma, formação de bibliotecas de etiquetas de sequência expressa para gérbera (LAITINEN et al., 2005), métodos de regeneração e transformação genética mediados por *Agrobacterium*, visando alterar a coloração e melhor entender o mecanismo e identificar os genes que governam a biossíntese de pigmentos florais (NAGARAJU et al., 1998). Todas estas pesquisas tem contribuído enormemente para o sucesso dos programas de melhoramento genético de gérbera.

As técnicas de polinização e hibridação em gérbera são pouco difundidas devido à importância comercial dos híbridos gerados por estes procedimentos. Estudos com hibridação artificial em gérbera têm sido relatados recentemente (HANSEN, 1999; SOUZA et al, 2005; MARIA & CHIS, 2006; CARDOSO, 2007).

Souza et al. (2005), analisando a estrutura floral de gérbera, observaram que ocorre a exposição sucessiva das flores femininas situadas na parte externa da inflorescência, com estigma receptivo, e, por último, as flores masculinas, com a liberação do pólen, enquanto alguns estigmas ainda estão receptivos. Os autores afirmam que isso demonstra a possibilidade de autogamia em gérbera, havendo a necessidade de realizar a emasculação para se ter certeza da origem das sementes dos híbridos produzidos.

No entanto, Cardoso et al. (2009), estudando o sistema reprodutivo em gérbera, hibridação artificial e realizando a caracterização citogenética de cultivares e acessos não comerciais de gérbera constataram que não ocorre geitonogamia no capítulo, não

sendo necessária a realização de emasculação. No entanto, a ocorrência de geitonogamia na planta não foi descartada, devendo ser investigada. Os autores também verificaram ser possível a hibridação entre as cultivares, e entre acessos não comerciais e cultivares devido à compatibilidade genômica entre ambos os acessos ($2n=50$). A alta fertilidade do pólen e o sucesso na obtenção de sementes entre cultivares e acessos não comerciais, sugere a possibilidade de produção de híbridos com novas combinações e transferência de caracteres desejáveis dos acessos não comerciais para as comerciais.

Quanto ao tempo necessário para a produção de sementes, Souza et al. (2005) determinaram que o mesmo seria de 18 dias. A germinação da semente ocorre entre 7 a 14 dias após a semeadura. As plântulas devem ser transplantadas quando possuírem de quatro a cinco folhas. A etapa de crescimento vegetativo se prolonga por dois a três meses. A floração começa por volta do quinto mês após o plantio. No primeiro ano a planta produz de três a seis flores, aumentando esta produtividade para seis a dezoito flores no segundo e terceiro ano (BELLÉ, 1998; INFOAGRO, 2011).

Segundo Maria & Chis (2006), a produção de sementes desta espécie é insatisfatória devido à forte heterozigose. Cardoso et al. (2009), realizando cruzamentos entre cultivares de gérbera, observaram uma baixa formação de sementes de gérbera, 4,46%, o que poderia estar relacionado a incompatibilidade entre os híbridos, pois em cruzamentos de acessos não comerciais com cultivares, a frequência de formação de sementes foi de 50%. Outro fato observado pelos autores foi que as flores do disco de alguns acessos de gérbera eram hermafroditas férteis sendo teoricamente aptas para a produção

de sementes, o que necessita ser investigado para otimizar a produção de sementes.

Segundo Huang et al. (1995), a depressão endogâmica em gérbera afeta a produtividade, havendo um decréscimo de 25% de produtividade de flores por geração de autofecundação.

A autoincompatibilidade é um mecanismo bastante comum em angiospermas, impondo barreiras fisiológicas entre a polinização e fertilização (ASCHER, 1976), o que induz à alogamia. Na família Asteraceae, o girassol (*Helianthus* sp.) mostra variação quanto a esse aspecto, em que a autoincompatibilidade varia de completa a ausente. Em gérbera há relatos da ocorrência de problemas com endogamia, entre eles, a redução do rendimento (HUANG et al., 1995). A autofecundação tem ocasionado a degeneração da progênie, malformações e esterilidade (MIYOSHI & ASAKURA, 1996), havendo a necessidade de melhor investigar a ocorrência de problemas de autoincompatibilidade. Uma das formas de se obter estas informações é através de hibridação, avaliando-se a progênie de cruzamentos.

2.4 Novas tecnologias no melhoramento

A biotecnologia vem colaborando para grandes avanços no melhoramento genético. O advento da tecnologia do DNA recombinante, trouxe a possibilidade de se isolar e clonar genes de bactérias, vírus, plantas e animais, introduzi-los e expressá-los em plantas. Desta forma, a barreira do cruzamento entre espécies e até entre diferentes reinos foi rompida.

O projeto Genoma tem um papel essencial no conhecimento da estrutura do genoma dos organismos. Entretanto, a simples informação de todas as sequências de bases que compõe um genoma não garante a revelação da função e dos mecanismos de controle da expressão de todos os genes presentes no organismo (MEYERS et al., 2004). Com a imensa quantidade de dados gerados em inúmeros laboratórios de todo o mundo, estas informações são armazenadas e organizadas em bancos de dados, o NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA), é considerado o banco de dados central sobre informações genômicas. Vários outros bancos de dados estão distribuídos por países na Europa e Japão, mas todos trocam dados em um intervalo de 24 horas com o NCBI. O GenBank é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas sequências disponíveis publicamente de DNA, RNA e proteínas.

Devido a grande quantidade de estudos com RNA comparados com os estudos de proteínas, a primeira aplicação da genômica em muitos organismos é catalogar e, então, medir a atividade transcricional (MEYERS et al., 2004). Desse modo, nos últimos anos várias técnicas vem sendo desenvolvidas para permitir a análise da expressão gênica das espécies.

O progresso da biotecnologia vegetal e o desenvolvimento de metodologias de transformação genética associadas às técnicas de isolamento e caracterização de genes, têm contribuído para o progresso no melhoramento vegetal.

2.4.1 Técnicas moleculares utilizadas no estudo da expressão gênica

A era genômica colocou à disposição genomas dos mais variados organismos para gerar variabilidade e novas combinações a partir do isolamento e a transferência de genes de interesse. No entanto, a utilização de toda esta informação genômica necessita de estudos que identifiquem a função das sequências obtidas, como os de expressão gênica, entre eles os de perda-de-função realizados através do silenciamento de genes de interesse (MALONE et al., 2006).

A expressão gênica é a principal função relacionada com os RNAm e o processo da transcrição. Ela define o perfil das proteínas nas células e sua diferenciação. Mediante o estudo da expressão gênica tem sido possível isolar e caracterizar genes, o que permite o melhor entendimento de processos biológicos em nível molecular.

2.4.2 Etiquetas de Sequência Expressas (EST)

O sequenciamento de etiquetas de sequências expressas (ESTs) é um método comum para análise do perfil de expressão gênica, embora a proposta primária do sequenciamento de EST tenha sido gerar dados de sequências gênicas (MEYERS et al., 2004). Dados de ESTs são gerados em larga escala, com sequências parciais de clones de cDNA (aproximadamente 500 pb), geralmente a partir de um grande número de bibliotecas, representando diversos tecidos e tratamentos.

O transcriptoma pode ser definido como o conjunto de sequências expressas de um genoma na forma de mRNA, que pode ser sequenciado a partir de bibliotecas de cDNAs preparadas com o auxílio da enzima transcriptase reversa que converte RNA em DNA. Diferentemente do sequenciamento do genoma, a análise do transcriptoma exige a investigação de várias células e tecidos diferentes, bem como de distintos estágios do desenvolvimento, para que se detecte o maior número possível de genes. Com essas sequências em mãos, é facilitada a procura de genes no DNA genômico.

Com a obtenção da sequência gênica alvo, o cDNA pode ser utilizado para técnicas de silenciamento gênicos, as quais visam inibir a expressão de determinado gene, quando sua expressão não for de interesse, mediante o controle da expressão gênica pós-transcricional que utilizam técnicas como RNA de interferência (RNAi), RNA anti-senso e indução viral para o silenciamento gênico.

2.4.3 Silenciamento gênico e sua aplicação

O termo silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos por meio dos quais a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente.

O silenciamento constitui um mecanismo celular que tem como alvo sequências específicas de ácidos nucleicos, resultando na regulação negativa da expressão gênica. O fenômeno pode ocorrer tanto no nível transcricional quanto no pós-transcricional (VAUCHERET et al., 2001).

De acordo com Zerbini et al. (2005), o silenciamento de RNA, é processo que leva a degradação de mRNA homólogos, RNA dupla fita, e que também é denominado RNA de interferência (RNAi) em animais e silenciamento gênico pós-transcricional em plantas.

2.4.3.1 Silenciamento gênico pós-transcricional

O silenciamento gênico pós-transcricional é também denominado de silenciamento de RNA, por resultar na degradação de RNAm de maneira altamente específica em termos de sequência, reduzindo o acúmulo de mRNA no citoplasma sem afetar a taxa de transcrição. O silenciamento de RNA pode ser induzido por vírus, transgene ou genes endógenos, enxertia entre plantas silenciadas e não silenciadas, e, uma vez ativado, o mRNA correspondente (exógeno ou endógeno) é degradado de forma sequência-específica (VIDAL, 2003; BAULCOMBE, 2004).

O fenômeno, atualmente denominado silenciamento de RNA, foi observado pela primeira vez em plantas transgênicas por dois grupos independentes de pesquisadores Napoli et al. (1990) e Van Der Krol et al. (1990), que objetivavam criar petúnias transgênicas com coloração mais intensa. A estratégia escolhida consistia em superexpressar o gene que codifica a chalcone sintase (CHS), enzima chave na biossíntese de antocianinas. No entanto, o mecanismo de silenciamento foi desencadeado, e o que foi observado foram linhagens transgênica com uma variegação floral, e até mesmo linhagens totalmente brancas, ou seja, sem pigmento. A análise molecular das linhagens transgênicas comprovou que a introdução da

cópia extra havia efetivamente bloqueado a biossíntese de antocianinas, inibindo, simultaneamente, a expressão do gene endógeno pré-existente e da cópia introduzida.

Segundo Palauqui et al. *apud* Vidal (2003), o silenciamento gênico pós-transcricional parece ser desencadeado localmente por moléculas de RNA fita dupla, mas é capaz de se espalhar desses pontos até outros tecidos. Parece que tal dispersão não se dá por uma via metabólica, mas sim, através de um sinal difusível específico de determinada sequência gênica, que é capaz de transpor as barreiras celulares via plasmodesmos ou pelo sistema vascular.

O silenciamento gênico pós-transcricional pode ser dividido em três etapas básicas: indução, dispersão e manutenção (VIDAL, 2003). Há uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na regulação da expressão gênica no nível pós-transcricional, por meio da degradação sequência-específica de mRNAs alvos ou do bloqueio de sua tradução (ZERBINI et al., 2005).

Tal mecanismo ativado pela produção de RNA de fita dupla é clivado por uma Rnase III denominada *Dicer* em *Drosophila* e *DLC* (*Dicer-like*) em *Arabidopsis*, gerando moléculas de RNA com 21-25 nucleotídeos, denominadas siRNAs (*short interfering RNAs*). Estas moléculas são incorporadas a um complexo de indução de silenciamento de RNA denominado RISC, que direciona a degradação dos mRNA com sequência complementar ao siRNA (ZERBINI et al., 2005).

Estudos genéticos demonstraram a existência de três vias de silenciamento de RNA. A primeira via é a do silenciamento citoplasmático via siRNAs, que está envolvida na degradação de RNA

viral, ou mesmo bloqueando, o ciclo de infecção. O RNA dupla fita pode originar-se da transcrição de um gene endógeno, de um transgene, ou de um intermediário da replicação de vírus com genoma de RNA. Em vírus com genoma de DNA, o RNA dupla fita pode ser formado por meio do anelamento de transcritos sobrepostos complementares. A segunda via é a de silenciamento de mRNAs endógenos via micro RNAs, os quais regulam a expressão gênica negativamente por meio do pareamento de bases específicos a mRNAs alvo, resultando na clivagem do mRNA ou na repressão de sua tradução. A terceira via é nuclear, e está associada à metilação de DNA e à formação de heterocromatina. Uma importante função para esta via é provavelmente proteger o indivíduo de desorganizações genômicas causadas por transposons (BAULCOMBE, 2004).

2.4.3.2 RNA anti-senso

Nesta técnica o gene que se deseja silenciar é clonado e modificado por engenharia genética de forma que apresente a sequência oposta do gene alvo e que possa ser transcrito, produzindo assim moléculas de RNA anti-senso, que então se parearão com a molécula de RNA senso (RNA produzido pela transcrição do gene normal) formando uma dupla hélice RNA/RNA que impede a síntese proteica.

O RNA anti-senso é o RNA que é exatamente complementar em sequência e oposto em polaridade ao mRNA de um gene, o que permite que o RNA anti-senso hibridize ao mRNA, criando uma molécula de fita dupla o que inibe a tradução desta sequência pelos

ribossomos de modo que a expressão do gene normal é reduzida (ALBERTS et al., 1997; BOURQUE, 1995; KREUZER & MASSEY, 2002).

O RNA anti-senso pode ser sintetizado quimicamente ou enzimaticamente, e então injetado em células, bloqueando (embora temporariamente) a produção da proteína correspondente.

2.4.3.3 RNA interferência (RNAi)

A técnica do RNAi é um método potente que utilizando poucas moléculas de RNA de fita dupla faz com que o silenciamento da sequência alvo seja expresso.

A descoberta do RNAi surgiu da utilização da técnica anti-senso em *Caenorhabditis elegans* para provar a função gênica do gene par-1, foi constatado que o fenótipo obtido foi o mesmo tanto no controle, utilizando RNA na orientação senso quanto na orientação anti-senso, fato que já havia sido observado em plantas quando se aumentava a dose do gene (GUO & KEMPHUES, 1995). Posteriormente, Fire et al. (1998), também observaram que tanto o RNA na orientação senso quanto o anti-senso inibiam a função gênica, e então, decidiram injetar os dois juntos, a fita dupla, e observaram que houve um silenciamento dez vezes maior do que quando utilizada a fita simples. Este efeito induzido pelas fitas duplas foi então nomeado de RNA de interferência.

O mecanismo do RNA de interferência é induzido pela presença de RNA dupla fita introduzidos exogenamente, chamados shRNA (small hairpin RNA), conhecidos como micro RNA. Estes

RNA dupla fita são processados por uma ribonuclease celular, denominada Dicer, da Família RNase III, em fragmentos de 21 a 28 nucleotídeos, os quais se associam a outras proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC. Após, uma helicase presente neste complexo abre a dupla-fita dos micro RNAs, de forma que a fita anti-senso localiza sítios específicos complementares do mRNA alvo onde se liga causando sua degradação.

Os RNAs de fita dupla que desencadeiam o silenciamento gênico pós-transcricional são originados naturalmente no núcleo ou no citoplasma celular pela transcrição de repetições invertidas de DNA, sínteses simultâneas de RNA senso e anti-senso ou em infecções virais. Os RNAs também podem ser adquiridos artificialmente por vetores de expressão introduzidos na célula (NOGUEIRA & PACCA, 2008).

Apesar de técnica de RNA de interferência, ter se mostrado eficiente no silenciamento de genes pós-transcricionalmente, a necessidade de produção de cópias de sequências invertidas e com transformação estável, faz com que a técnica de silenciamento gênico por indução viral seja mais atrativa por não necessitar da produção de cópias no sentido inverso.

2.4.3.4 Silenciamento gênico por indução viral (*Virus induced gene silencing* - VIGS)

A indução de silenciamento gênico pós-transcricional por vírus foi confirmada com a observação de que genes endógenos ou

transgenes eram silenciados após a infecção com vírus recombinantes contendo parte da sequência do gene ou transgene. O mecanismo de indução de silenciamento por meio da replicação de vírus foi denominado *virus-induced gene silencing* (VIGS) (RATCLIFF et al., 2001; RUIZ et al., 1998). VIGS é um mecanismo de defesa da planta que limita a severidade da infecção viral (BAULCOMBE, 1999).

O uso de VIGS para o estudo da expressão e função de genes constitui atualmente, uma das aplicações práticas mais disseminadas do silenciamento de RNA (LU et al., 2003). VIGS mostra-se um método rápido pois a avaliação pode ser realizada no fenótipo maduro evitando a necessidade dos demorados processos de transformação e regeneração, além disso, permite analisar genes que possuem um fenótipo letal uma vez que esse sistema é aplicado em plantas adultas não havendo morte do embrião como ocorre em sistemas de mutagênese insercional (BAULCOMBE, 2004; JIANG et al., 2005).

Entre as vantagens da técnica VIGS sobre os outros métodos de silenciamento gênico envolvendo plantas transgênicas expressando construções com sequências invertidas, tem-se o fato, de que a construção pode ser facilmente gerada pela clonagem direta dentro do vetor viral sem envolver sequências invertidas (JIANG et al., 2005).

Para o silenciamento utilizando a metodologia VIGS, um fragmento do gene de interesse é inserido em um vetor viral, em substituição a genes dispensáveis para a infecção sistêmica ou como um gene extra. Os vetores para VIGS têm sido frequentemente empregados em estudos de genética reversa, sendo promissores para plantas difíceis de serem transformadas, caso estas sejam suscetíveis à infecção viral (ROBERTSON, 2004). Quando o vírus infecta

sistemicamente, o transcrito do gene endógeno, que é homólogo ao inserto no vetor viral, é degradado pelo mecanismo do silenciamento gênico pós-transcricional (BAULCOMBE, 2004).

Diversos vírus de planta têm sido modificados para a utilização como vetores virais para a indução de VIGS. O primeiro vetor viral criado foi baseado no *Tobacco Mosaic Virus* (TMV), o qual foi modificado para carregar a sequência do gene *Phytoene desaturase* (PDS). Transcritos do vírus recombinante carregando a sequência do gene PDS foram produzidos *in vitro* e inoculados em *Nicotiana benthamiana*, e como resultado, foi observado o silenciamento do gene PDS (KUMAGAI et al., 1995).

Dentre os vírus de RNA mais utilizados como vetores virais, tem-se o *Potato virus X* (PVX) (RUIZ et al., 1998) e os tobravírus, *Tobacco rattle virus* (TRV) (RATCLIFF et al., 2001, JIANG et al., 2005) e *Pea early browning virus* (PEBV) (CONSTANTIN et al., 2004), e entre os de DNA, os begomovírus, o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (KJEMTRUP et al., 1998), o *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV) (TURNAGE et al., 2002) e o *African cassava mosaic virus* (ACMV) (FOFANA et al., 2004). Dentre eles, o TMV, PVX e TRV são os mais utilizados.

Apesar de apresentar algumas limitações, o método de VIGS geralmente é escolhido pela rapidez de geração de fenótipos, por ter custo relativamente baixo e não requerer sistemas de transformação e regeneração *in vitro* (BURCH-SMITH et al., 2004; UNVER & BUDAK, 2009).

Entre os vetores para VIGS, o baseado no *Tobacco rattle virus* é o mais proeminente, por apresentar uma ampla gama de hospedeiro,

incluindo gérbera, e por conseguir disseminar-se vigorosamente por toda a planta, incluindo o tecido meristemático. Outra fator citado é que os sintomas induzidos pela doença são mais suaves em comparação com os de outros vírus (LIU et al., 2002; RATCLIFF *et al.*, 2001).

O vetor TRV tem sido utilizado para silenciar genes endógenos de várias solanáceas, incluindo os gêneros *Nicotiana* (RATCLIFF et al., 2001), *Capsicum* (CHUNG et al., 2004; RYU et al., 2004), *Solanum* (BRIGNETI et al., 2004), *Lycopersicon* (LIU et al., 2002; VALENTINE et al., 2004) e *Petunia* (CHEN et al., 2004; RYU et al., 2004), bem como em *Arabidopsis* (VALENTINE et al., 2004).

A metodologia VIGS tem sido utilizada por alguns pesquisadores para análise funcionais de genes associados a senescência floral. Jiang et al (2005) utilizaram esta técnica para avaliar efeitos do silenciamento de genes associados a senescência. O organismo de estudo selecionado foram petúnias de flores roxa, e como vetor viral o TRV (pTRV1 e pTRV2). O TRV foi alterado, inserindo-se neste, clones de cDNA dos genes CHS (*Chalcone sintase*), PDS (*Phytoene desaturase*) e ACO (*1-aminociclopropane-1-carboxylate oxidase*) e também, a combinação do CHS (utilizado como marcador visual) associado ao PDS (gene que causa um fotoclareamento em tecidos fotossintetizantes) e CHS associado ao gene ACO (CHEN et al., 2004). Após as flores serem tratadas com ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e polinizadas, os autores observaram uma menor produção de etileno e um atraso na senescência nas partes silenciadas da planta. Isso mostrou que a técnica VIGS, com construção seguida do gene CHS como repórter

seguida do gene alvo, é eficiente para investigação da função de genes isolados de tecidos em senescência floral.

2.5 Senescência floral

O processo de senescência de uma planta é uma fase irreversível de degradação estrutural e funcional das células, caracterizada por processos catabólicos que predominam sobre os processos anabólicos (COLL et al., 1995). De acordo com Bialeski & Reid (1992), um órgão em senescência se caracteriza por apresentar uma redução de taxa fotossintética, conteúdo de amido, ácidos nucleicos, polissacarídeos, massa e pigmentação. Simultaneamente a estes processos, observa-se um aumento do processo respiratório, dos níveis de enzimas catabólicas e de diversos radicais livres que favorecem a degradação da parede celular (NONNECKE & GLADON, 1995).

Para Reid & Wu (1992), a senescência floral é definida por relações hídricas adversas, abscisão e murchamento das pétalas e flores, e pode ocorrer no início da fase de reprodução e ou na fase de envelhecimento e morte do tecido floral. A senescência das pétalas é classificada em três tipos: 1) pétalas que mostram um rápido murchamento seguido de aumento da produção endógena de etileno, por exemplo, petúnia (WHITEHEAD et al., 1984) e *Hibiscus* sp. (WOODSON et al., 1985); 2) pétalas que murcham lentamente e flores que não apresentam aumento significativo da produção de etileno, por exemplo, em crisântemo, narciso (NICHOLS, 1966) e *Zinnia elegans* (STIMART et al., 1983); 3) pétalas que apresentam

sintomas de abscisão, sem murchamento, geralmente estimulada por etileno exógeno, por exemplo, *Digitalis purpurea* (STEAD & MOORE, 1983), *Antirrhium* spp. (FARNHAM et al., 1981) e *Delphinium* spp. (SHILLO et al., 1980).

De acordo com Xu et al. (2007), atualmente, são reconhecidos três padrões de senescência floral, os quais baseiam-se em como a flor responde ao etileno, fito-hormônio com estrutura molecular simples, gasoso, que promove uma série de respostas fisiológicas na planta e está relacionado com a senescência natural das flores (WOLTERING et al., 1994), assim, as flores são classificadas em: flores dependentes do etileno, flores independentes do etileno e outras, que apresentam um padrão intermediário entre estes dois tipos.

Em flores dependentes do etileno, como o cravo, e flores das famílias Geraniaceae, Lamiaceae, Ranunculaceae, Rosaceae e Scrophulariaceae, um aumento na síntese de etileno desencadeia o processo de senescência nestas flores, a aplicação exógena de etileno acelera a senescência e o uso de inibidores de etileno prolonga substancialmente sua longevidade. Já para as flores cuja senescência é independentes do etileno, pouco etileno é produzido antes ou durante o processo de senescência, não havendo efeito de aceleração do processo de senescência ou retardo da senescência quando tratadas respectivamente com etileno exógeno e inibidores de etileno. E o terceiro tipo, as com padrão intermediário, nas quais sem a polinização, respondem como uma flor independente do etileno, no entanto quando polinizadas, passam a responder como uma flor dependente de etileno (HUNTER et al., 2002; XU et al., 2007)

Para evitar perdas na produção devido à senescência, são adotadas medidas de controle das perdas pós-colheita, como a colheita no ponto ideal, o uso adequado da temperatura e umidade de armazenamento, aplicações de substâncias químicas utilizadas na conservação de flores de corte, algumas relacionadas a redução da síntese e ou ação do etileno (SEREK et al., 1994), ou outros reguladores, visando retardar a senescência das flores de modo que estas possam apresentar uma maior vida de vaso. Uma outra solução, seria o uso de tecnologias que auxiliassem no desenvolvimento de cultivares com uma maior longevidade pós-colheita. Assim, pesquisadores tem buscado associar seus conhecimentos de genes associados a senescência floral e engenharia genética para desenvolverem plantas transgênicas que apresentem uma maior longevidade pós-colheita, o que contribuiria para a redução de perdas ao longo da cadeia produtiva de plantas ornamentais.

CAPÍTULO 1

HIBRIDAÇÃO ARTIFICIAL EM GÉRBERA: FORMAÇÃO DE SEMENTES E SEGREGAÇÃO DA PROGÊNIE

RESUMO – Avaliou-se a ocorrência de autoincompatibilidade e incompatibilidade em gérbera, e o modo de herança e segregação de caracteres vegetativos e morfológicos de capítulos importantes comercialmente. Para determinar a ocorrência de autoincompatibilidade, capítulos da cv. Green White Center (GWC) e de dois acessos não comerciais, A7 e A8, foram polinizados com pólen proveniente da mesma planta, avaliando-se a formação de sementes. Visando verificar a ocorrência de incompatibilidade e o efeito materno ou paterno na formação de sementes, foram realizados dois blocos de cruzamentos dirigidos, um testando diferentes genitores masculinos (A7, A8 e as cvs. Ave Maria, Chili Pepper, Dream, Essandre, Feria, GWC, Isimar e Opium), e outro avaliando dois diferentes genitores femininos (cv. GWC e o A8). A capacidade geral e específica de combinação para formação de sementes foi avaliada mediante um dialelo entre os genótipos GWC, A7 e A8. As sementes foram germinadas e a progênie avaliada aos nove meses para os caracteres vegetativos e morfológicos do capítulo. A herdabilidade no sentido amplo foi estimada através do método de componentes de variância. Confirmou-se que pode ocorrer geitonogamia na planta, entre capítulos, devido a ausência de autoincompatibilidade e que a inibição da autofecundação dentro do capítulo é devido à protoginia. A influência da capacidade geral e específica de combinação para a

formação de sementes não foi significativa estatisticamente devido ao alto CV do experimento. As estimativas de herdabilidade variaram de moderada a alta. A variabilidade encontrada na progênie tanto para os caracteres vegetativos quanto os para os avaliados no capítulo, reitera que as progênies obtidas nas hibridações realizadas não foram originadas de autofecundação.

Palavras-chave: capacidade geral e específica de combinação, incompatibilidade, geitonogamia, *Gerbera hybrida* Hort., melhoramento vegetal.

**ARTIFICIAL HYBRIDIZATION IN GÉRBERA: SEED
FORMATION AND SEGREGATION OF THE OBTAINED
PROGENY**

ABSTRACT – In this study was evaluated the occurrence of self-incompatibility and incompatibility in gerbera, and analyze segregation and inheritance of vegetative and morphological capitulum character that are commercially important. To evaluate the self-incompatibility occurrence, capitulum of cv. Green White Center, A8 e A7, were pollinated with pollen of the same plant evaluating the seed production. In order to verify the incompatibility and maternal and paternal effect on seed production, two different set crossing carried out, one testing the paternal parents (A7, A8 and the cvs. Ave Maria, Chili Pepper, Dream, Essandre, Feria, GWC, Isimar and Opium), and other the maternal effects using GWC and a non commercial access A8 as mother. The general and specific ability for seed production were checked using a diallel between the genotypes GWC, A& e A8. The seeds were germinated and the progeny evaluated at nine months for vegetative and morphological capitulum characters. Herdability was estimate in the broad sense based on the environmental variance. It was confirmed the occurrence of geitonogamy, self-incompatibility absence and that the inhibition of self pollination within the chapter is due to protogyny. The general and specific combining ability to seed production did not have statistic significance due the high coefficient of variation of the experiment. The heritability estimates were moderate to high. The variability observed in the progeny obtained to vegetative plant character and in

the capitulum character, confirm that the progenies from performed crosses is not originating from self-cross.

Key words: general and specific combining ability, incompatibility, geitonogamy, *Gerbera hybrida* Hort., plant breeding

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, não há informações sobre a existência de programas de melhoramento em gérbera, o que justifica qualquer esforço a fim de reduzir a dependência externa, oferecendo ao produtor uma alternativa nacional e plantas mais adaptadas às condições ambientais. Além disso, esforços desta natureza podem oferecer aos empresários do ramo da multiplicação de gérbera a possibilidade de atuar na propagação desta espécie.

A trajetória do melhoramento de gérbera é longa e as modernas cultivares de gérbera híbrida, são, na sua maioria, originadas do cruzamento entre a *Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook e *Gerbera viridifolia* Schultz Bip. O melhoramento convencional tem gerado bons resultados na produção de genótipos elite ricos em cores e padrões de coloração dentro do capítulo, combinados com boas características produtivas e econômicas desejáveis comercialmente (ELOMAA & TEERI, 2001; SPARNAAIJ, 1976).

Apesar do melhoramento desta espécie vir sendo realizado por vários anos, informações como a ocorrência de autofecundação e geitonogamia, bem como o efeito destas na progênie ainda não estão bem esclarecidos. De acordo com Cardoso (2007), não ocorre geitonogamia dentro de um mesmo capítulo de gérbera, no entanto, a geitonogamia na planta não foi descartada. A geitonogamia consiste na polinização, fecundação cruzada, entre flores femininas e masculinas da mesma planta.

Segundo Maria & Chis (2006), ainda hoje não há produção de sementes satisfatória desta espécie devido à forte heterozigose. Cardoso et al. (2009), realizando cruzamentos entre cultivares comerciais de gérbera, observaram uma baixa formação de sementes, em torno de 4%, o que segundo os autores, pode estar relacionado a problemas de incompatibilidade entre os híbridos devido a similaridade entre eles, pois nos cruzamentos do acesso não comercial e cultivares a frequência de formação de sementes foi de 50%.

Vários autores vem realizando hibridações em gérbera para estudos de herança de tipos de capítulo (KLOSS et al., 2004), florescimento (YU et al., 1991), diâmetro e comprimento do escapo, número de inflorescências, comprimento da lígula (SCHIVA, 1976), coloração das flores de gérbera (TOURJEE et al., 1995), coloração do disco (KLOSS et al., 2005b). Para Harding¹, a obtenção de sementes em hibridações em gérbera é baixa e difícil, sendo necessário repeti-la muitas vezes para a obtenção de um número mínimo de sementes para realizar estudos genéticos (informação verbal).

Os relatos de dificuldade de obtenção em número satisfatório de sementes nos cruzamento entre gérberas, indica haver fatores que parecem estar influenciando a produção de sementes. Tais fatores, sejam eles de ordem genética, como a incompatibilidade, ou fatores ambientais, necessitam ser investigados a fim de se superar esta barreira que dificulta a obtenção em número satisfatório de sementes

¹ HARDING, J. Department of Horticulture- Universidade da Califórnia – Davis/EUA

as quais são necessárias tanto para os estudos de herança genética quanto para o melhoramento.

Da mesma forma, a herança de caracteres de interesse comercial precisa ser melhor estudada, principalmente em cruzamentos com acessos coletados encontrados localmente, para que estes possam ser utilizados em programas de melhoramento e para que a seleção das melhores progênes possa ser realizada de forma mais precisa. Ainda, o conhecimento e obtenção destas informações são necessários para subsidiar programas de melhoramento visto que a hibridação e a seleção, são as etapas fundamentais de um programa de melhoramento.

No melhoramento, uma das dificuldades encontrada frequentemente pelos melhoristas está relacionada ao conhecimento e identificação dos genitores a serem utilizados em hibridações artificiais. Tal decisão, quando tomada com base em caracteres desejáveis, é insuficiente para assegurar a obtenção de progênes com alto potencial genético, sendo necessário que os genótipos utilizados nos cruzamentos tenham capacidade combinatória em nível expressivo para produzirem, em alta frequência, recombinações favoráveis (FERREIRA FILHO, 1982). Entre as técnicas para determinação dos efeitos de capacidade geral e específica tem-se utilizados amplamente os cruzamentos dialélicos para seleção de genitores.

Os métodos empregados para análise e interpretação de cruzamentos dialélicos apresentam peculiaridades e exploram de maneira diferenciada os dados, e a escolha entre as diferentes técnicas vai depender do objetivos do pesquisador. Dentre os principais métodos tem-se o de GARDNER & EBERHART (1966), que dá uma

maior ênfase a heterose, e o de GRIFFING (1956), que permite obter informações sobre a capacidade geral e específica de combinação dos genitores em cruzamentos artificiais. Neste último, as somas dos quadrados de tratamentos são desdobradas em efeitos de capacidade geral (CGC), específica de combinação (CEC) e, dependendo do método, em efeitos recíprocos. A importância relativa das variâncias da CGC e de CEC relacionadas com os efeitos aditivos e não aditivos, respectivamente, tem sido apontada por diversos pesquisadores. É na existência de tais variabilidades que residem a viabilidade e sucesso do melhoramento proposto (CRUZ et al., 1987).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de fornecer subsídios para viabilizar a obtenção de materiais genéticos de gérberas, tendo como objetivos específicos: (1) verificar a ocorrência de autoincompatibilidade em gérbera; (2) investigar fatores envolvidos na produção de sementes de gérbera; (3) acessar a capacidade combinatória de cruzamentos para a produção de sementes; (4) avaliar o modo de herança e a segregação dos caracteres vegetativos e morfológicos de capítulos de gérbera importantes comercialmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, a 28°15' S, 52°24' W e a 687 metros de altitude, entre outubro de 2009 e dezembro de 2011. O clima da região é subtropical úmido (Cfa), segundo Köppen (MORENO, 1961).

Os experimentos foram conduzido em ambiente semi-protegido (telado), constituído por uma cobertura impermeável (filme

de polietileno de baixa densidade leitoso, de 0,15mm de espessura), apresentando nas laterais uma faixa fixa de clarite com 1,40 m de largura, e na estufa climatizada do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo UPF. As avaliações foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF.

Experimento 1 – Hibridação em gérbera

A ocorrência de autoincompatibilidade e fecundação cruzada foi avaliada pelo número e percentagem de sementes formadas em capítulos de gérbera protegidos sem polinização artificial ou manualmente polinizados. Para isso foram conduzidos quatro blocos de cruzamento.

Dez genótipos de *Gerbera* spp. foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Destes genótipos, oito denominados acessos comerciais de gérbera (sendo sete com aptidão para corte e um para vaso) e dois denominados acessos não comerciais, os quais já foram estudados por Cardoso (2007) e Cardoso et al. (2009). Os acessos comerciais com aptidão para corte utilizados foram as cultivares Ave Maria, Chili Pepper, Dream, Essandre, Feria, Isimar e Opium. Estas não foram cultivadas devido a dificuldade de se adquirir mudas destas cultivares, sendo obtidos capítulos destas cultivares em floriculturas, dos quais se fez a coleta de pólen. O pólen obtido foi armazenamento no congelador a -4°C, para utilização nos cruzamentos. Assim, estes acessos apenas participaram dos cruzamentos como genitores masculinos. A cultivar comercial com aptidão para vaso, Green White

Center, e os acessos não comerciais (A7 e A8) foram utilizados tanto como genitores femininos quanto masculino. Junto ao Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF), estão tombadas exsicatas dos acessos não comerciais: A7 (RSPF-11.315) e A8 (RSPF-11.316), os quais acredita-se pertencerem a espécie *G.jamesonii* pela aparência das flores do raio.

Tabela 1 – Denominação, procedência e características gerais de acessos e cultivares de gérbera. Passo Fundo, RS, 2009-2011

Cultivar/acesso	Procedência (aptidão)	Classificação comercial quanto ao tipo de capítulo	Coloração	Coloração do miolo (pappus)
1) A7*	não comercial	Semidobrado	Amarelo	Claro
2) A8*	não comercial	Simples	Rosa	Claro
3) Green White Center	comercial (vaso)	Simples	Branco	Claro
4) Ave Maria	comercial (corte)	Semidobrado	Branco	Escuro
5) Chilli Pepper	comercial (corte)	Simples	Vermelho	Escuro
6) Dream	comercial (corte)	Semidobrado	Rosa	Escuro
7) Essandre	comercial (corte)	Dobrado	Amarelo	Escuro
8) Feria	comercial (corte)	Semidobrado	Laranja	Escuro
9) Isimar	comercial (corte)	Semidobrado	Rosa	Claro
10) Opium	comercial (corte)	Semidobrado	Vermelho	Claro

* Nomenclatura de acordo com Cardoso et al. (2009).

GWC, A7 e A8 foram escolhidas como genitores femininos devido às suas características de coloração clara do capítulo e miolo (pappus), que são, de acordo com a literatura, geneticamente recessivas. Dessa forma, progênies derivadas desses cruzamentos com características idênticas a mãe eram esperadas ter origem de autofecundação, enquanto que as F1, originadas de fecundação cruzada, eram esperadas apresentar uma amplitude de variação de cores, de acordo com os cruzamentos realizados e características de flor do genitor masculino.

Os acessos GWC, A7 e A8 (genitores femininos) foram cultivados em vasos de polietileno com diâmetro de 30 cm e capacidade para oito litros de substrato, que constou de uma mistura de solo mineral e casca de arroz carbonizada em igual proporção, o qual foi analisado e corrigido para atender as necessidades da cultura. Esse substrato apresentou densidade de $0,607 \text{ g/cm}^3$, 76% de porosidade, pH 5,8 e CTC (capacidade de troca de cátions) $13,5 \text{ cmol}_c/\text{dm}^3$.

As plantas foram mantidas sem restrição hídrica, mediante irrigação manual, com auxílio de regador, sendo aplicados fertilizantes líquidos, semanalmente, alternando duas soluções, conforme Guiselini (2002) (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição química das soluções nutritivas utilizadas nas fertilizações de gérbera

Solução A		Solução B	
Nitrato de cálcio	$0,8 \text{ g.L}^{-1}$	Nitrato de potássio	$0,7 \text{ g.L}^{-1}$
Nitrato de amônia	$0,4 \text{ g.L}^{-1}$	Sulfato de magnésio	$0,6 \text{ g.L}^{-1}$
Tenso Ferro	$0,01 \text{ g.L}^{-1}$	MAP	$0,15 \text{ g.L}^{-1}$
Bórax	$0,001 \text{ g.L}^{-1}$	Tenso Cocktail	$0,01 \text{ g.L}^{-1}$

Fonte: Guiselini, 2002.

Durante o período experimental foram necessárias aplicações de fungicida (carbendazim a $0,15 \text{ mL.L}^{-1}$ dissolvido na solução de água com 15% de leite) para o controle de oídio (*Erysiphe* sp.), acaricida (abamectin a $0,25 \text{ mL.L}^{-1}$) para controle do ácaro rajado (*Tetranychus* sp.) e inseticida (thiamethoxam $1,14 \text{ g.L}^{-1}$) para o controle do pulgão e tripses (*Frankliniella* sp.).

Procedimento da hibridação

Os capítulos foram previamente protegidos com papel manteiga, quando estavam com estigmas fechados, para evitar polinizações indesejadas. A proteção ocorreu durante o estágio 7 e 8 (HELARIUTTA et al., 1993), período em que era possível observar que os ramos dos estigmas estavam fechados. Os pacotes de papel manteiga e pincéis utilizados foram esterilizados antes de cada bloco de polinização. Para a esterilização os materiais foram colocados dentro de um saco plástico preto juntamente com algodão embebidos em formol, onde permaneceram pelo período de cinco dias.

A polinização foi manual e realizada na ocasião em que os estigmas apresentavam-se receptivos, sinalizada pelos seus ramos estigmáticos abertos (Figura 1). O acompanhamento da abertura do estigma, sinal de que estava receptivo, foi diário.

O pólen, previamente avaliado para viabilidade com a metodologia descrita por Cardoso et al. (2009), foi levado ao estigma do progenitor feminino com auxílio de pincel (Figura 1A). A polinização foi realizada entre as 13 e 14 horas, momento em que há a maior liberação de pólen (SOUZA et al., 2005), e repetida em três dias consecutivos conforme recomendações de Kloss et al. (2004). Este procedimento visou maximizar a produção de sementes devido ao desenvolvimento centrípeto dos capítulos de gérbera.

A polinização foi realizada somente nas flores do raio. Após a polinização, os capítulos permaneceram protegidos com papel manteiga, sendo colhidos após trinta dias, para avaliação da formação e número de sementes. Estes procedimentos foram realizados para

todos os blocos de cruzamento, tanto para os com cruzamentos dirigidos quanto para os dialélicos.

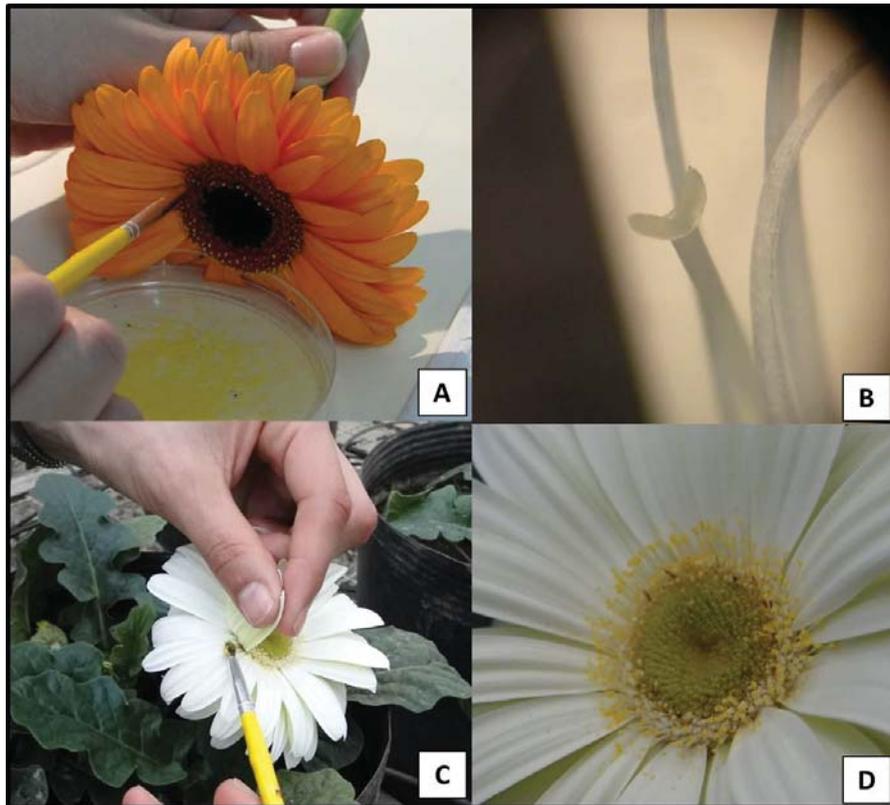


Figura 1 – Processo de hibridação em gérbera : (A) coleta do pólen, (B) detalhe do estigma receptivo, (C) polinização das flores do raio do capítulo de gérbera e (D) aspecto do capítulo após a polinização.

1.1 Investigação da ocorrência de autoincompatibilidade

Para investigação da ocorrência de autoincompatibilidade em gérbera e os possíveis fatores envolvidos neste processo, foram utilizados três genótipos, a cv. Green White Center e dois não

comerciais A7 e A8. Foram realizados dois tratamentos: 1) os capítulos de gérbera foram protegido com papel manteiga antes de o estigma estar receptivo e não foi realizada polinização nestes; 2) os capítulos de gérbera foram protegido com papel manteiga, e quando os estigmas estavam receptivos, estes foram polinizados utilizando pólen da mesma planta. O pólen coletado foi armazenado no congelador a -4°C até o momento da utilização. O tratamento 1 foi realizado para testar se a não ocorrência de formação de sementes no capítulo é devido a protoginia, ou seja quando as flores femininas tornam-se receptivas antes das flores hermafroditas ou masculinas, e o tratamento 2 para detectar se há ocorrência de autoincompatibilidade na formação de sementes. Os tratamentos foram realizados no ambiente semi-protegido da FAMV/UPF descrito anteriormente. O delineamento foi em blocos casualizados, com cinco repetições, sendo a unidade experimental o capítulo.

Os capítulos após terem sido submetidos aos diferentes tratamentos, permaneceram protegidos com papel manteiga, sendo debulhados após trinta dias para avaliação da formação de sementes. Foi avaliada a ocorrência e frequência de formação de sementes, os dados obtidos foram analisados pelo teste Chi-quadrado.

1.2 Incompatibilidade e efeito paterno e materno na produção de sementes

Visando avaliar a possibilidade de realizar cruzamentos em gérbera e investigar a ocorrência de incompatibilidade entre genótipos, foram realizados dois blocos de cruzamentos dirigidos:

Bloco 1: foi utilizado como genitor feminino a cv. Green White Center, e como genitores masculinos, dez acessos, o A7, A8 e as cultivares Ave Maria, Chili Pepper, Dream, Essandre, Feria, Green White Center, Isimar e Opium, totalizando assim 10 diferentes cruzamentos. O pólen foi coletado de cada um dos diferentes pais, e armazenado em tubos de eppendorf a -4°C até o momento da polinização. Antes de ser utilizado para o cruzamento o mesmo foi avaliado para viabilidade conforme metodologia utilizada por Cardoso et al. (2009). Foram realizadas cinco repetições para cada um dos diferentes cruzamentos, considerando o capítulo como unidade experimental, totalizando 50 capítulos. O delineamento foi em blocos casualizados, de forma que em um mesmo dia se conseguisse pelo menos realizar uma polinização para cada um dos diferentes cruzamentos (tratamentos).

Bloco 2: foram utilizados como genitores femininos a cv. Green White Center e o acesso não comercial A8, e como genitores paterno as cvs. Essandre, Feria e Isimar, totalizando assim seis diferentes cruzamentos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, cada bloco correspondeu a uma data de polinização. Os cruzamentos foram repetidos em quatro dias (blocos). A unidade experimental foi o capítulo, totalizando 24 capítulos polinizados. A metodologia utilizada para a polinização foi a mesma descrita anteriormente, no entanto, neste experimento o pólen não foi congelado, apenas armazenado a 4°C durante os três dias de repetição de polinização. A cada bloco de cruzamento foram adquiridos

capítulos, dos quais coletou-se o pólen, de forma a se utilizar o pólen o mais fresco possível, evitando a necessidade de congelamento.

A hibridação procedeu como descrito anteriormente, e foram realizadas no ambiente semi-protegido da FAMV/UPF.

Passados trinta dias da polinização, os capítulos foram colhidos e debulhados para avaliar a ocorrência e frequência de formação de sementes.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas por Tukey 5% de probabilidade de erro mediante utilização do Programa SAS .

As análises de variância foram realizadas considerando todos os cruzamentos, os cruzamentos dentro dos blocos, entre diferentes genitores masculinos e femininos. Além da comparação de médias por Tukey, as médias também foram comparadas utilizando-se a média mais/menos um desvio padrão para separar os cruzamentos superiores e inferiores na produção de sementes.

1.3 Dialelo e capacidade geral e específica de combinação

Neste experimento foram utilizados três acessos: a cultivar Green White Center, e os acessos A7 e A8. O delineamento genético utilizado para este bloco de cruzamentos foi o de dialelo balanceado completo, no qual estão inclusas as p^2 combinações (genitores, F_1 's e recíprocos) para verificar o possível efeito de herança materna. Foram realizados nove diferentes cruzamentos (Tabela 3). As hibridações foram realizadas conforme descrito anteriormente, no entanto, neste experimento o pólen não foi congelado, apenas armazenado a 4 °C

durante os três dias de repetição de polinização. O delineamento utilizado foi o completamente casualizado com três repetições, sendo o capítulo a unidade experimental. Após os trinta dias, os capítulos foram debulhados e contado o número de sementes formadas.

As sementes ficaram armazenadas na câmara de sementes em temperatura de 4 °C, até se obter o número mínimo de sementes necessário para os estudos de herdabilidade e de herança, que é de no mínimo cem sementes por cruzamentos.

Tabela 3 - Esquema dialélico envolvendo os genótipos GWC, A7 e A8, seus híbridos F1's e recíprocos

Genitores	GWC	A7	A8	Total (Y _{i.})
GWC	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁
A7	Y ₂₁	Y ₂₂	Y ₂₃	Y ₂
A8	Y ₃₁	Y ₃₂	Y ₃₃	Y ₃
Total (Y _{.j})	Y _{.1}	Y _{.2}	Y _{.3}	Y _{..}

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância univariada (considerando-se fixo os efeitos dos tratamentos) e ao teste F a 5% de probabilidade de erro. A metodologia utilizada para estimar os efeitos de capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC) foi a proposta por Griffing (1956), método 1, utilizando as p² combinações (genitores, combinações híbridas (F₁'s) e os recíprocos.

A análise genética foi realizada empregando o modelo genético estatístico:

$$Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + r_{ij} + \bar{\varepsilon}_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} : valor médio da combinação híbrida ($i \neq j$) ou do progenitor ($i=j$);

m : média geral;

g_i, g_j : efeito da capacidade geral de combinação do i -ésimo ou j -ésimo progenitor ($i, j=1, 2, \dots, p$);

s_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação para os cruzamentos entre os genitores de ordem i e j ;

r_{ij} : efeito recíproco que mede as diferenças proporcionadas pelo progenitor i , ou j , quando utilizado como macho ou fêmea no cruzamento ij ; e

$\bar{\epsilon}_{ij}$: erro experimental médio observado associado à observação de ordem ij .

Neste modelo são considerados $s_{ij} = s_{ji}$, $r_{ij} = -r_{ji}$ e $r_{ii} = 0$.

Experimento 2 – Germinação de sementes e segregação da progênie

2.1 Germinação de sementes e sobrevivência das plantas

As sementes dos cruzamentos que produziam mais de cem sementes, foram colocadas para germinar na estufa climatizada do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV para verificar a viabilidade das sementes obtidas. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor de 72 células preenchidas com substrato Substrato MecPlant HF-01 Classe F.

As sementes foram tratadas com fungicida sistêmico a base de carbendazin 2,5mL. L⁻¹. O tratamento consistiu em mergulhar estas sementes na solução do fungicida, e em seguida, secá-las com papel

toalha conforme orientação de Reis² (informação verbal). Tal tratamento foi realizado devido a ter sido observado, em vários capítulos, a presença de fungos durante a formação das sementes.

Durante o período de germinação, as irrigações foram manuais e diárias para evitar estresse hídrico. Após a germinação, as plantas permaneceram na bandeja por sessenta dias, sendo transferidas posteriormente para sacos plásticos com capacidade para três litros de substrato, os quais foram preenchidos com substrato Substrato MecPlant HF-01 Classe F. As plantas permaneceram na estufa climatizada da LBV desde a semeadura, realizada no dia 21/04/2011, até completarem seis meses, em 21/10/2011, quando foram transferidas para o ambiente semi-protégido da FAMV/UPF, pois as temperaturas já estavam mais amenas com o início da primavera. As plantas foram mantidas sem restrição hídrica, mediante irrigação manual, com auxílio de regador, sendo aplicados fertilizantes líquidos, semanalmente, alternando duas soluções, conforme Guiselini (2002) (Tabela 2).

Durante o período experimental foram necessárias aplicações de fungicida (carbendazin a 0,15 mL.L⁻¹ dissolvido na solução de água com 15% de leite) para o controle de oídio (*Erysiphe* sp.), acaricida (abamectin a 0,25 mL.L⁻¹) para controle do ácaro rajado (*Tetranychus* sp.) e inseticida (thiamethoxam 1,14 g.L⁻¹) para o controle do pulgão e tripes (*Frankliniella* sp.).

O delineamento foi completamente casualizado. Foram avaliadas a taxa de germinação e a taxa de sobrevivência aos seis e aos

² REIS, E.M. PPGAgro/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária/UPF

nove meses. Os dados obtidos foram analisados pelo teste Chi-quadrado.

2.2. Segregação da progênie

A análise da progênie foi realizada aos nove meses e consistiu da avaliação dos caracteres vegetativos e caracteres morfológicos do capítulo. Os caracteres vegetativos avaliados foram: diâmetro da planta (obtido através da medição entre os dois pontos mais distantes da planta), estatura da planta (determinada da base da planta até seu ponto mais alto), comprimento da folha (da base do pecíolo até o ápice da folha) e largura (obtida na parte mais larga da folha), estes dois últimos caracteres foram avaliados na maior folha da planta.

As avaliações dos caracteres morfológicos do capítulo foram realizadas quando a planta iniciou o estágio reprodutivo, e quando os capítulos encontravam-se no estágio comercial, ou seja, quando da abertura das duas fileiras de flores do disco. Os capítulos foram avaliados para os seguintes caracteres: comprimento e diâmetro do escapo (Figura 2), diâmetro do capítulo e do centro do capítulo, diâmetro do involúcro, largura do lábio superior (Figura 3), número de flores do raio, tipo do capítulo (simples, semidobrado e dobrado) e coloração do capítulo.

As avaliações quantitativas foram realizadas com auxílio de régua, trena e de paquímetro digital. O experimento para avaliação da progênie foi completamente casualizado. As plantas foram distribuídas em três fileiras com espaçamento entre linhas de 30 cm e entre plantas de 25 cm.

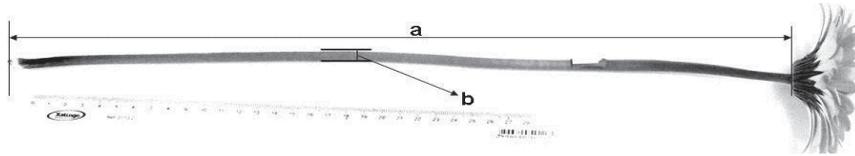


Figura 2- Variáveis quantitativas contínuas avaliadas no escapo: (a) comprimento do escapo e (b) diâmetro do escapo. Fonte: Cardoso (2007).

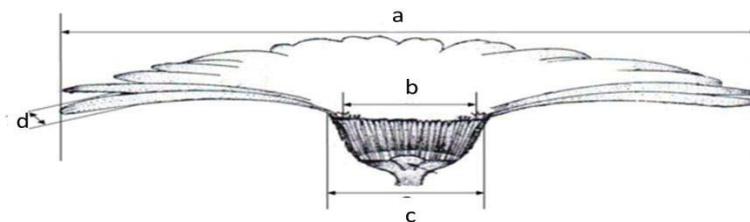


Figura 3 - Variáveis quantitativa contínuas avaliadas no capítulo de gérbera: (a) diâmetro do capítulo, (b) diâmetro do centro do capítulo, (c) diâmetro do involúcro e (d) largura do lábio superior da flor do raio. Figura adaptada de Drennan et al. (1983).

As variâncias de ambiente (VE), variância fenotípica (VF) e variância genética (VG) foram estimadas para as gerações fixas P1 e P2, e a geração segregante F2 (correspondente neste trabalho a geração F1 que apresenta segregação devido a heterozigose dos parentais) para cada um dos cruzamentos realizados. Com os dados obtidos para a variância ambiental, estimou-se a herdabilidade no sentido amplo utilizando a equação proposta por Allard (1960).

$$VE = (VP1 + VP2)/2$$

$$VF = VF2$$

$$VG = VF - VE$$

$$H^2 = VG/VF$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Hibridação em gérbera

O conhecimento da biologia e morfologia floral, tipo de reprodução, bem como os aspectos relativos a polinização e a fertilização são fundamentais para trabalhos de melhoramento genético, sendo importante também, avaliar os efeitos das alterações da induzidas artificialmente no modo de reprodução, nos cruzamentos dirigidos e autofecundações. A hibridação é uma das etapas mais importante de um programa de melhoramento pois gera variabilidade, permite combinar genes em um mesmo indivíduo, e dessa forma o sucesso de um programa de melhoramento depende da possibilidade da hibridação, a qual deve estar bem estabelecida e controlada.

1.1 Avaliação da ocorrência de autoincompatibilidade em gérbera

A não observação da formação de semente nos capítulos protegidos para nenhum dos acessos avaliados, confirma o que foi observado por Cardoso (2007). Segundo esse autor, a não formação de sementes no capítulo, ou seja a não ocorrência de geitonogamia no capítulo é devida a protoginia, observando-se a maturação das flores femininas antes das flores hermafroditas.

A ausência de formação de sementes nos capítulos que apenas foram protegidos (Tratamento 1), juntamente com a obtenção de sementes em capítulos que foram polinizados com pólen de outros capítulos do mesmo indivíduo (Tratamento 2), demonstra que a

ausência de autofecundação dentro do capítulo, nas condições experimentais aqui avaliadas, é devida a protoginia e não a autoincompatibilidade.

Analisando a frequência de capítulos em que foi observada a formação de sementes, e a de capítulos em que não houve a formação de sementes, pelo teste Chi-quadrado ($q= 13,01$), foi possível constatar que as frequências observadas diferiram das frequências esperadas ao nível de significância de 1% (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de capítulos em que houve formação de sementes quando apenas protegidos e quando submetidos a polinização manual com pólen da mesma planta (geitonogamia), porém de diferentes capítulos. Passo Fundo, RS, 2009-2012

Tipo de tratamento realizado no capítulo	Capítulos		Número de capítulos avaliados
	Com formação de sementes	Sem formação de sementes	
Somente proteção	0 (4.5)*	15 (10.5)*	15
Polinização manual	9 (4.5)*	6 (10.5)*	15
Total	9	21	30

* Os valores numéricos indicam a frequência de formação de sementes: frequência observada e entre parênteses a frequência esperada.

A formação de sementes em capítulos polinizados com pólen oriundo de outros capítulos da mesma planta indica que pode ocorrer geitonogamia em gérbera e, portanto, não ocorre autoincompatibilidade. O fato de não ocorrer autoincompatibilidade não exclui a possibilidade de existência de incompatibilidade entre genótipos de gérbera. Segundo Zapata & Arroyo (1978), alógamas autocompatíveis costumam exibir grau variável de autocompatibilidade e de adaptação à endogamia, o que pode

minimizar o efeito da limitação, ausência ou falta de pólen. Entretanto, sua eficiência reprodutiva pode ser comprometida na dependência da intensidade da depressão endogâmica: a expressão de alelos recessivos letais ou semi-letais na endogamia (KNIGHT *et al.*, 2005).

O número de flores do raio e a média de sementes obtidas com a geitonogamia estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Número de sementes formadas nos capítulos submetidos polinização com pólen da mesma planta. Passo Fundo, RS, 2009-2010

Acesso	Número de flores do raio						Número de sementes					
	R1	R2	R3	R4	R5	X	R1	R2	R3	R4	R5	X
A7	36	38	36	35	36	36,2	0	20	23	0	2	9,0
A8	32	30	33	32	33	32,0	5	0	6	0	47	11,6
GWC	71	83	76	77	82	77,8	2	6	0	126	0	26,8

*R = repetição, X= média

Apesar de o número de flores variar conforme o material genético utilizado, as médias de semente formadas entre os genótipos não diferiram significativamente (Tabela 6). A grande amplitude no número de sementes formadas entre as repetições (Tabela 5), indica que a produção de sementes nos capítulos em que se realizou a polinização com pólen da mesma planta, parece estar mais relacionada a fatores ambientais do que relacionada a autoincompatibilidade.

Em girassol, Asteraceae alógamas, se observa a ocorrência de protandria e ocorrência de um sistema genético de autoincompatibilidade, que determina a diferença do nível de autofecundação de cada genótipo. Nesta espécie, há uma variação que vai desde completa autoincompatibilidade até total autofertilidade (CASTIGLIONI & OLIVEIRA, 1999).

Tabela 6 – Média do número de flores do raio, sementes formadas e percentagem de sementes formadas nos capítulos dos genótipos A7, A8 e Green White Center, submetidos polinização com pólen da mesma planta. Passo Fundo, RS, 2009-2010

Genótipo	Número médio de flores do raio no capítulo	Número médio de sementes formadas	Percentagem do número de sementes formadas em relação ao número de flores do raio (%)
A7	36,2 b	9,0 a	24,86 a
A8	32,0 b	11,6 a	36,25 a
GWC	77,8 a	26,8 a	34,45 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, Teste Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

A geitonogamia tem sido relatada como um mecanismo que assegura a reprodução quando cruzamentos (entre indivíduos) são escassos, no entanto, sua taxa diminui com o aumento da densidade populacional (ASHMAN et al., 2004).

Comparando a sobrevivência das plantas originadas de geitonogamia com as de fecundação cruzada, observou-se uma menor sobrevivência das plantas originadas de sementes geitonogâmicas. Isso pode ser constatado nitidamente para os cruzamentos envolvendo a cultivar GWC. Para os outros cruzamentos observou-se uma baixa germinação de sementes e até a ausência desta para o genótipo A8 (Figura 4). Tal constatação pode estar relacionada a depressão endogâmica uma vez que ocorre formação de sementes viáveis mas as progênes obtidas apresentam baixa sobrevivência ao longo do tempo, e também um fenótipo inferior aos dos parentais.

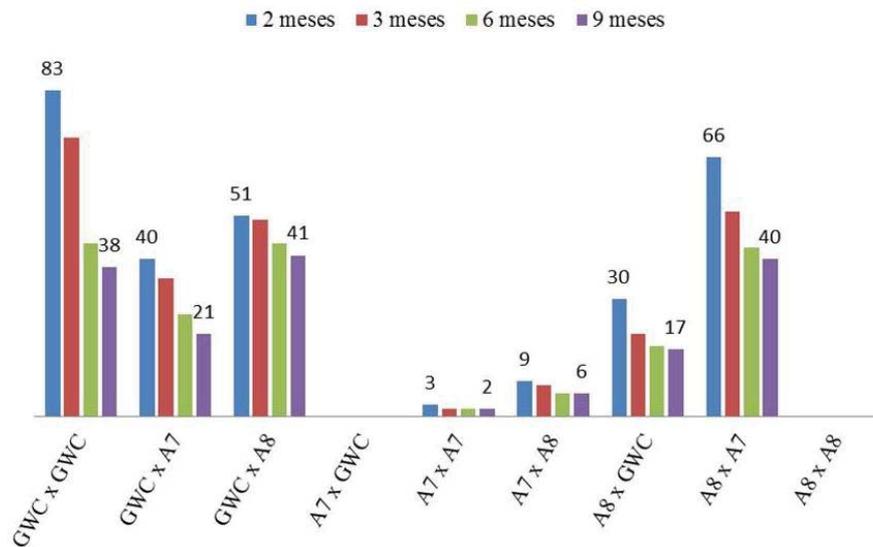


Figura 4 - Número de plantas obtidas em diferentes cruzamentos de gébera e de plantas sobreviventes ao longo do tempo.

Raju & Ezradanam (2002) avaliaram a geitonogamia e xenogamia em *Jatropha curcas*, e obtiveram respectivamente, 77% e 96% de frutos formados nestes processos, no entanto, enquanto todos os frutos xenogâmicos se desenvolveram até a maturação, 23% dos frutos geitonogâmicos foram abortados antes de finalizarem seu desenvolvimento.

Abdelgadir et al. (2008), compararam a formação de frutos a partir de autofecundação e fecundação cruzada em *J. curcas*, e observaram uma maior produção de frutos na fecundação cruzada, além destes serem maiores e mais pesados do que aqueles produzidos por autofecundação

Para confirmar a ocorrência de depressão endogâmica em gébera, experimentos com progênies maiores e com maior número de repetições devem ser avaliados.

1.2 Avaliação do efeito paterno, materno e incompatibilidade na formação de sementes

Não foi verificada influência paterna significativa para a formação de sementes para os dez genótipos avaliados quando a GWC foi utilizada como genitor feminino. No entanto, o genótipo A7 apresentou média de produção de sementes superior (média+1 desvio padrão) quando comparado as demais médias obtidas para os outros doadores de pólen (Tabela 7). É possível que haja certo grau de incompatibilidade entre os genótipos, mas a genealogia dos materiais utilizados não é de domínio público, pois a frequência média de sementes formadas foi baixa, chegando até a em determinados cruzamentos não se obter sementes (Tabela 7).

A frequência média foi calculada mediante a multiplicação do número médio de sementes por 100 e divisão deste valor por 77,8 (média do número de flores do raio na cultivar Green White Center). Se avaliou apenas as flores do raio, pois se deu prioridade a polinização destas, mas em alguns casos houve uma formação de sementes superior a esta média, devido a algumas flores trans terem sido fertilizadas pela proximidade e por já estarem receptivas nos dias que se fez a polinização das flores do raio. Sugere-se que em estudos futuros repita-se a polinização por mais dias para otimizar o número de sementes formadas.

Tabela 7 – Viabilidade média do pólen (VMP) de diferentes genótipos de gérbera, número, média (MS) e frequência (F) de sementes formadas em cruzamentos envolvendo a cv. Green White Center (GWC) como genitor feminino e diferentes genótipos de gérbera como genitores masculinos (doadores de pólen). Passo Fundo,RS, 2009-2010

Genótipos doador de pólen	VMP (%)	Número de sementes					MS	F (%)
		D1	D2	D3	D4	D5		
A7	95,9	0	0	5	152	1	31,6*	40,61
Opium	97,9	0	0	0	46	0	9,2	11,82
Chili Pepper	95,6	0	16	0	0	0	3,2	4,11
Essandre	97,8	0	0	0	0	10	2,0	2,57
GWC	98,6	2	0	6	0	0	1,6	2,05
Dream	92,0	1	0	0	5	0	1,2	1,54
A8	95,7	4	0	1	0	0	1,0	1,28
Feria	86,8	0	1	2	0	0	0,6	0,77
Isimar	98,3	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Ave Maria	94,4	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Total por dia		7	17	14	203	11	252	

* Não houve diferença na média de formação de sementes pelo F-teste ao nível de 5%. Média geral = 5,6. Desvio Padrão = 21,51. D = dia de polinização (bloco).

A variação no número de sementes formadas entre os blocos (dias de polinização) não foi significativa pelo F-teste ao nível de 5% de probabilidade de erro (Tabela 8). Uma das hipóteses levantadas para explicar a baixa formação de sementes, foi que, o congelamento do pólen tivesse alterado seu poder de germinação. No entanto, a avaliação do pólen foi realizada sempre antes das polinizações e para todos os cruzamentos a média de viabilidade foi alta utilizando o método da coloração com Carmin acético 45% (Tabela 7). Em um estudo paralelo a este, foram testados alguns meios de cultura para germinação do grão de pólen mas em nenhum deles se observou a germinação, tanto para os pólenes congelados quanto para os frescos. A observação de formação de sementes para alguns cruzamentos nos

leva a crer que outros fatores, provavelmente ambientais, estejam atuando no processo de fertilização, ou no processo de germinação do tubo polínico, de forma que não se observou a formação de sementes.

Tabela 8 – Análise de variância para influência de genitor masculino e dias de polinização (blocos) na formação de sementes em gérbera. Passo Fundo, RS, 2009-2010

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F (Pr>F)
Genitor masculinos	8	4102,8	512,8	0,97 (0,47)
Blocos	5	3240,3	810,1	1,53 (0,21)
Erro	32	15935,6	529,2	
Total	44	24278,8		

Apesar de não haver diferenças significativas entre as médias de produção de sementes e nem entre os blocos devido ao alto coeficiente de variação foi possível observar que o pai A7 sempre se destacou para a produção de sementes nos cruzamentos em que esteve envolvido neste trabalho. O fato de A7 ser um genótipo não comercial, e potencialmente mais distante geneticamente dos demais, pode ser uma das razões para isso. Possivelmente outros fatores ambientais como altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar possam estar afetando à fertilização, devendo estes serem testados. Castiglioni & Oliveira (1999) citam chuvas prolongadas durante a floração, altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar como desfavoráveis à fertilização, reduzindo o número de sementes por planta em girassol.

Seja qual for o fator influenciando na formação de sementes, parece haver uma interação deste fator com o genótipo, pois há cruzamentos em que em nenhum dos blocos observou-se formação de

sementes, ou que haja problema de incompatibilidade entre os genótipos cruzados.

Na avaliação do efeito materno na produção de sementes, onde a cv. Green White Center e o acesso A8 foram utilizados como genitor feminino, e as cultivares Essandre, Feria e Isimar, como genitores masculinos, a análise de variância não demonstrou haver influência significativa entre os genitores femininos, e nem entre estes e os genitores masculinos (Tabela 9). O fator significativo nesta análise foi o de blocos, evidenciando que o dia da polinização influenciou os resultados e que o uso de ambientes controlados pode aumentar a eficiência na formação de sementes.

Tabela 9 – Análise de variância para influência de genitor feminino, masculino e interação destes na formação de sementes em gérbera. Passo Fundo, RS, 2009-2010

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F (Pr>F)
Genitor feminino (GF)	1	661,50	661,50	1,44 (0,249)
Genitor masculino (GM)	2	540,58	270,29	0,59 (0,568)
Interação GF*GM	2	252,75	126,37	0,27 (0,763)
Bloco	3	6994,83	2331,61	5,07 (0,012)
Erro	15	6900,16	460,01	
Total	23	15349,83		

Apesar de neste bloco de cruzamento o pólen utilizado ainda fresco, sendo armazenado no refrigerador apenas durante os três dias de polinização consecutivos, observou-se, mesmo assim, uma baixa e até a ausência de formação de sementes (Tabela 10). Tal constatação demonstra que o congelamento do pólen não afetou a baixa formação de sementes obtidas nos cruzamentos com diferentes genitores masculinos.

O pólen parece não ter sido o fator mais importante para a diferença das médias de formação de sementes, pois utilizando o mesmo pólen para ambos os acessos utilizados como genitores femininos, houve diferença no número de sementes formadas (Tabela 10).

Tabela 10 – Número de sementes formadas em cruzamentos envolvendo os genitores femininos, Green White Center (GWC) e A8, e diferentes genitores masculinos. Passo Fundo – RS, 2009-2010

Genitor masculino	Bloco 1 09/09/10 TM 29 °C Tm 24 °C		Bloco 2 15/09/10 TM 28 °C Tm 24 °C		Bloco 3 16/09/10 TM 28 °C Tm 24 °C		Bloco 4 27/09/10 TM 25 °C Tm 20 °C		MSG M
	GW		GWC		GW		GWC		
	C	A8	C	A8	C	A8	C	A8	
Essandre	0	26	0	1	0	0	39	49	14,37
Feria	0	4	0	64	34	0	58	37	24,62
Isimar	0	66	0	0	0	10	59	59	24,25
MSGF	0	32	0	21,6	11,3	3,3	52	48,3	
Média bloco	16,0 ab		10,83 b		7,33 b		50,17 a		

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 1% de probabilidade. MSGM (média de sementes por genitor masculino), MSGF (média de sementes por genitor feminino).

A análise de variância mostrou haver diferença significativa para as repetições, pelo F-teste, ao nível de 1% na pega dos cruzamentos (Tabela 10). Pela comparação de médias de sementes obtidas nos diferentes dias de polinização (Bloco), a maior média foi obtida no bloco quatro, que não diferiu do bloco 1, para ambos os genitores femininos (Tabela 10). Tal constatação indica que a temperatura parece ter um efeito sobre a formação de sementes, ou diminuindo a receptibilidade do estigma ou por algum mecanismo de

abortamento pós-fertilização. A segunda hipótese parece ser a mais coerente visto que nos dias seguintes após a polinização os estigmas se apresentavam escuros sinal de que houve fertilização (Figura 5).

Outro fator que não pode ser descartado é a determinação da receptividade do estigma. Neste trabalho os estigmas foram considerados receptivos quando apresentavam seus ramos abertos. Talvez, a abertura dos ramos não seja indicativo suficiente de que realmente o estigma esteja receptivo pois observou-se que em blocos diferentes, com mesma temperatura, observou-se diferença na formação de sementes (Tabela 10).



Figura 5 – Capítulo de gérbera da variedade GWC após primeira polinização.

A temperatura em que houve maior formação de sementes, independente da combinação dos cruzamentos foi a ocorrida no bloco 4, temperatura máxima de 25 °C, não diferindo no entanto do bloco 1,

indicando que deve haver algum mecanismo que inviabiliza a formação de sementes ou por a temperatura inviabilizar o pólen ou estigma (Tabela 10). Também não se descarta que a influência de outros fatores como a umidade relativa, pois tal fator não foi controlado.

Para o genótipo A8 a temperatura superior a 25 °C parece não ser tão nociva visto que em todos os blocos houve a formação de sementes com pelo menos um dos genitores masculinos.

As percentagem média estimadas do número de sementes produzidas para os cruzamentos envolvendo os diferentes genitores femininos e masculinos (Tabela 11), levou em consideração o número médio de flores do raio, que na cv. Green White Center foi de 77,8 e para o acesso A8 foi 32. Nos casos em que se obteve um número de sementes superior, provavelmente pela polinização de flores trans devido a proximidade destas com as do raio, se considerou o número médio, pois como sempre foi priorizado a polinização das flores do raio.

Tabela 11 – Percentagem média do número de sementes obtidas em cruzamentos de gérbera envolvendo diferentes genitores femininos e masculinos. Passo Fundo – RS, 2009-2010

Genitores masculinos	Genitores femininos	
	GWC (%)	A8 (%)
Essandre	12,5	46,1
Feria	29,5	53,1
Isimar	18,9	57,8
Total	20,3	52,3

A frequência de sementes formadas quando utilizado o acesso A8 como genitor feminino 52,3%, foi semelhante a percentagem de 50% obtida por Cardoso et al. (2009) quando utilizou este mesmo acesso para cruzar com outras cultivares comerciais.

Analisando todos os dados obtidos com a formação de sementes para os diferentes cruzamentos realizados, foi possível observar que a polinização é influenciada pelo ambiente. Em decorrência disto, em trabalhos futuros, a temperatura devem ser controlada e com a finalidade de testar diferentes temperaturas de forma a garantir uma maior formação de sementes.

1.3 Dialelo e capacidade geral e específica de combinação

Não houve diferença significativa entre os nove cruzamentos para média de produção de sementes formadas a partir de cruzamentos dialélicos envolvendo três genótipos de gérbera GWC, A7 e A8 (Tabela 12 e 13). A não significância estatística é atribuída ao alto coeficiente de variação observado (155,78%).

Tabela 12 – Média de produção de semente de três genitores de gérbera, de seus híbridos F1's e dos recíprocos. Passo Fundo - RS, 2009-2010

Genitores	GWC	A7	A8	TOTAL (Yi)
GWC	42,0	68,0	29,0	139,0
A7	34,6	8,3	15,0	57,9
A8	43,6	28,6	17,6	89,8
TOTAL (Yj)	120,2	104,9	61,6	286,7
Média geral= 31,9	Desvio padrão= 43,1			

A análise de variância mostrou que não houve influência significativa para capacidade geral de combinação e capacidade específica de combinação entre os acessos avaliados para a formação de sementes de gérbera (Tabela 13). Em função da não significância estatística para capacidade geral e específica de combinação, os efeitos de CGC e CEC não foram estimados no presente estudo.

Tabela 13 - Análise de variância da produção de sementes de gérbera para um dialelo envolvendo três genitores, seus híbridos F₁'s e recíprocos. Passo Fundo – RS, 2009-2010

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F (calculado)
Cruzamentos	8	7829,63	978,70	0,39 ns
CGC	2	1169,0	584,55	0,24 ns
CEC	3	689,80	229,93	0,09 ns
Ef. Recíproco	3	756,84	252,28	0,10 ns
Resíduo	18	44629,33	2479,41	
Total	26	52458,96		

Experimento 2 : Germinação de sementes e segregação da progênie

As progênies avaliadas neste estudo foram obtidas dos diferentes cruzamentos realizados no Experimento 1.

2.1 Germinação de sementes

Para a maioria dos cruzamentos obteve-se semente viáveis (Tabela 14), apenas não observou-se germinação das sementes dos cruzamentos A8xA8 e A7xGWC, e uma baixa viabilidade (1,8%) para

o cruzamento A7xA7, provavelmente devido a endogamia. No cruzamento entre a cv. GWCxGWC observa-se que não deve haver uma influência considerável de endogamia para germinação de sementes, ou talvez, uma explicação, seja que apesar das plantas obtidas serem de mesma variedade possam haver uma certa variabilidade genética entre elas visto que foram adquiridas em floriculturas.

As sementes com maior viabilidade foram obtidas nos cruzamentos envolvendo a cv. Green White Center e o acesso A8 como genitoras femininas. As sementes com maior viabilidade foram obtidas nos cruzamentos entre GWC x GWC (65,9%) e entre os acesso A8 x A7 (79,1%) (Tabela 14 e Figura 6).

Tabela 14– Número de sementes semeadas (NS), número de sementes germinadas (NSG) e frequência (F) de semente germinadas aos 30 e 60 dias, para diferentes cruzamentos envolvendo como genitores femininos a cv. White Green Center (GWC), A7 e A8, e como genitores masculinos a cv. GWC, A7 e A8. Passo Fundo, RS, 2009-2010

Cruzamento GF	GM	NS	Avaliação 30 dias		Avaliação 60 dias		F (%) por GF
			NSG	F(%)	NSG	F(%)	
GWC	GWC	126	7	5,5	83	65,9	44,4
	A7	129	7	4,1	40	23,6	
	A8	117	47	40,2	51	43,6	
A7	GWC	166	0	0	0	0	7,9
	A7	35	3	1,8	3	1,8	
	A8	41	9	21,9	9	21,9	
A8	GWC	138	22	15,8	30	21,6	33,5
	A7	86	68	79,1	66	79,1	
	A8	58	0	0	0	0	

GF = genótipo feminino; GM = genótipo masculino; F (%) = NSG/NS * 100.

Observou-se haver influência do tipo de cruzamento na germinação e viabilidade das sementes, visto que todas foram semeadas em mesmas condições ambientais (Figura 6).

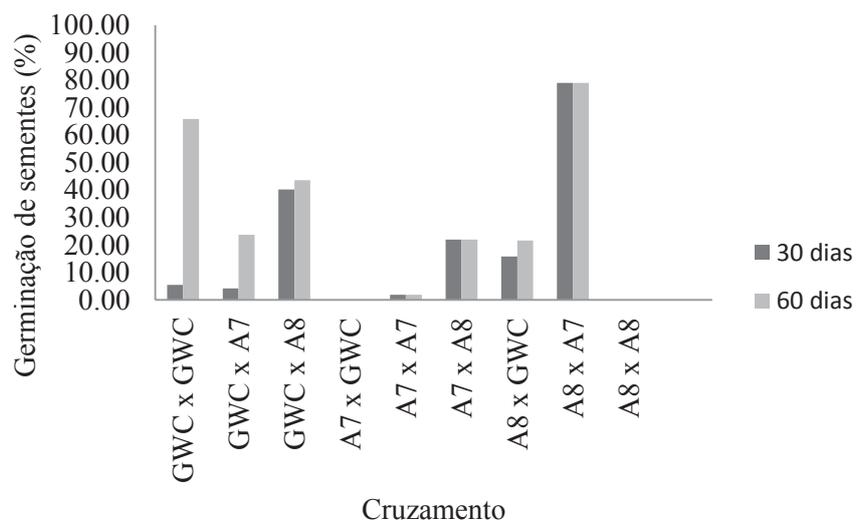


Figura 6 – Percentagem de germinação de sementes obtidas nos diferentes cruzamentos realizados em gérbera.

2.2 Avaliação da progênie

2.2.1 Caracteres Vegetativos

A dispersão observada para os diferentes caracteres vegetativos avaliados nas plantas obtidas após os nove meses da germinação das sementes, demonstra haver variabilidade e pode ser um indicativo de que as mesmas foram obtidas da fecundação cruzada (Tabelas 15, 16, 17 e 18).

Os cruzamentos que proporcionaram a obtenção de progênie com maior variabilidade para os quatro caracteres vegetativos

avaliados foram os entre A8 x A7 e A7 x A8, provavelmente por estes genótipos serem mais divergentes geneticamente e apresentarem mais locus em heterozigose. Também é possível constatar que as maiores médias foram obtidas quando o A8 foi utilizado como mãe, talvez tais caracteres tenham influência de efeito materno.

Nos cruzamentos realizados entre diferentes genótipos foi possível observar segregação para os caracteres quantitativos estatura de planta, diâmetro de planta, comprimento e largura de folha, o que indica que há variabilidade genética pois todos os materiais foram cultivados sob mesmas condições ambientais.

A amplitude da distribuição das observações permitiu o estabelecimento de diferentes classes. O número de classes variou em função do caractere avaliados e do desvio padrão encontrado para este. A determinação das classes se deu pelo 1/4 do desvio padrão, de acordo com Steel & Torrie (1980).

Para o caractere diâmetro de planta observou-se uma redução da média das progênies quando comparada à média dos parentais (Tabela 15), o que pode estar relacionado a depressão endogâmica, constatação ainda mais evidente no cruzamento de autopolinização da cultivar Green White Center (GWC x GWC) (Tabelas 15, 16, 17 e 18).

Para estatura de plantas houve uma menor segregação, e o desvio padrão e as médias das progênies não se distanciaram muito do desvio e das médias dos pais. Houve uma tendência da média da estatura de planta da progênie ser menor que a média de ambos os pais (Tabela 16).

Tabela 15 – Distribuição em classes*, média e desvio padrão dos pais e das progênes obtidas de diferentes cruzamentos de gérbera para o caractere diâmetro de planta. Passo Fundo, RS, 2011

Geração	Diâmetro da planta (cm)														N	Média	σ																
	3,9	7,06	10,22	13,38	16,54	19,7	22,86	26,02	29,18	32,34	35,5	38,66	41,82	44,98				48,14	51,3	54,46	57,62	60,78	63,94										
População 1: Green White Center x A8																																	
P1													1	2	2						5	43,80	1,92										
P2																		1	3			1	5	54,40	4,93								
Progênie (F ₁)						1		1	3	9	7	6	7	3	2						1		1	41	36,08	7,41							
População 2: Green White Center x A7																																	
P1														1	2	2							5	43,80	1,92								
P2																						2	2	1	5	58,40	2,41						
Progênie (F ₁)						1	1	1		1	4	5	4	1	1	1	1							21	33,22	8,78							
População 3: Green White Center x Green White Center																																	
P1															1	2	2							5	43,80	1,92							
P2																1	2	2							5	43,80	1,92						
Progênie (F ₁)	1				1	2	1	6	9	10	2	1	1	2										36	28,13	7,42							
População 4: A7 x A8																																	
P1																						2	2	1	5	58,40	2,41						
P2																							1	3		1	5	54,40	4,93				
Progênie (F ₁)							2					1	1	1										1		6	30,58	13,52					
População 5: A8 x A7																																	
P1																							1	3		1	5	54,40	4,93				
P2																									2	2	1	5	58,40	2,41			
Progênie (F ₁)				1				4	3	4	3	2	5	4	4	3									6		39	36,18	10,96				
População 6: A8 x Green White Center																																	
P1																									1	3		1	5	54,40	4,93		
P2																											1	2	2		5	43,80	1,92
Progênie (F ₁)																															18	42,26	7,79

N = número de indivíduos avaliados. * Classes estabelecidas utilizando ¼ do desvio padrão médio de todos os indivíduos avaliados.

Tabela 16- Distribuição em classes* , média e desvio padrão dos pais e das progênie obtidas de diferentes cruzamentos de gébera para o caractere estatura de plantas. Passo Fundo, RS, 2011

Geração	Estatura da planta (cm)															N	Média	σ												
	1,62	2,84	4,06	5,28	6,50	7,72	8,94	10,16	11,38	12,06	13,82	15,04	16,26	17,48	18,7				19,92	21,14	22,36	23,58	24,8	26,02	27,24	28,46	29,68			
População 1: Green White Center x A8																														
P1	1													2	1												5	17,08	4,71	
P2											1																5	19,92	3,20	
Progênie (F ₁)	2	2	4	4	7	6	4	7	2	2																	41	14,10	3,29	
População 2: Green White Center x A7																														
P1	1													2	1												5	17,08	4,71	
P2																											5	28,06	3,65	
Progênie (F ₁)	1													2	1												21	17,34	3,90	
População 3: Green White Center x Green White Center																														
P1	1																										5	17,08	4,71	
P2	1																										5	17,08	4,71	
Progênie (F ₁)	2	6	8	4	7	2	2	1	2																		36	11,51	2,93	
População 4: A7 x A8																														
P1																											1	5	28,06	3,65
P2																											5	19,92	3,2	
Progênie (F ₁)																											6	16,43	3,43	
População 5: A8 x A7																														
P1																											5	19,92	3,2	
P2																											5	28,06	3,65	
Progênie (F ₁)	1	1	1	2	4	4	3	2	3	1	5	5	2	1	1												1	39	17,66	5,24
População 6: A8 x Green White Center																														
P1																											5	19,92	3,2	
P2	1																										5	17,08	4,71	
Progênie (F ₁)	2	2	1	4	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1												18	15,59	4,40	

N = número de indivíduos avaliados. * Classes estabelecidas utilizando $\frac{1}{4}$ do desvio padrão médio de todos os indivíduos avaliados.

Tabela 17 - Distribuição de classes*, média e desvio padrão dos pais e das progênies obtidas de diferentes cruzamentos de gébera para o caractere comprimento da maior folha. Passo Fundo, RS, 2011

Geração	Comprimento da folha (cm)																N	Média	σ			
	2,92	4,8	6,68	8,56	10,44	12,32	14,2	16,08	17,96	19,84	21,72	23,6	25,48	27,36	29,24	31,12				34,88	36,76	38,64
População 1: Green White Center x A8																						
P1												2	1	2					5	24,42	1,38	
P2																2	2	1	5	32,08	1,86	
Progênie (F ₁)							2	2	3	10	7	4	8	3	1	1			41	23,21	3,85	
População 2: Green White Center x A7																						
P1												2	1	2					5	24,42	1,38	
P2																	2	1	2	5	36,26	2,10
Progênie (F ₁)					1	1	1			2	1	6	4	3	1	1			21	23,9	5,38	
População 3: Green White Center x Green White Center																						
P1												2	1	2					5	24,42	1,38	
P2												2	1	2					5	24,42	1,38	
Progênie (F ₁)	1				1	3	5	6	12	2	2	3	1						36	16,12	4,16	
População 4: A7 x A8																						
P1												2	1	2					5	36,26	2,10	
P2															2	2	1		5	32,08	1,86	
Progênie (F ₁)						1				1	1	1	1				1		6	23,13	5,73	
População 5: A8 x A7																						
P1															2	2	1		5	32,08	1,86	
P2												2	1	2					5	36,26	2,10	
Progênie (F ₁)				1				1	2	3	6	3	4	6	4	9			39	26,38	5,47	
População 6: A8 x Green White Center																						
P1															2	2	1		5	32,08	1,86	
P2												2	1	2					5	24,42	1,38	
Progênie (F ₁)								1	2	6	1	1	2	2	3				18	25,95	4,38	

N̄ = número de indivíduos avaliados. * Classes estabelecidas utilizando ¼ do desvio padrão médio de todos os indivíduos avaliados.

Tabela 18 - Distribuição em classe* , média e desvio padrão da progênie obtida de diferentes cruzamentos de gérbera para o caractere largura da folha. Passo Fundo, RS, 2011

Geração	Largura da folha (cm)																N	Média	σ																						
	1,39	2,06	2,73	3,4	4,07	4,74	5,41	6,08	6,75	7,42	8,09	8,76	9,43	10,1	10,77	11,44				12,11	12,78	13,45	14,12	14,79	15,46																
População 1: Green White Center x A8																																									
P1																	2		1	2						5	12,06	1,04													
P2								1	2	2																	5	6,48	0,63												
Progênie (F ₁)							1	1	3	6	5	4	5	5	4	2	2	2	2		1				41	8,88	2,05														
População 2: Green White Center x A7																																									
P1																				2		1	2			5	12,06	1,04													
P2																							2	3		5	8,06	0,55													
Progênie (F ₁)																					1	1		3	3	2	2	1	3	1	20	8,17	2,65								
População 3: Green White Center x Green White Center																																									
P1																										2		1	2		5	12,06	1,04								
P2																										2		1	2		5	12,06	1,04								
Progênie (F ₁)		1					1	2	2	4	4	5	10	2											3	1		36	8,06	2,04											
População 4: A7 x A8																																									
P1																										2	3		5	8,06	0,55										
P2																										1	2	2		5	6,48	0,63									
Progênie (F ₁)																										1	1	1		6	5,73	1,47									
População 5: A8 x A7																																									
P1																										1	2	2		5	6,48	0,63									
P2																											2	3		5	8,06	0,55									
Progênie (F ₁)																										1	1	3	4	1	8	5	7	1	4	2	1	1	39	6,42	1,92
População 6: A8 x Green White Center																																									
P1																										1	2	2		5	6,48	0,63									
P2																											2		1	2		5	12,06	1,04							
Progênie (F ₁)																										1	1	3	3	1	1	3	1	1	1	1	2	18	10,88	2,17	

N = número de indivíduos avaliados. * Classes estabelecidas utilizando $\frac{1}{4}$ do desvio padrão médio de todos os indivíduos avaliados.

Todos os caracteres vegetativos avaliados apresentaram uma distribuição contínua evidenciando natureza quantitativa dos caracteres avaliados.

2.2.2 Caracteres morfológicos do capítulo de gérbera

O experimento relacionado com a herança de caracteres florais de gérbera não pode ser realizado conforme havia sido planejado. O primeiro problema encontrado foi a baixa formação de sementes conforme discutido e apresentado anteriormente, o que juntamente com a baixa viabilidade das sementes comprometeu o estudo de

herança pois para tal era necessário uma população com mais de 100 indivíduos, e a maior população obtida foi de 41 indivíduos.

O outro fato que atrasou os experimentos foi o tempo necessário para as plantas iniciarem o estágio reprodutivo. As primeiras flores começaram a surgir após 9 meses da sementeira, em janeiro de 2012, e apenas em alguns cruzamentos. Na literatura não há um consenso entre os autores sobre o tempo que a gérbera necessita para passar do estágio vegetativo para o reprodutivo. De acordo com Ball (1998), as sementes emergem em 14 dias, e após quatro semanas, observa-se o primeiro par de folhas verdadeiras, podendo após este estágio serem transplantadas, e após dez semanas, as plantas começam a produzir flores. Assim, desde a sementeira até a produção das primeiras flores seriam dezesseis semanas, quatro meses.

No presente trabalho foi necessário o dobro do tempo. Já para Kloss et al. (2004) as flores usualmente começam a aparecer após os 5 a 8 meses de idade. Mesmo assim, para o cruzamento (Green White Center x A8) que foi mais precoce que os demais, o florescimento ocorreu aos 8 meses e 23 dias.

As avaliações apresentadas sobre os caracteres morfológicos do capítulos foram feitas na progênie de 41 indivíduos obtidas do cruzamento entre a GWC x A8.

As estimativas de herdabilidade obtidas foram no sentido amplo e variaram de moderada a altas, assim tais características podem ser selecionadas já nos primeiros ciclos do programa de melhoramento devido a serem pouco afetadas pelo ambiente.

O caractere comprimento do escapo, de acordo com a progênie obtida, é uma característica quantitativa com genes de ação aditiva,

visto que a média da progênie foi intermediária a dos pais e apresentou uma distribuição simétrica (Tabela 19). A estimativa de herdabilidade obtida para este caractere, foi de 55%, indicando que o comprimento do escapo tem uma grande influência ambiental, devendo sua seleção ser realizado em estágios mais avançados do programa de melhoramento. Apesar das estimativas de herdabilidade serem restritas a sua população de origem, outros autores também encontraram estimativas no sentido amplo próximas a obtida neste estudo e população, 57,2% (OTTAVIANO et al.; 1974) e 47% (SCHIVA, 1975).

Tabela 19 - Média, desvio padrão (σ), amplitude e herdabilidade de diferentes caracteres florais avaliados nas haste floral de gérbera (escapo + capítulo) oriundas da progênie obtida do cruzamento entre a Green White Center e A8. Passo Fundo,RS, 2012

Caractere	Média dos pais (cm)	Média da progênie (cm)	σ (cm)	Amplitude (cm)	h_2
CE	35,6	30,25	5,32	21,7 - 38,00	0,55
DE	0,53	0,48	0,05	0,40 - 0,60	0,99
DC	11,44	9,39	1,65	6,30 - 12,70	0,92
DCC	2,01	1,88	0,38	1,20 - 2,50	0,96
DI	1,93	1,64	0,18	1,28 - 1,95	0,99
LLFR	0,65	0,57	0,11	0,37 - 0,71	0,92
NFR	53,5	42,53	4,84	36,00 - 51,00	0,99

CE = comprimento do escapo, DE = diâmetro do escapo, DC = diâmetro do capítulo, DCC = diâmetro do centro do capítulo, DI= diâmetro do involúcro LLRF = largura da lígula da flor do raio, NFR = número de flores do raio.

A coloração dos capítulos de gérbera, uma das mais importantes características, é baseada na interação de carotenoides e

flavonoides. Segundo Tourjee et al. (1995), o controle genético da coloração dos capítulos de gérbera é determinado pela segregação de um gene de grande efeito (controlando a expressão do pigmento flavonoide) modificado pela adição de genes de menor efeito (provavelmente carotenoides) que teriam sua expressão mascarada pelo gene de maior efeito. Assim, genótipos ciânicos com carotenoides são amarelos, e os genótipos brancos seriam aciânicos e sem carotenoides (TYRACH & HORN, 1997).

Observou-se que as flores apresentaram um gradiente de variação de tons de rosa claro, apresentando-se intermediária entre a coloração branca do pai 1 (GWC) e a rosa pink do acesso A8 (Figura 7) o que indica que este caractere é aditivo. O padrão de distribuição da coloração ao longo da lígula também foi diferenciado, havendo capítulos que apresentavam o parte distal da lígula branca, outros tanto a parte proximal quanto distal de cor branca, outros apresentavam uma tonalidade rosa até a parte medial rosa claro e após este, a coloração branca.

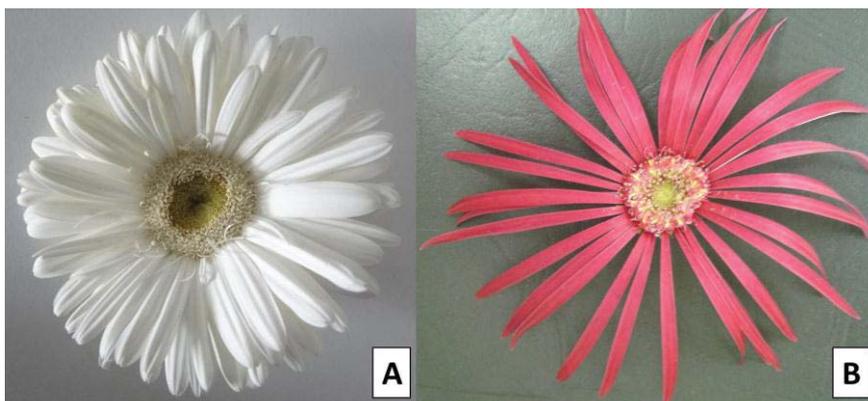


Figura 7 – Aspecto dos capítulos dos genitores: (A) cultivar de vaso Green White Center e (B) acesso não comercial A8.

Todos os capítulos obtidos na progênie até o momento, apresentaram disco de cor claro (Figura 8), coloração dada pela cor do pappus, o que era esperado visto que tanto a GWC quanto o acesso A8 possuem cor clara (Figura 7).

Segundo Kloss et al. (2005b) a coloração escura do disco de gérbera é determinada por um único gene dominante, designado *Dc*. Gérberas com o centro da inflorescência clara seriam recessiva para este gene, apresentando genótipo *dc/dc*. Tal fato foi confirmado também nos cruzamentos realizados, pois utilizando dois parentais com disco de coloração clara, foi obtida uma progênie apenas com capítulos com disco de coloração clara. Ainda segundo este autor, a coloração clara do centro do capítulo de gérbera, é devida ao não acúmulo de antocianinas no pappus, assim, a cor do disco apresenta-se entre verde-amarelado, amarelo-esverdeado e amarelo claro.

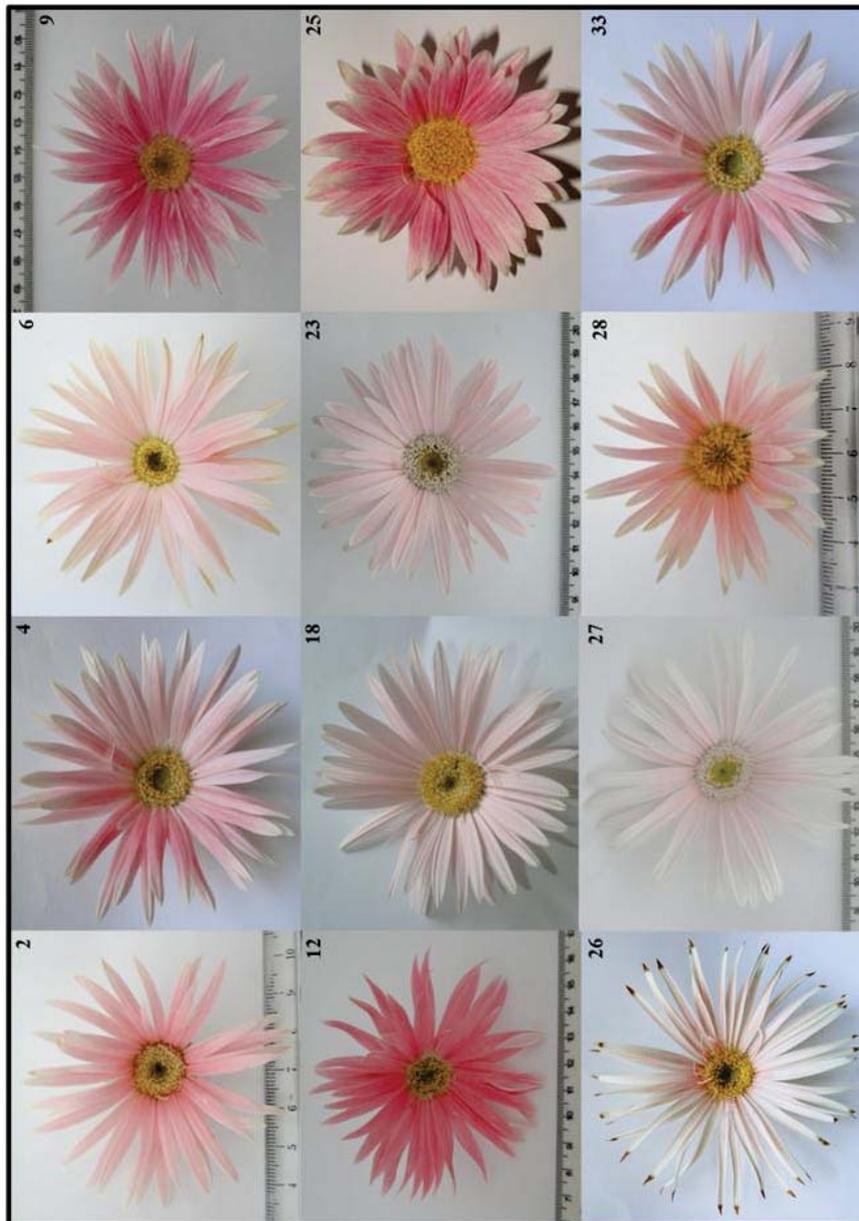


Figura 8 – Aspecto dos capítulos de gérbera oriundos da progênie obtida do cruzamento entre a cv. Green White Center e o acesso A8. Passo Fundo, RS, 2012.

Os capítulos 2, 6, 12, 23 e 26 apresentam uma coloração marrom clara no disco, tal coloração desapareceu com o desenvolvimento do capítulo (Figura 8). Kloss et al. (2005b) em seu estudo sobre a determinação da coloração do disco em gérbera, também relatam ter observado em algumas cultivares e na progênie que estavam avaliando, a ocorrência desta coloração marrom clara no centro do disco de capítulos com coloração do disco clara, quando estes estavam imaturos, mas quando os capítulos atingiam a maturação, esta coloração marrom clara desaparecia.

Com relação ao tipo de capítulo, a progênie apresentou somente capítulos do tipo simples, estando de acordo com Kloss et al. (2004), os quais mostraram ser os capítulos simples determinados por gene recessivo, visto foram obtidos pelo cruzamento de dois genótipos de capítulos simples, a progênie deve apresentar apenas capítulos simples.

Yu et al. (1991) avaliaram a herdabilidade do caractere tempo de florescimento e constataram que o maior efeito genético controlando este caractere é a aditividade. A herdabilidade obtida pelo autor, através da regressão pai progênie, foi de 0.49 indicando que o componente genético aditividade contribuiu com 50% da variância total, enquanto que o componente dominância contribui com 28% e o ambiente com 23% da variância total. A média de dias necessário para o florescimento nas progênies obtidas por Yu et al. (1991) variou de 95 a 122 dias.

Para as progênies obtidas nos cruzamentos realizados no presente experimento, o tempo para o florescimento foi bem superior ao descrito por Yu et al. (1991). A primeira flor obtida do cruzamento

entre a cv. Green White Center e acesso A8, aos 161 dias. Este tempo foi determinado subtraindo o número de dias necessários para a germinação até o estágio de plântula, momento em que estas apresentavam em média três pequenas folhas. Contabilizando desde a data de semeadura, foram necessários em média 210 dias para a obtenção das primeiras flores na progênie do cruzamento entre a GWC e A8. Para os outros cruzamentos o tempo de florescimento será ainda maior, pois há progênies em que ainda não foram obtidos capítulos.

A variabilidade encontrada na progênie para os diferentes caracteres vegetativos e morfológicos do capítulo, até o momento avaliados, reiteram que as progênies obtidas dos cruzamentos realizados não são fruto de autofecundação. Tal fato é evidenciado na Figura 8, onde se observa que nenhum dos indivíduos obtidos foi igual aos pais.

CONCLUSÕES

É possível realizar cruzamentos e gerar sementes férteis e progênes de gérbera tanto por fecundação cruzada quanto autofecundação.

Os genótipos avaliados não apresentaram autoincompatibilidade podendo ocorrer geitonogamia em gérbera.

Não foi detectada influência da capacidade geral e específica de combinação na formação de sementes devido ao alto coeficiente de variação.

Não foi possível observar a influência do efeito paterno e materno para formação de sementes neste trabalho.

A polinização em gérbera é sensível a temperatura, devendo esta ser controlada para aumento da eficiência na produção de sementes.

A herdabilidade estimada para os caracteres morfológicos do capítulo de gérbera variou de moderada a alta.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE ETIQUETAS DE SEQUÊNCIA EXPRESSA E GENES RELACIONADOS A SENESCÊNCIA FLORAL EM GÉRBERA

RESUMO – Este trabalho foi conduzido com o objetivo de identificar sequências expressas e genes que possam estar relacionados a senescência floral de gérbera. Foram coletadas quatro flores do raio para dez diferentes estádios de senescência do capítulo. O estágio 0, foi determinado como o estágio em que o capítulo de gérbera atinge o estágio comercial. Foram determinados quatro estádios antes do estágio zero (dia 0) estádios -4, -3, -2 e -1, estádios pré-senescente, e cinco estádios após o estágio 0, estágio 3, 6, 9, 12 e 15, correspondentes ao número de dias após o capítulo atingir o estágio comercial. Foram selecionados 16 etiquetas de sequências expressas (EST- *expressed sequence tags*) baseadas nos dados de microarranjo de Laitinen (2007) e seis genes associados a senescência floral (*Senescence associated gene* – SAG), SAG Daylily, SAG Daylily (2), SA4 Daylily, Cyp Ipomea, MT Petunia e SAG Gerb, totalizando 22 genes avaliados. Os iniciadores para estas EST foram delineados utilizando o software Primer3. As extrações dos RNAs totais foram realizadas utilizando a metodologia do reagente Trizol. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit Super Script[®] III First Strand Synthesis System for RT-PCR, e a normalização realizada para o gene 26s rRNA. Este cDNA foi utilizado como template para PCR em tempo

real. Para cada um destes 22 genes foram realizadas reações de PCR para cada um dos diferentes estádios de senescência do capítulo determinados para este estudo. Avaliou-se a presença e ausência da observação das bandas obtidas pela amplificação, bem como a comparação da intensidade destas para os diferentes estádios de senescências para cada um dos gene candidatos relacionados a senescência floral. Das dezesseis EST e seis genes associados a senescência avaliados, cinco não demonstraram estar relacionados especificadamente com a senescência das corolas de gérbera, treze apresentaram um aumento da expressão com o avançar dos estádios de senescência e quatro apresentaram uma diminuição na expressão. Dos 22 genes avaliados, cinco transcritos de sequencias expressas, a saber Ger protease, Ger B-gal, Ger Cys prot, Ger WD, e SAG gene Cyp Ipomea, apresentaram-se promissores para futuros estudos por já terem sido relatados em outras espécies como envolvidos no processo de senescência. O SAG gene SA4 Daylily apresentou sua expressão limitada aos dois estádios anteriores ao estágio 0, podendo estar envolvido a algum mecanismo que desencadeia o processo de senescência floral em gérbera.

Palavras-chave: senescência floral, RT-PCR

**TRANSCRIPT EXPRESSION EVALUATE FROM
EXPRESSED SEQUENCE TAG AND GENES ASSOCIATED
TO FLORAL SENESENCE IN GERBERA**

ABSTRACT - This study was carried out to identify expressed sequence and genes involved in gerbera floral senescence. Four ray flowers corolla were collected in ten different stages of capitulum senescence. The stage 0 was determined as the time the gerbera capitulum is on the commercial stage. Four stages before the stage 0 was chosen, stage -4, -3, -2, -1, pre-senescence stage, and five after the stage 0, corresponding to 3, 6, 9, 12 and 15 after the commercial stage. Sixteen expressed sequence tag (EST) were selected based on Laitinen (2007) microarray, and six senescence gene associated to floral senescence (SAG Daylily, SAG Daylily (2), SA4 Daylily, Cyp Ipomea, MT Petunia e SAG Gerb), totaling 22 genes evaluated. The primers to the EST's were designed using the Primer3 software. Total RNA was extracted from corolla ray of gerbera using the Trizol reagent methodology. To synthesize the cDNA the kit Super Script® III First Strand Synthesis System for RT-PCR were used, and the normalization proceed using 26s rRNA. These cDNA were used as template for real time PCR. PCR reaction was done to the 22 genes evaluated in each of the ten capitulum senescence stage determined in this experiment. It was analyzed the presence and absence, and band intensity obtained by PCR amplification to the different senescence stage for each one of the candidate gene. From the 22 genes evaluated, five did not demonstrate to be specifically related to senescence of gerbera corolla, thirteen showed be up regulated and four down

regulated as flowers enter in senescence. Five genes, Ger protease, Ger B-gal, Ger Cys prot, Ger WD, e SAG gene Cyp Ipomea, showed to be promising for future studies since they already have been reported to other species as related to senescence. The SAG SA4 gene had its expression limited to only two stages before the stage 0, and can be involved in some mechanism that triggers the corolla senescence process in gerbera.

Key words: floral senescence, RT-PCR

INTRODUÇÃO

O processo de senescência de uma planta é um processo de desenvolvimento geneticamente regulado e programado que se finaliza com a morte da planta completa ou de um órgão, sendo observado em folhas, pétalas, órgãos reprodutivos, entre outros tecidos. É um processo irreversível de degradação estrutural e funcional das células, caracterizado por processos catabólicos que predominam sobre os processos anabólicos (COLL et al., 1995). Para Reid & Wu (1992) a senescência floral é definida por relações hídricas adversas, abscisão e murchamento das pétalas e flores. A senescência das pétalas é visivelmente mostrada pela murcha (observada pela perda do turgor) e descoloração das pétalas. Na maioria das espécies, quando as pétalas apresentam sintomas de senescência, estas sofrem abscisão (VAN DOORN & WOLTERING, 2008). O processo de senescência floral tem sido caracterizado como um exemplo de morte programada da célula em plantas, envolvendo um elaborado processo catabólico de degradação de macromoléculas, organizadas em cascata, que culminam com a morte celular (TROBACHER et al., 2006, VAN DOORN & WOLTERING, 2008).

Segundo Valpuesta et al. (1995) e Hunter et al. (2002) grande parte dos estudos relacionados a senescência floral são realizados para espécies em que o etileno coordena todo o processo de senescência, é o caso de espécies como o cravo, petúnias, flores das famílias Geraniaceae, Labiatae, Ranunculaceae, Rosaceae e Scrophulariaceae. Estudos visando identificar genes ou fatores que desencadeiam a senescência em espécies cujo processo de senescência não é regulado

pelo etileno devem ser realizados, entre as espécies cujo o processo de senescência não é regulado pelo etileno tem-se a gérberas, narcisos e outras flores de interesse ornamental. De acordo com Reid (2004) as gérberas não são afetadas pela exposição ao etileno.

De acordo com Xu et al. (2007), atualmente, são reconhecidos três padrões de senescência floral, os quais baseiam-se em como a flor responde ao etileno, o qual promove uma série de respostas fisiológicas na planta e está relacionado com a senescência natural das flores (WOLTERING et al., 1994), assim, as flores são classificadas em: flores dependentes do etileno, flores independentes do etileno e outras, que apresentam um padrão intermediário entre estes dois tipos.

Durante o processo de senescência muitos genes tem sua expressão aumentada enquanto para outros ocorre uma redução da expressão. Para muitas espécies, um ou mais genes relacionados a cisteína protease apresentam expressão aumentada em pétalas visivelmente senescentes (JONES et al., 1995; GUERRERO et al., 1998; EASON et al., 2002, WAGSTAFF et al., 2002). Outras proteínas, como proteases aspárticas já foram observadas em pétalas de *Arabidopsis* (CHEN et al., 2002).

Segundo Van Doorn & Woltering (2008), a maioria das mudanças da expressão gênica são relacionadas à remobilização de macromoléculas, e transporte de compostos móveis para fora da pétala. A degradação de moléculas em células senescentes são principalmente devido ao processo autofágico no vacúolo, somado a degradação proteica na mitocôndria, núcleo e citoplasma. Ácidos graxos são quebrados nos peroxissomos e os ácidos nucleicos degradados no núcleo. Estes sinais visíveis de senescência são

precedidos de uma degradação em larga escala de proteínas, aparentemente devido a atividade de cisteína e serine proteases. Pak & van Doorn (2005) obtiveram um atraso na senescência de flores de *Iris* utilizando inibidores de serine proteases.

Breeze et al. (2004) identificaram 109 genes associados com a senescência floral em *Alstroeméria*, destes 93 apresentavam expressão aumentada, codificando proteínas como dedo de zinco (zinc finger), e uma proteinase aspártica, e 16 apresentavam expressão reduzida, entre estes, genes que codificam proteínas indutoras de giberelinas e citocromo P450.

Uma considerável parte da expressão gênica diferencial está relacionada à defesa da planta, mas até o momento não foram identificados genes especificamente relacionadas a morte celular, e como é regulado o processo de desencadeamento da senescência ainda não está elucidado. É sabido que no início do processo de senescência floral há um aumento da produção de etileno nos sistemas que são controlados pelo etileno bem como para as espécies onde a senescência não está sob controle deste fitohormônio.

Muitos fatores de transcrição e fatores de sinalização de tradução são diferencialmente expressos durante a senescência da pétala, porém pouco é conhecido sobre o papel e a função desses fatores.

As pesquisas em biotecnologia vem causando um grande impacto na agricultura, principalmente com o desenvolvimento da tecnologia genômica, que tem possibilitado a geração de informações bem como a criação de banco de dados de sequências de DNA, que possibilitam a identificação dos fatores genéticos determinantes e/ou

associados com características de interesse agrônomo. O sequenciamento de cDNAs em larga escala para produzir Etiquetas de Sequência Expressa (ESTs – *Expressed Sequence Tags*) tem sido muito útil na identificação de genes responsáveis por características agrônomicas desejáveis, possibilitando a manipulação subsequente de genes de interesse por meio de técnicas de genética molecular.

Em plantas, o sequenciamento de EST foi inicialmente feito para espécies modelo *Arabidopsis* (HÖFTE et al., 1993) e arroz (YAMAMOTO & SASAKI, 1997), e posteriormente para muitas outras espécies, inclusive para gérbera (LAITINEN, 2006), sendo as informações obtidas depositadas em bancos genômicos, como o GenBank. A *Gerbera hybrida* é uma flor de corte importante no mercado de plantas ornamentais e também tem sido utilizada como planta modelo para estudos de desenvolvimento floral e organogênese das pétalas por pertencer à família Asteraceae (LAITINEN et al., 2007).

O objetivo principal da investigação genômica é identificar genes responsáveis por características importantes. No caso de plantas ornamentais, uma das características de grande importância é a longevidade pós-colheita, de forma que a identificação de genes relacionados à senescência floral é de extrema importância por permitir um melhor entendimento dos fatores que atuam no processo de senescência floral, bem como a possibilidade de manipulação e silenciamento destes genes pela engenharia genética visando obter flores com uma maior longevidade pós-colheita. Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de identificar

sequências expressas e genes que possam estar relacionados a senescência floral de gérbera.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no período de outubro 2010 a março de 2011, no Louis Mann Laboratory (Figura 1), na Universidade da Califórnia, no Campus localizado na cidade de Davis/ EUA.



Figura 1 – Vista externa do Louis Mann Laboratory, Universidade da Califórnia, Davis/ EUA, onde os experimentos de identificação de genes relacionados a senescência floral de gérbera foram desenvolvidos.

Material Vegetal

Para este experimento foi utilizada um híbrido de *Gerbera hybrida*, identificado com o número de 32 (Figura 2), obtido e cedido pelo PhD. James Harding, professor da UC-Davis que trabalha com o melhoramento de gérbera. Deste híbrido foram coletados três

capítulos. Tais capítulos foram armazenados no laboratório com fotoperíodo de 16h luz/8 escuro com temperatura ambiente, e constituíram as unidades experimentais.

De cada um destes capítulos foram coletadas, em diferentes estágios de desenvolvimento, quatro flores do raio, que foram identificadas e armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração do RNA. A coleta foi realizada no período da manhã, as 9h30.



Figura 2 – Híbrido 32 de *Gerbera hybrida* (vermelho e com capítulo semidobrado), utilizado para coleta das amostras para verificação da expressão de sequências e genes relacionados a senescência.

Para determinação dos dias de coleta do material vegetal e determinação do dia zero (0) utilizou-se a descrição dos estádios de desenvolvimento do capítulo de gérbera determinadas por Helariutta et al. (1993) e ilustrados por Laitinen et al. (2007) (Figura 3). Foram determinados 10 dias para coletas das flores do raio do capítulo de gérbera, iniciando-se no estágio 8 descrito por Helariutta et al. (1993).

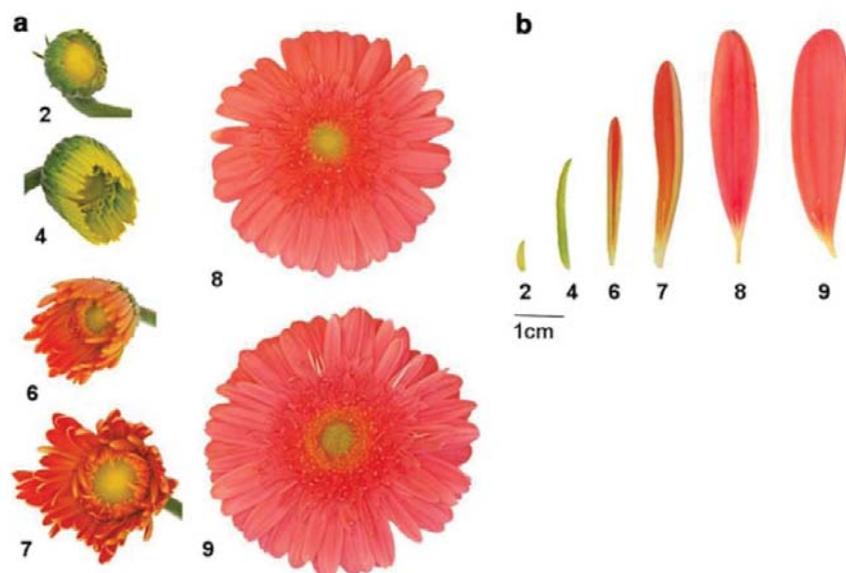


Figura 3 - Estádios de desenvolvimento da inflorescência de *Gerbera hybrida* descritos por Helariutta et al (1993) (a); desenvolvimento das pétalas nos respectivos estádios de desenvolvimento do capítulo (b). (Fonte: Laitinen et al., 2007).

O aspecto do capítulo de gérbera e a descrição destes nos diferentes estádios de senescência utilizados nesse estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Denominação, caracterização e aspecto geral do capítulo de gérbera durante os diferentes estádios de senescência em que foram coletadas as corolas de gérbera para os estudos de expressão de transcritos

Ordem da coleta	Denominação e característica do estágio de senescência	Aspecto geral do capítulo
1	Estádio -4 (dia -4) ou seja, quatro dias antes do dia zero. Neste estágio a inflorescência esta completamente aberta, no entanto, as anteras não estão visíveis. Corresponde ao estágio 8 de Helariutta et al (1993).	
2	Estádio -3 (dia -3) ou seja, três dias antes do dia zero. Algumas flores do disco começam a mostrar seus estames.	
3	Estádio -2 (dia -2), ou seja, dois dias antes do dia zero. Uma fileira de flores do disco com estames expostos.	
4	Estádio -1 (dia -1), ou seja, um dia antes do dia zero. Uma fileira de flores do disco, e mais algumas da segunda fileira, com estames expostos.	

....continuação

Tabela 1 - Denominação, caracterização e aspecto geral do capítulo de gérbera durante os diferentes estádios de senescência em que foram coletadas as corolas de gérbera para os estudos de expressão de transcritos.

Ordem da coleta	Denominação e característica do estágio de senescência	Aspecto geral do capítulo
5	Estádio 0 (dia 0) neste estágio é possível observar que duas fileiras de flores do disco apresentam os estames aparentes. Também chamado de estágio comercial, e corresponde ao estágio 9 do desenvolvimento do capítulo de gérbera de acordo com Helariutta et al. (1993).	
6	Estádio 3 (dia 3), corresponde a 3 dias após o dia zero.	
7	Estádio 6 (dia 6), corresponde a 6 dias após o dia zero.	
8	Estádio 9 (dia 9), corresponde a 9 dias após o dia zero.	

...continuação

Tabela 1 - Denominação, caracterização e aspecto geral do capítulo de gérbera durante os diferentes estádios de senescência em que foram coletadas as corolas de gérbera para os estudos de expressão de transcritos

Data de coleta	Denominação e característica do estágio de senescência	Aspecto geral do capítulo
9	Estádio 12 (dia 12), corresponde a 12 dias após o dia zero.	
10	Estádio 15 (dia 15), corresponde a 15 dias após o dia zero.	

O dia zero foi determinado como o dia em que o capítulo atinge o estágio comercial, ou seja quando é possível visualizar os estames de duas fileiras de flores do disco. Este dia corresponde o estágio nove descrito por Helariutta et al. (1993). De acordo com Kotilainen et al. (1999), neste estágio as pétalas alcançam seu comprimento e largura final, tal informação permite-nos afirmar que após este estágio inicia-se o processo de senescência. Determinado o dia 0, estabeleceu-se os outros 9 estádios para a coleta das corolas, quatro estádios antes e cinco estádios após o dia 0. Os quatro estádios determinados antes do dia 0, -4, -3, -2 e -1, apesar de saber que são

pré-senescente, neste estudo foram denominados juntamente com os demais estádios, como estádios de senescência do capítulo.

As corolas das flores do raio coletadas nos diferentes estádios de senescência foram congeladas com nitrogênio líquido e conservadas a temperatura -80°C até a extração dos RNA totais.

Seleção de sequências expressas e genes relacionados a senescência

As sequências expressas relacionadas a senescência floral de gérbera foram selecionadas baseadas em revisão de literatura. Foram selecionados 16 sequências expressas (Tabela 2) baseadas nos dados de microarranjo realizados por Laitinen (2006).

Tabela 2 – Códigos e descrição das etiquetas de sequência expressa investigadas neste estudo

Código da EST	Denominação neste estudo	Descrição
G0000200024B4	Ger WD	Similar to WD-repeat protein
G0000800015G1	Ger BEL1	BEL-1 related homeotic protein 29
G0000100034F2	Ger BHLH	BHLH transcription factor GBOF-1
G0000200044D12	Ger CCAAT-binding	CCAAT-binding transcription factor subunit A (CBF-A)
G0000200017G4	Ger apt2	AP2 domain containing protein
G0000100036A5	Ger vacuolar	Vacuolar processing enzyme precursor (EC 3.4.22)
G000020009E12	Ger cys. Prot.	Putative cysteine protease
G0000700001G3	Ger ser. Carboxyp.	Putative serine carboxypeptidase II
G0000900007E3	Ger ubi	Ubiquitin-like protein SMT3
G0000800018G12	Ger protease	Protease I
G0000100008H3	Ger inhibitor cys prot	Cysteine proteinase inhibitor A (Cystatin A)
G0000300013D7	Ger 26S prot	26S proteasome ATPase subunit
G0000200012C4	Ger sub pro	Subtilisin proteinase-like protein
G0000200003G5	Ger lrr	LRR receptor-like protein
G0000500003E11	Ger thi pro	Thiol protease
G0000600018F11	Ger B-gal	Beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)

Fonte: Laitinen (2006).

Os primers utilizados neste estudo foram delineados para as sequências de EST's de gérbera obtidas por Laitinen et al. (2007).

As sequências de etiquetas expressas estão disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O número do acesso para a sequência é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos primers utilizado na PCR para as EST escolhidas e tamanhos dos fragmentos amplificados

Nome dos primers e número de acesso*	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho estimado do fragmento amplificado (pb)
Ger WD (AJ754310)	Fw-AATACCAGGGCCATAAGAAGAAG Rv-CAGTACCATTTCCGGTAGTCAAG	474
Ger Bell (AJ765494)	Fw-GAGCAATTCCAACAGCAATACTC Rv-TCCAATGGTTCTTGTCTTCTTC	530
Ger BHLH (AJ752240)	Fw-GGTGTGACAAGGTAAGTGGAAAAG Rv-TTAGTCTTTGGTCATCCACATCC	366
Ger CCAAT-binding (AJ755343)	Fw-CATCTTCATCTCGATCTTCATCC Rv-ATAATCTTCAAACCCGAGGGTAG	484
Ger apt2 (AJ753855)	Fw-ITTGATCAACATCGTCAACATC Rv-TTTCGCTCATGTTTGTAATAAAGG	360
Ger vacuolar (AJ752320)	Fw-TGTATATCATGGAGTCCCAAAGG Rv-ACATGTAAGGATTTGTTGGCATC	633
Ger cys.protease (AJ753206)	Fw-ATCGATGATAAGGAGTTGCAGAG Rv-TATTCGATAGCGTGATTCTTTCC	606
Ger ser. carboxyp. (AJ763235)	Fw-AAGGGCTCTATCTATGGCTGAAG Rv-TGAAAGATTTAAAGCGTCAATGG	489
Ger ubi (AJ766328)	Fw-AACTCCTGATGAGCTGGAAAATG Rv-AACCAACCACGAACTCAGTTTAG	323
Ger protease (AJ765711)	Fw-CCAATTAATCTATTTGGCTACGC Rv- TTCTCTTAGCGTGTCAATTATCAG	214
Ger inhibitor cys (AJ750570)	Fw-ACATATAACATTTGGCAGGGAAC Rv-TGGAGTTTGGGAAGGTCTAAG	423
Ger 26s prot (AJ757149)	Fw-TAACGAGGTTCAACGAATATGC Rv-GAGTGGCACTGAACTTCTGGTAG	690
Ger sub pro (AJ753423)	Fw-ACAAATGGCAAGATGAATGAAAC Rv-GTGCAATGTTTGTGACTGTTAGC	587
Ger Lrr (AJ752682)	Fw-ACAAAACATATTTCCCAACACCAC Rv-ATTTCCATTTTAGCCGAACTTG	381
Ger thi pro (AJ760102)	Fw-GCTGCATCTTTGAGTTTATGGAC Rv-TAACTTCGGTTTCCTCAAACAAC	604
Ger B-gal (AJ762983)	Fw-GTGAATAAACTCTCGTGGCAAAC Rv-CATGTAGATTTGCATTTCCAGTG	554

* Número de acesso para as sequências EST no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Para o delineamento dos primers foi utilizado o Programa Primer3, os quais foram ajustados para a temperatura de anelamento de 58 °C, e o tamanho dos fragmentos amplificados para as diferentes EST variou de 214 a 690 pb (Tabela 3). Também foram avaliados os genes associados a senescência floral (*Senescence associated gene* – SAG) clonados no laboratório para *Hemerocalis* sp. (Daylily), *Ipomea* sp. (Ipomea), petúnia e gérbera: SAG Daylily, SAG Daylily (2), SA4 Daylily, Cyp Ipomea, MT Petunia e SAG Gerb (JIANG et al. dados não publicados).

Extração do RNA

As extrações dos RNAs totais de cada uma das amostras para os diferentes datas de coletas das corolas foram realizadas mediante a maceração de 200 mg de corola de gérbera congelada (o que equivalia a corola das quatro folhas do raio). A maceração foi realizada em almofariz com nitrogênio líquido. Após, cada uma das amostras foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL. Para a extração utilizou-se a metodologia do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Aos microtubos com as amostras, sob capela de fluxo laminar, foram adicionados 1000 µL de Trizol resfriado a 4 °C. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 3 min. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio gelado às amostras invertendo-se os tubos gentilmente em temperatura ambiente por 10 minutos. Após, foram centrifugadas por 15 min a 13.000 rpm a 4 °C. Recuperou-se o sobrenadante, o qual foi transferido para um novo tubo, e adicionado 500 µL de isopropanol gelado, invertendo-se o tubo

algumas vezes para homogeneizar. Novamente, os tubos foram centrifugados, durante 10 min a 13.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet (precipitado) adicionado de 500 µL de etanol 75% (v/v) gelado. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 5 minutos em 13.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi eliminado, deixando-se o precipitado secar em temperatura ambiente na capela de fluxo laminar por 20 min e posteriormente adicionado de 100 µL de Nuclease-free water (Ambion[®]) para dissolver o pellet.

Para remover qualquer contaminação com DNA genômico, foi realizado o tratamento com o Kit Turbo DNA-free[™] (Ambion[®]) utilizando-se as recomendações do fabricante. Procedeu-se então, com a precipitação do RNA, para isso foram adicionados a cada uma das amostras 10 µL de Acetato de Sódio 3M e 250 µL etanol 75% (v/v) gelado. Os tubos com as amostras foram centrifugados durante 15 minutos a 13.000 rpm a 4 °C, descartado o sobrenadante, adicionado mais 500 µL de etanol 75% (v/v) gelado, centrifugando novamente por 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi eliminado, deixando-se o precipitado secar em temperatura ambiente na capela de fluxo laminar por 20 min e posteriormente adicionado de 20µL de Nuclease-free water (Ambion[®]) para dissolver o pellet.

Avaliação da qualidade e quantidade do RNA extraído

A qualidade e concentração (quantidade) do RNA total extraído foi verificada através de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose.

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Nanodrop Technologies), mediu-se a absorbância em dois comprimentos de onda 260nm (A260nm) e 280nm (A280nm). A quantidade de RNA total presente nas soluções foi estimada em A260nm, e no comprimento de onda de 280nm mediu-se a quantidade de polifenóis das amostras. A pureza das amostras foi medida pela razão entre as leituras A260nm e A280nm. Utilizou-se como branco (controle interno e ausência de RNA) Nuclease-free water (Ambion®).

A qualidade do RNA extraído foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x. Foi adicionado ao gel, antes que este se solidificasse, 5 µL do corante Sybr Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

As amostras foram preparadas através da mistura de 5 µL de Loading Buffer e 1 µL de RNA, a qual foi aquecida por 5min a 65 °C.

A amostra foi colocada no gel e o mesmo foi submetido à corrente de 100v por 20min.

As moléculas de RNAs foram visualizadas por meio de coloração com Sybr Green em transiluminador-UV e fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado para análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). As análises foram realizadas com três repetições para cada tratamento (estádio de senescência).

Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit Super Script® III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™, Carlsbad, CA,

USA). A solução para síntese de cDNA foi preparada utilizando 1 μL de RNA (na concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ao qual foi adicionado 9 μL da solução resultante da mistura de 1 μL de 10 mM de dNTP Mix (10 mM de cada [dATP, dTTP, dCTP e dGTP]), 0,8 μL de oligo dt (50 μM), *random hexamers* 0,2 μL e 7 μL de Nuclease-free water (Ambion[®]).

As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 min em termociclador. Após esta etapa, adicionou-se a cada amostra, 10 μL da solução constituída de 2 μL de tampão 10 x First-Strand; 4 μL de MgCl_2 25 μM ; 2 μL de 0,1M de DTT (ditiotretol) e 1 μL de RNaseOut[™] (Recombinant RNase Inhibitor), 0,5 μL da SuperScript[™] III RT e 0,5 μL de Nuclease Free Water (Invitrogen[™]). As amostras foram incubadas por 10 min a 25 °C, 50 min a temperatura de 50 °C. Em seguida, incubou-se por 5min a 85 °C, e após as amostras foram colocadas em banho de gelo e adicionado a cada uma delas, 1 μL de RNase H (2U), incubando-se por 20min a 37°C.

Real Time PCR (RT-PCR) para 26S para normalização das amostras

Para corrigir as variações entre as amostras, foi realizado o RT-PCR com os primers do gene constitutivo que codifica para RNA ribossomal 26S. Cada amostra de cDNA obtida dos RNA totais extraído nos diferentes estádios de senescências, selecionados anteriormente, foi diluída na proporção de 1:50, 1 μL de cDNA em 50 μL de Nuclease-free water (Ambion[®]). A solução para o RT-PCR foi preparada utilizando-se 9,5 μL Nuclease-free water (Ambion[®]),

0,5 µL de 26S F-primer, 0,5 µL de 26S R-primer, 2 µL de cDNA (1/50cDNA) e 12,5 µL de “SYBR Green Master Mix” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As reações foram feitas em triplicatas.

As condições das reações para o Real Time PCR foram 50 °C por 2 min, 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 s e 60 °C por 30 s, 72 °C por 5 min, 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, e 95°C por 15 s, e os dados foram coletados na última fase (fase de extensão).

Os produtos de amplificação obtidos foram identificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% contendo tampão TAE 0,5 x, submetidos à corrente de 100V por 30 min, utilizando como marcador de peso molecular DNA Ladder® 100 pb (Invitrogen™). Os géis foram corados com Sybr Green (1µL.mL⁻¹) e em transiluminador-UV, foram fotografados e analisados através do sistema de fotodocumentação computadorizado pela análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

PCR para amplificação dos cDNA obtidos para os diferentes estádios de senescência de capítulos de gérbera

A reação de amplificação foi realizada para cada uma das 16 EST, para as quais foram delineados os primers apresentados na Tabela 2, e também para os 6 genes associados a senescência floral (SAG gerbera, SAG daylily (2), SAG daylily, SA4 daylily, MT petúnia, Cyp Ipomea), totalizando 22 genes candidatos avaliados. Cada um destes 22 genes foram realizadas reações de PCR para cada

um dos diferentes estádios de senescência do capítulo determinados para este estudo.

A reação foi composta de 1 μL de cDNA (cDNA normalizados, obtidos para cada um dos estádios de senescência), 2,5 μL de buffer (tampão), 0,5 μL *Forward*-primer (F-primer) do gene alvo (10 μM), 0,5 μL *Reverse*-primer (R-primer) do gene alvo (10 μM), 25mM de dNTP Mix, 0,2 μL da enzima Taq DNA e Nuclease-free water (Ambion[®]) até completar o volume de 25 μL .

Esta solução foi preparada para cada um dos 10 estádios de senescência do capítulo, para cada um dos 22 gene alvo, e para cada uma das 3 repetições, totalizando 660 reações preparadas e avaliadas.

A reação PCR foi realizada em termociclador programado para uma reação de amplificação com desnaturação inicial a 94 °C por 5 min. Em seguida, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72°C por 30 s, seguidos de uma extensão final por 10 min a 72 °C.

Os produtos de amplificação obtidos foram identificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% contendo tampão TAE 0,5 x, submetidos à corrente de 100V por 30min, utilizando como marcador de peso molecular DNA Ladder[®] 100 pb (Invitrogen[™]).

Os géis foram corados com Sybr Green (1 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) e em transiluminador-UV, foram fotografados e analisados através do sistema de fotodocumentação computadorizado pela análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

Avaliou-se a presença e ausência das bandas obtidas pela amplificação, bem como a comparação da intensidade destas para os diferentes estádios de senescências para cada um dos genes candidatos relacionados à senescência floral. A variação na intensidade das

bandas, com o cDNA normalizado, significava um aumento da expressão do gene candidato avaliado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de senescência da pétala é considerado um sinônimo de morte programada da célula em plantas, envolvendo um complexo conjunto de processos catabólicos e de degradação de macromoléculas em cascata, que culminam com a morte celular (TROBACHER et al., 2006, VAN DOORN & WOLTERING, 2008). A degradação de macromoléculas em células senescentes é devido ao processo autofágico no vacúolo, degradação proteica nas mitocôndrias, núcleo e citoplasma, quebra de ácidos graxos nos peroxissomos e degradação de ácidos nucleicos no núcleo (VAN DOORN & WOLTERING, 2008). A maioria dos transcritos avaliados neste estudo apresenta atividades relacionadas a degradação de macromoléculas de acordo com relatos encontrados na literatura (VAN DOORN & WOLTERING, 2008).

A senescência das pétalas tem sido classificada em três tipos: 1- pétalas que mostram um rápido murchamento seguido de aumento da produção endógena de etileno, como ocorre em petúnia (WHITEHEAD et al., 1984) e hibisco (WOODSON et al., 1985); 2- pétalas que murcham lentamente e flores que não apresentam aumento significativo da produção de etileno, como por exemplo, *Chrysanthemum*, *Narcissus* (NICHOLS, 1966) e *Zinnia elegans* (STIMART et al., 1983); 3- pétalas que apresentam sintomas de abscisão, sem murchamento, geralmente estimulada por etileno

exógeno, como ocorrem em *Digitalis purpurea* (STEAD & MOORE, 1983), *Antirrhium* (FARNHAM et al., 1981) e *Delphinium* (SHILLO et al., 1980).

O acompanhamento da senescência do capítulo de gérbera no presente experimento, permitiu observar um lento processo de murchamento, de perda de turgescência das corolas da flor do raio de gérbera, o qual se intensificou após o estágio 9, sendo provavelmente a gérbera classificada no grupo 2 de senescência da pétalas.

A Figura 4, apresenta uma flor do raio do estágio 9 e outra no estágio 15 de senescência do capítulo, sendo possível observar uma redução na largura e um enrugamento devido a murcha, característica do processo de senescência, o que fortalece a hipótese de que gérbera pertença ao grupo 2, visto que no estágio 15, com visíveis sinais de senescência, as flores permaneciam aderidas ao capítulo.

No entanto, para confirmar que a gérbera pertence ao grupo 2 de senescência, grupo em que as pétalas murcham lentamente e as flores não apresentam aumento significativo da produção de etileno, testes para avaliar se há a produção de etileno deveriam ser realizados, para descartar a possibilidade de a gérbera pertencer ao grupo 1 de senescência das pétalas. Também é necessário avaliar a aplicação exógena de etileno para confirmar que a senescência do capítulo de gérbera não é afetada pela aplicação de etileno.



Figura 4 – Aspecto das corolas da flores do raio no estágio 9 e 15 de senescência, respectivamente 9 e 15 dias após a inflorescência ter atingido o estágio comercial.

A estimativa da pureza dos RNAs totais obtidos em cada um dos diferentes estádios de senescência apresentaram valores que variaram, em média, de 1,78 a 2,08. As médias da razão espectral mostram que amostras estavam com qualidade necessária para a síntese de cDNA e posterior amplificação por RT-PCR, visto que tal razão deve apresentar valores compreendidos entre o intervalo já mencionado. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose que mostrou que estes não estavam degradados.

Nas reações de RT-qPCR, para análise de quantificação relativa é necessário utilizar um gene normalizador, que deve ser um gene constitutivo e não variar diante das condições experimentais, como por exemplo, RNA18S, b-actina, gene ribossomal 26S, os quais

são utilizados para normalizar os dados da reação (WALL & EDWARDS, 2002; BRUNNER et al., 2004). No presente experimento utilizamos para a normalização primers do gene 26s rRNA. A Figura 5 apresenta o perfil eletroforético dos cDNA obtidos para os diferentes estádio de senescência para o gene 26s rRNA após a normalização, todos apresentando banda com as mesmas intensidades, o que torna possível a avaliação e comparação da expressão dos genes alvos deste trabalhos através da comparação da intensidade das bandas formadas.



Figura 5 – Perfil eletroforético de PCR de cDNA normalizado, obtido de RNA extraído de corolas de gérbera, em diferentes estádios de senescência do capítulo, para o gene 26s rRNA.

Os transcritos avaliados neste trabalho foram selecionados de acordo com Laitinen et al. (2007), por estarem expressos no estágio 9 do desenvolvimento do capítulo de gérbera e não nos estágio 7 e 8. No entanto, observou-se neste trabalho, que alguns deles já estavam expressos no estágio -4 de senescência do capítulo, estágio que corresponde ao estágio 8 do desenvolvimento do capítulo de gérbera.

Das dezesseis etiquetas de sequências expressas e seis genes associados a senescência avaliados, cinco não demonstraram estar relacionados especificadamente com a senescência das corolas de gérbera, treze apresentaram uma aumento da expressão com o

avançar dos estádios de senescência, principalmente no estágio 15, e quatro apresentaram uma diminuição na expressão. Tais afirmações são feitas baseadas na intensidade das bandas visualizadas no gel (Figuras 6 a 13).

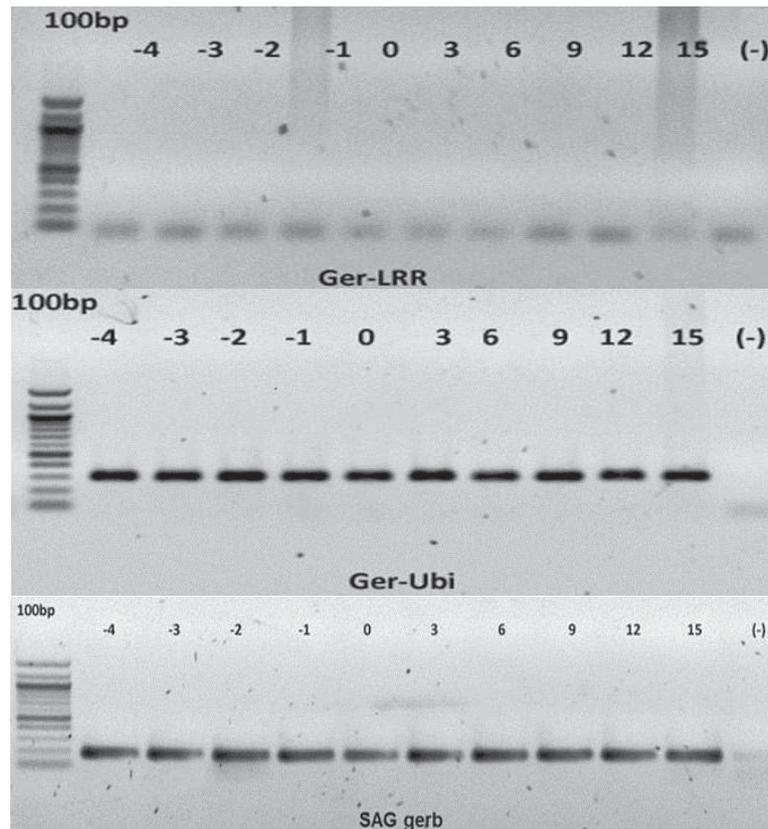


Figura 6 – Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas receptor do tipo proteína kinase (Ger LRR), SMT 3 proteína tipo ubiquitina (Ger Ubi) e para o gene SAG gerb.

A expressão dos transcritos para as sequências Ger-LRR (receptor do tipo proteína kinase), Ger ubi (SMT3 proteína tipo

ubiquitina) e Ger Apt2 (proteína contendo o domínio Apt 2), bem como para os genes associados a senescência (SAG): MT petúnia e SAG Daylily, clonado em *Hemerocallis* sp, não parece ser específica para a senescência de corolas de gérbera visto que a abundância de transcritos não mostra variação entre os estágios iniciais de abertura do capítulo e os estágios finais em que se observa as nítidas características de senescência na corola dos flores do raio do capítulo de gérbera (Figura 6 e 7).

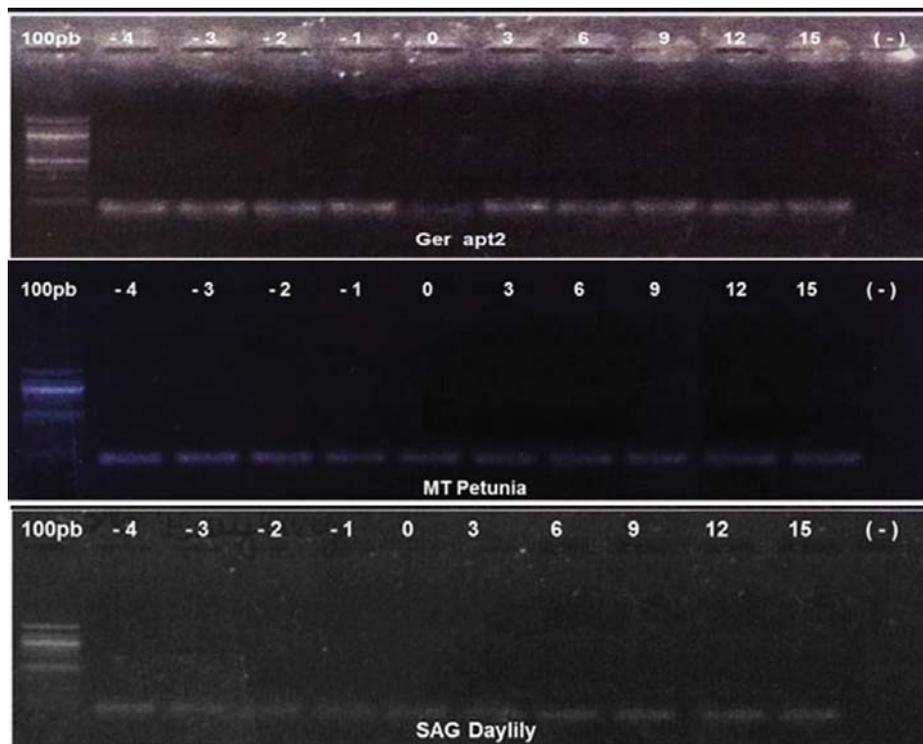


Figura 7 - Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos de cDNA na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências ger Apt2 (proteína contendo o domínio apt2) e os genes associados a senescência em petúnia, MT Petunia, e em *Hemerocallis* sp., SAG Daylily.

Analisando o perfil eletroforético para as diferentes sequências expressas e genes avaliados, foi possível observar uma variação na expressão ao longo dos dez estádios de senescência para alguns destes genes e sequências expressas avaliados. Apesar de nosso objetivo ser identificar genes relacionados a senescência, principalmente nos estádio mais avançados, compreendendo aqueles após o capítulo atingir o estádio comercial, também se avaliou a expressão antes deste estágio, para ver que genes atuam antes do processo inicial de senescência. Tal informação pode ser importante para tentar melhor compreender o processo de senescência e os fatores que interferem neste processo.

Durante o processo de senescência das corolas de gérbera observou-se que alguns genes apresentavam sua sua expressão aumentada, enquanto para outros ocorria uma redução da expressão.

A Figura 8, 9 e 10 apresentam a expressão dos transcritos das sequencias expressas Thiol protease (Ger thi pro), Subunidade 26S proteosome atpase (Ger 26S prot), Enzima precursora do processo vacuolar, Protease 1 (Ger protease), Beta-galactosidase (Ger B-gal) e *Putative* cisteína protease (Ger Cys Pro), Ger Bel-1, Enzima precursora do processo vacuolar (Ger vacuolar), Fator de transcrição bHLH para GBOF-1 (Ger bHLH1), Inibidor da cisteína ptoteinase (Ger Inhibit Cys), subunidade A do fator de transcrição que se liga ao CCAAT (CBF-A) (Ger CCAAT), e a expressão para os genes associado a senescência SAG Daylily (2) e SAG gerbera.

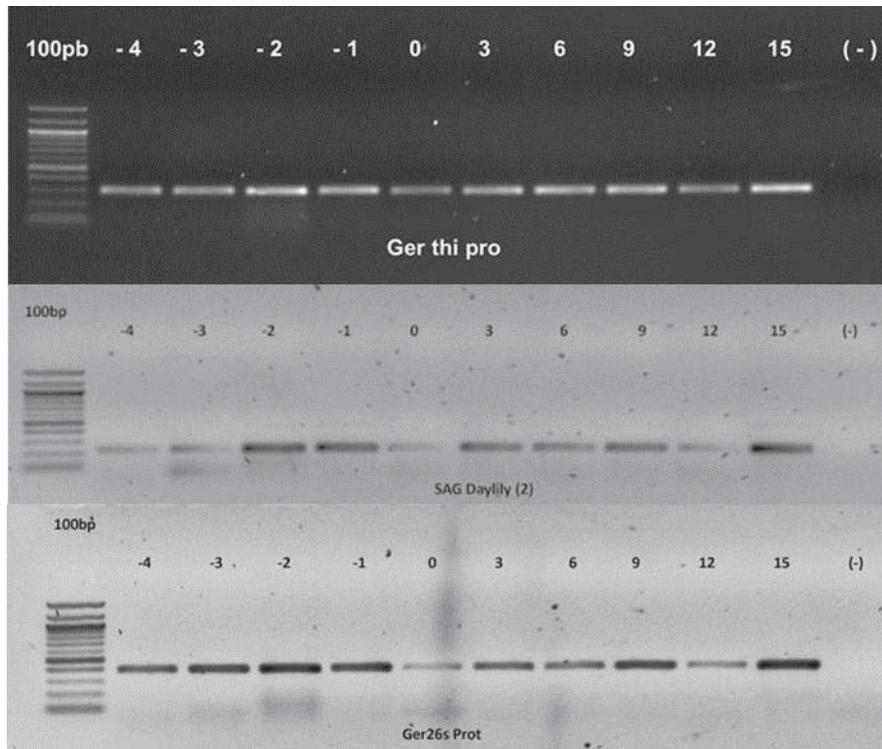


Figura 8 – Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas da Thiol protease (Ger thi pro), 26S proteasome ATPase subunit (Ger 26S prot) e o gene SAG Daylily (2).

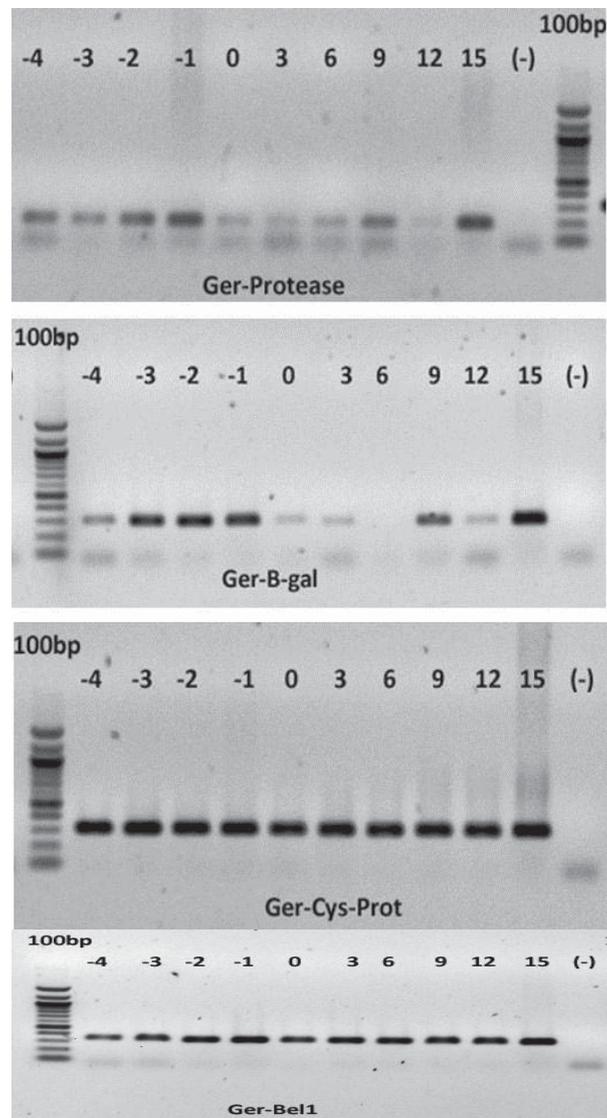


Figura 9 - Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas da Protease 1 (Ger protease), Beta-galactosidase (Ger B-gal), *Putative* cisteína proteinase (Ger Cys Prot) e Ger-Bel 1.



Figura 10 - Perfil eletroforético de PCR do acúmulo de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para sequências expressas da Enzima precursora do processo vacuolar (Ger vacuolar), Fator de transcrição bHLH para GBOF-1 (Ger bHLH1), Inibidor da cisteína proteinase (Ger Inhibit Cys) e CCAAT-binding transcription factor subunit A (CBF-A) (Ger CCAAT).

Analisando as Figuras 8, 9 e 10, é possível constatar que todas apresentam uma alta expressão no estágio 15, ou seja 15 dias após o estágio comercial. Apesar deste aumento do número de transcritos na corola do último estágio 15 de senescência, tais transcritos não são específicos para a senescência da corola, visto que é possível detectar tais transcritos mesmo nas fases iniciais do desenvolvimento do capítulo, apesar de em menores níveis.

Durante o processo de senescência, enzimas proteolíticas, como as proteases e cisteína proteinases, para quais se observaram um aumento de expressão neste estudo, degradam proteínas pela hidrólise de ligações peptídicas, sendo este, um dos processos mais bem caracterizados envolvido com a morte celular em plantas (BEERS et al., 2000). Entre todas proteases, as cisteína proteases são a mais frequentes e melhor caracterizadas, e devido ao seu papel tem sido clonadas e observado alta expressão em pétalas petúnias (JONES et al., 2005), Alstroeméria (WAGSTAFF et al., 2002), narciso (HUNTER et al., 2002).

Estudos têm indicado que a senescência floral é acompanhada pelo aumento de atividades hidrolíticas, atividades da ATPase, da celulase, poligalacturonase e Beta-galactosidase em pétalas senescentes de Daylily. Para o gene da Beta-galactosidase, também foi verificado um aumento da expressão nos estágios finais da senescência em nossos estudos.

Outros transcritos que também tiveram uma maior expressão nos estágios avançados da senescência floral foram a cisteína protease, enzima do processo vacuolar, subtilisina e serine carboxipeptidases, os quais também já foram identificados em narciso (HUNTER et al.,

2002), planta que também apresenta o processos de senescência independente do etileno, assim como gérbera. Tal fato indicando que tais transcritos, possivelmente têm um importante papel no processo de senescência, devendo ser melhor investigado em estudos futuros.

A Figura 11 também mostra uma alta expressão no estágio 15 para o transcrito Ger WD, a qual pode estar relacionada ao fato de neste estágio a corola estar num avançado estágio de senescência, podendo o Ger WD estar atuando tanto no controle do ciclo celular quanto apoptose (EBI, 2012), no entanto estudos devem ser realizados de maneira a avaliar melhor o aumento de expressão com outras técnicas como RT-PCR.

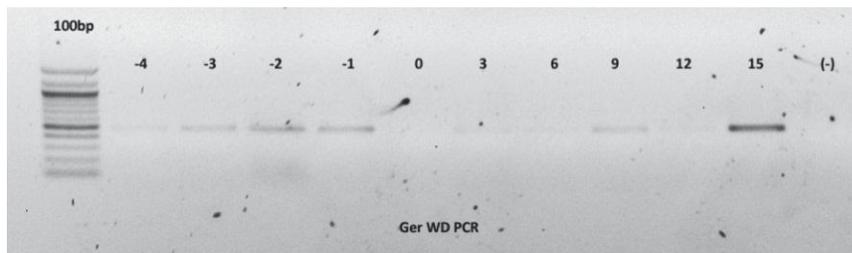


Figura 11 – Perfil eletroforético de PCR de cDNA normalizado para proteína semelhante a WD repetitiva (Ger WD), obtido de RNA extraído de corolas de gérbera, em diferentes estádios de senescência.

O gene associado a senescência *Cyp Ipomea* foi o que apresentou um padrão de expressão mais relacionado ao processo de senescência floral de gérbera, visto que a abundância de seus transcritos tornaram-se mais evidentes no estágio de senescência 3, correspondente ao terceiro dia após o capítulo atingir o estágio comercial, e foram aumentando até o estágio 15, onde as corolas mostravam visíveis sinais de senescência, murcha das pétalas.

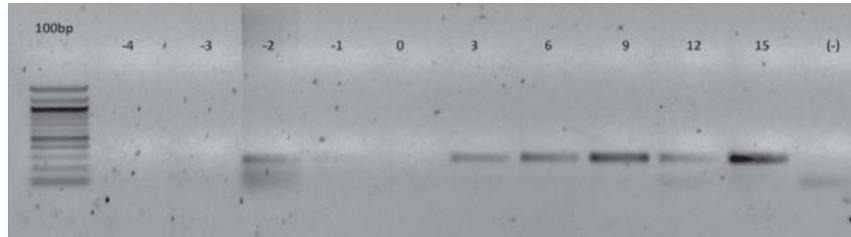


Figura 12 – Perfil eletroforético de PCR de cDNA normalizado para o gene *Cyp Ipomea*, obtido de RNA extraído de corolas de gérbera, nos diferentes estádios de senescência.

Os gene Ger-sub pro, Ger ser. Carboxyp., e SA4 Daylily que apresentaram uma redução da expressão (Figura 13).

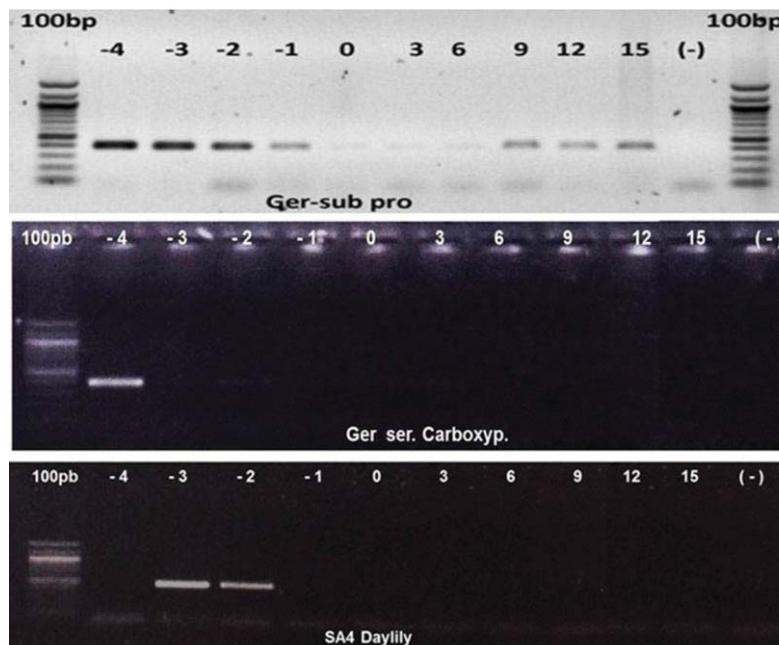


Figura 13 - Perfil eletroforético de PCR da expressão de transcritos na corola de gérbera nos diferentes estádios de senescência para as sequências expressas: proteína semelhante a subtilin proteinase (Ger sub pro), *Putative* serine carboxypeptidase (Ger ser. Carboxyp.), e o gene associado a senescência flora SA4 Daylily.

O nível de abundância dos transcritos para Ger sub pro, SA4 Daylily e Ger ser carboxipeptidase praticamente desapareceu antes mesmo de o capítulo atingir o estágio comercial, com exceção do Ger sub pro, proteína semelhante a subtilin proteinase, em que nos estádios mais avançados da senescência foi possível detectar seus transcritos. Tal padrão de expressão se assemelha ao encontrado por Sugawara et al. (2002). Estes autores clonaram um gene inibidor de cisteína protease que expressava-se abundantemente em pétalas no estágio em que a flor de cravo estava completamente aberta e que declinava a expressão durante a senescência. Devido a este comportamento de expressão, este gene foi considerado pelos autores como apresentando uma importante função na regulação da senescência das pétalas por ajuste fino da expressão de diferentes cisteína proteases. Assim, tais transcritos devem ser melhor analisados para detectar possível relação destes com o processo que desencadeia a senescência floral.

A análise do perfil de transcritos são requisitos indispensáveis para entender o funcionamento de células, órgãos e da planta inteira. As funções dos genes analisados foram atribuídas por similaridade com proteínas cujas sequências encontram-se em bancos de dados e na literatura. Assim, os dados apresentados refletem as taxas de expressão dos níveis relativos dos transcritos de genes individuais, não fornecendo indicações dos mecanismos de regulação ou da presença do produto final, a proteína expressa.

A identificação destes transcritos e genes com expressão aumentada ou reduzida, será útil para estudos para a identificação e análise de genes associados a senescência floral de gérbera, bem como podem ser úteis em futuros estudos visando o entendimento dos

mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares de regulação da senescência floral.

As informações geradas nesse trabalho, poderão servir como base para estudos futuros avaliando o padrão de interação entre as proteínas decodificadas por SAGs que auxiliaram na elucidação do efeito cascata de sinalização no mecanismo de senescência floral, e também no entendimento de como os estímulos externos e internos atuam neste processo.

O gene associado a senescência floral SA4 Daylily parece estar envolvido a algum mecanismo que desencadeia o processo de senescência floral em gérbera, visto que sua expressão está limitada aos dois estádios anteriores ao estádio final da organogênese. No entanto, estudos mais específicos devem ser realizados para testar tal hipótese.

CONCLUSÃO

A avaliação da expressão em corolas de gérbera dos transcritos e genes associados a senescência floral permitiram identificar 13 genes que possivelmente estejam envolvidos com o processo de senescência floral de gérbera. Destes, cinco, a saber Ger protease, Ger B-gal, Ger Cys prot, Ger WD, e SAG gene Cyp Ipomea, são promissores para futuros estudos por já terem sido relatados em outras espécies como envolvidos no processo de senescência.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO USO DA TÉCNICA DE SILENCIAMENTO GÊNICO POR INDUÇÃO VIRAL EM GÉRBERA

RESUMO – Objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência da metodologia de silenciamento gênico por indução viral (VIGS- *virus inducing gene silencing*) em gérbera utilizando como vetor viral TRV, visando a utilização desta em futuros estudos de identificação e função gênica nesta espécie. Neste estudo foram utilizadas duas variedades de gérbera, as quais foram submetidas a dois experimentos. O primeiro experimento consistiu da avaliação da eficácia de três métodos de inoculação, aplicação de vácuo, injeção no rizoma e injeção nas nervuras e pecíolo da folha, do meio de infiltração para VIGS em gérbera; e o segundo, da avaliação de duas diferentes concentrações do meio de infiltração na densidade óptica de 2.0 e 3.0. Construções virais pTRV1, pTRV2 e pTRV2 *Phytoene desaturase* (PDS) foram transformadas independentemente em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por eletroporação. A avaliação consistiu da visualização do sintoma de fotobranqueamento nas folhas causados pelo silenciamento do gene PDS, que cataliza a biossíntese de carotenóides, e se o sintoma de fotobranqueamento era completo ou variegado. Não foi observado o fenótipo do fotobranqueamento em gérbera para os diferentes métodos de inoculação testados. Apenas para o experimento 2, quando realizou-se a inoculação por cinco semanas consecutivas, da solução de infiltração de 3.0 O.D, foi observado o fotobranqueamento variegado para ambas as variedades

utilizadas. É possível utilizar o vetor viral TRV para VIGS em gérbera, no entanto, são necessários mais estudos avaliando os diferentes fatores, genótipo, temperatura, tempo e número de repetições de inoculação, ou até mesmo a utilização de um outro vetor viral, de forma a aprimorar a técnica para se ter um silenciamento gênico mais efetivo.

Palavras-chaves: *Gerbera hybrida Hort.*, engenharia genética, determinação da função genica, TRV

EVALUATION OF VIRUS-INDUCED GENE SILENCING METHODOLOGY IN GERBERA

ABSTRACT – This study evaluated VIGS methodology in gerbera using the viral vector TRV to identify and study the gene function in gerbera. Two gerbera varieties were used in two experiments. The first one, the effectiveness of three inoculation methods, vacuum application, rhizome injection and petiole and leaf vein injection were evaluated, and in the second one, it was tested two concentrations of infiltration medium and optical density 2.0 and 3.0. The viral constructions pTRV1, pTRV2 and pTRV2 *Phytoene desaturase* (*PDS*) were transformed independently into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 by electroporation. The evaluations consisted of viewing of photobleaching phenotype in leaves caused by PDS gene silence, gene which is involved in the carotenoids biosynthesis and check if the phenotype was complete or variegated. The photobleaching phenotype was not observed in the different methods of inoculation tested. Only for the experiment 2, when the inoculation was held for five weeks, and the concentration of the medium infiltration was 3.0 O.D it was possible to observe the variegated photobleaching phenotype for both gerbera varieties. It is possible use the TRV vector viral for VIGS methodology in gerbera, however more studies should be carried out to evaluate the genotype, temperature, inoculation time and number, or even the use of another vector virus in order to improve the VIGS technique to have a more effective gene silencing.

Key words: *Gerbera hybrida* Hort., genetic engineering, gene function determination, TRV

INTRODUÇÃO

A técnica de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) consiste na supressão da expressão de genes. É uma técnica desenvolvida recentemente, baseada no mecanismo natural de defesa da planta no qual a replicação viral sofre supressão, e que vem sendo amplamente utilizada para estudos da expressão e caracterização da função de genes em plantas (BURCH-SMITH, et al., 2004; JEONG et al., 2005; SHAO et al., 2008).

VIGS vem se tornando uma técnica promissora por ser um método rápido, que possibilita a visualização do fenótipo do gene silenciado entre duas a quatro semanas após a inoculação, além de permitir que a avaliação seja realizada no fenótipo maduro evitando a necessidade dos demorados processos de transformação genética da planta e regeneração, e devido ao fato de a construção poder ser facilmente gerada pela clonagem direta dentro do vetor viral sem envolver sequências invertidas (LU et al., 2003). Além destas vantagens, a metodologia permite analisar genes que possuem um fenótipo letal uma vez que esse sistema é aplicado em plantas adultas não havendo morte do embrião como ocorre em sistemas de mutagênese insercional (BAULCOMBE, 2004; JIANG et al., 2005, GODGE et al., 2008).

Para a obtenção de VIGS, um fragmento do gene de interesse é inserido em um vetor viral, em substituição a genes dispensáveis à infecção sistêmica. Este vetor modificado, ao ser inoculado na planta, fará com que o fragmento de interesse seja replicado e disseminado pela planta como parte do vírus recombinante. Iniciado o processo de

silenciamento, o mRNA endógeno, correspondente ao fragmento transportado pelo vetor viral, é degradado via silenciamento de RNA (BAULCOMBE, 1999; LU et al.; 2003).

Os vetores virais para VIGS vem sendo frequentemente empregados em estudos de genética reversa, sendo promissores para plantas difíceis de serem transformadas desde que estas sejam suscetíveis a infecção viral (ROBERTSON, 2004; GODGE et al., 2008).

Inúmeros genomas virais já foram manipulados para utilização como vetores para VIGS. Os mais utilizados incluem vírus de RNA, como o potexvírus *Potato virus X* (PVX) (CHAPMAN et al., 1992) e os tobnavírus *Tobacco rattle virus* (TRV) (RATCLIFF et al., 2001, JIANG et al., 2005) e *Pea early browning vírus* (PEBV) (CONSTANTIN et al., 2004), ou de DNA, como os begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMW), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (KJEMTRUP et al., 1998), *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV) (TURNAGE et al., 2002) e *African cassava mosaic virus* (ACMV) (FOFANA et al., 2004). No entanto, os sintomas causados pela infecção viral podem interferir com a interpretação do fenótipo resultante do silenciamento do gene que ele carrega.

Entre os vetores para VIGS, o baseado no *Tobacco rattle virus* (TRV) é o mais proeminente, por apresentar uma ampla gama de hospedeiro, incluindo gérbera, e por conseguir se disseminar vigorosamente por toda a planta, incluindo o tecido meristemático. Outra fator citado é que os sintomas induzidos pela doença são mais suaves em comparação com os outros vírus (GOSSELE et al., 2002; LIU et al., 2002; RATCLIFF et al., 2001).

O vetor TRV tem sido utilizado para silenciar genes endógenos de várias solanáceas, incluindo o gênero *Nicotiana* (ABBINK et al., 2002; LIU et al., 2002; RATCLIFF et al., 2001), *Capsicum* (CHUNG et al., 2004; RYU et al., 2004), *Solanum* (BRIGNETI et al., 2004), *Lycopersicon* (LIU et al., 2002; VALENTINE et al., 2004) e *Petunia* (CHEN et al., 2004; RYU et al., 2004), bem como em *Arabidopsis* (VALENTINE et al., 2004).

Para a eficiência da metodologia VIGS, além da necessidade de se ter um vetor capaz de se disseminar pela planta, é necessário durante a otimização da técnica a utilização de genes marcadores que permitam a rápida e eficaz visualização do silenciamento. Segundo Godge et al. (2008), alguns genes são comumente utilizados como indicadores do silenciamento gênico nos diversos tecidos de plantas, entre eles o fitoene dessaturase (PDS) e proteína verde fluorescente (GFP). O gene que codifica a proteína fitoene dessaturase vem sendo muito utilizado para avaliar a capacidade da indução de VIGS por vetores virais pois, uma vez silenciado, é observado nas plantas o surgimento de sintomas de fotobranqueamento e nanismo. Assim, o gene *PDS* é um ótimo indicador de silenciamento gênico no tecido foliar, pois apresenta função conhecida e um fenótipo de mutação de fácil percepção (LIU et al., 2002; JEONG et al., 2005; SHAO et al., 2008).

Outros fatores, como o método de inoculação, o estágio de desenvolvimento da planta a ser utilizada nos experimentos, a concentração da solução de infiltração com *Agrobacterium*, e o espaço para as raízes desenvolverem-se, podem afetar a eficiência da VIGS (ROBERTSON, 2004; WANG et al., 2006).

Por todas estas vantagens oferecidas pela técnica, ela parece promissora para ser utilizada em gérbera, espécie ornamental de alto valor comercial, e que também vem sendo amplamente utilizada como planta modelo para estudos genéticos e moleculares, de desenvolvimento floral e metabolismo secundários, sendo necessária a adequação desta técnica para a utilização nesta espécie.

Para estudos de expressão gênica, as técnicas mais utilizadas são as da genética reversa e experimentos de perda-de-função, silenciamento gênico. Em gérbera, para viabilizar estudos da expressão gênica relacionada ao desenvolvimento floral, e de identificação e determinação da função gênica de sequências expressas disponíveis em bancos genéticos, faz-se necessário o uso de uma técnica rápida e não onerosa para se avaliar estes genes. No entanto, para a utilização desta técnica em gérbera, é necessário adequá-la para o emprego nesta espécie e também para que seja realizada em planta adulta, visto que a maioria dos trabalhos realizados utilizam plantas jovem e plântulas, e também identificar genótipos que respondam de maneira eficiente a metodologia.

Em *Gerbera hybrida*, Deng (2007) usando os vetores virais de TRV disponíveis, não obtiveram sucesso no silenciamento devido a dificuldade da movimentação do TRV RNA2, que é o vetor que carrega a sequência do gene alvo. Já em outro trabalho, Deng et al (2011), utilizando a metodologia VIGS para *Gerbera hybrida*, testou 21 diferentes genótipos, apenas seis mostraram-se sensíveis, e foram selecionadas para estudos futuros. Entre as metodologias por eles testadas tem-se a inoculação a vácuo que mostrou-se mais eficiente para tecidos foliares, e, a inoculação com ferimento no escapo para

induzir o silenciamento em flores. Os autores apenas afirmam, em um resumo de congresso, que o silenciamento do gene fitoene dessaturase e chalcone sintase induziu os sintomas típicos da não expressão destes genes, mas não apresentam fotos e nem avaliações comprovando os dados obtidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da metodologia VIGS em gérbera utilizando como vetor viral TRV, para futuramente ser utilizada em estudos de identificação e função gênica nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no período de outubro 2010 a março de 2011, no Louis Mann Laboratory (Figura 1), na Universidade da Califórnia, no Campus localizado na cidade de Davis/ EUA.



Figura 1 – Vista externa do Louis Mann Laboratory, Universidade da Califórnia, Davis/ EUA, onde os experimentos de VIGS foram desenvolvidos em gérbera.

Material Vegetal

Duas variedades de gérbera denominada V1 e V2 (Figura 2), doadas por um produtor comercial de gérberas da Califórnia/EUA foram utilizadas neste experimento.

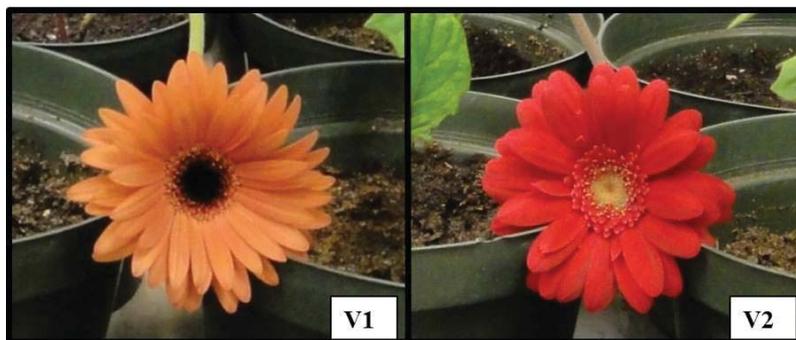


Figura 2 – Aspecto dos capítulos das variedades V1 e V2 utilizadas neste experimento.

De cada variedade foram recebidos cinco plantas. Como a gérbera desenvolve-se em touceira, as plantas foram divididas de forma a se obter as repetições necessárias. Os clones obtidos através da divisão de touceira foram padronizados, apresentando 10 cm de parte radicial, e duas folhas completamente expandidas na parte aérea, e constituíram nossa unidade experimental.

Construção do plasmídeo e preparo do vetor viral

O gene utilizado para avaliar a eficiência da técnica VIGS em gérbera foi o *Phytoene desaturase*, selecionado devido a ser uma marcador visual pois quando silenciado a planta apresenta o fotobranqueamento. Um fragmento de 520 pb do gene *PDS* foi amplificado de folhas de gérbera utilizando primers 5'-

GGTGGAAAG(g/a)T(a/g/t)GCTGC(a/t/c)TGG-3' e 5'-GCCAT(t/c)TT(g/a/t)GAAC C ATG(t/c)TT(t/c)TCCTG- 3'. O produto obtido foi clonado no pGEM-T (Promega) para amplificação, sequenciamento e clonagem. O fragmento de cDNA do gene *PDS* foi excisado do plasmídio mediante digestão com EcoRI, e após subclonado em pTRV2 para obter o pTRV2 *PDS*. As construções virais, utilizando o vetor viral *Tobacco rattle virus*, dos vetores pTRV1 e pTRV2 (Figura 3) foram cedidas pelo o Dr. Dinesh-Kumar da Yale University, New Haven, EUA.

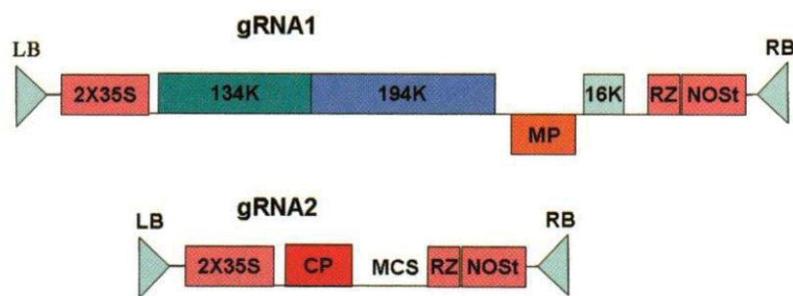


Figura 3 – Esquema das construções do vetor viral *Tobacco rattle virus*. O vetor para VIGS-TRV compreende dois plasmídeos que codificam os RNAs virais RNA1 e RNA2. Em detalhe, os flancos da região codificadora do promotor constitutivo (2X35S) e o terminador (NOST) e o sítio (local) de múltipla clonagem (MCS) que permite a inserção do fragmento do gene de interesse no RNA2. Designações gênicas: 134K e 194K, replicases; MP proteína de movimento; RZ ribozima de auto-clivagem, e CP coat protein (Fonte: REID et al., 2009).

Infecção mediada por *Agrobacterium*

As construções pTRV1 (RNA1), pTRV2 (RNA2) e pTRV2 *PDS* foram transformadas independentemente em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por eletroporação. A bactéria transformada com pTRV1, pTRV2 e pTRV2 *PDS* foi cultivada *overnight*, sob agitação, na temperatura de 29 °C no escuro, em 4 mL do meio LB com 40 mg. L⁻¹ de canamicina, 20 mg. L⁻¹ de gentamicina, 10 mM MES e 10 µM acetosyringone. Após o crescimento bacteriano, nas condições acima descrita, as bactérias foram colocadas para crescer novamente no mesmo meio e condições, porém desta vez, em 500 mL. Transcorrido o tempo crescimento (cultivo), foi avaliada a concentração da solução em espectrofotômetro, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 15 min, para obtenção do pellet o qual foi ressuscitado no Meio de Infiltração (10 mM MES, 10 mM MgCl₂ e 150 µM acetosyringone) de forma a se obter a concentração final de 2.0 OD (densidade óptica). O meio de infiltração foi adicionado ao pellet e o mesmo foi homogeneizado em agitador, em temperatura ambiente por 4 horas.

Para preparar a solução a ser utilizada na infiltração, foi misturado na proporção de 1:1 a solução do meio de infiltração com pellet da *Agrobacterium* contendo o pTRV1 com a solução contendo o pTRV2, ou o pTRV2 *PDS*.

O material, construção e preparo do meio de infiltração acima descrito, foram utilizados para os dois experimento realizados com VIGS:

- 1 – Avaliação da eficácia de diferentes métodos de inoculação da *Agrobacterium* para VIGS em gérbera;
- 2 – Avaliação de diferentes concentrações do meio de infiltração para otimizar a técnica VIGS em gérbera.

Experimento 1: Avaliação da eficácia de diferentes métodos de inoculação da *Agrobacterium* para VIGS em gérbera

Após a padronização, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos de inoculação:

- 1) Infiltração a vácuo: os clones foram colocados em um frasco com a solução, ficando a raiz submersa nesta solução de infiltração. Uma das soluções de infiltração com *Agrobacterium* com pTRV1 + pTRV2, e outra solução da *Agrobacterium* com pTRV1 + pTRV2 *PDS*, e após colocadas na câmara de vácuo, foi aplicado vácuo até que fosse possível observar que a solução havia alcançado a lâmina foliar (Figura 4A);
- 2) Infiltração no rizoma de gérbera: foi realizado um pequeno corte perto da região meristemática e injetado com uma seringa com agulha 2 mL as diferentes soluções de infiltração.
- 3) Infiltração nas nervuras da folha e pecíolo da folha: uma das folhas foi cortada, deixando-se aproximadamente 3cm de pecíolo, no qual foi injetada 0.6 mL da solução (Figura 4B) e mais 0,3 mL injetado na base do pecíolo das outras duas folhas não cortadas. Também foi injetado em cada folha, 0,4 mL do meio de infiltração, distribuído de

forma aleatória nas nervuras das folhas (Figura 4C), totalizando 2 mL de solução por planta.

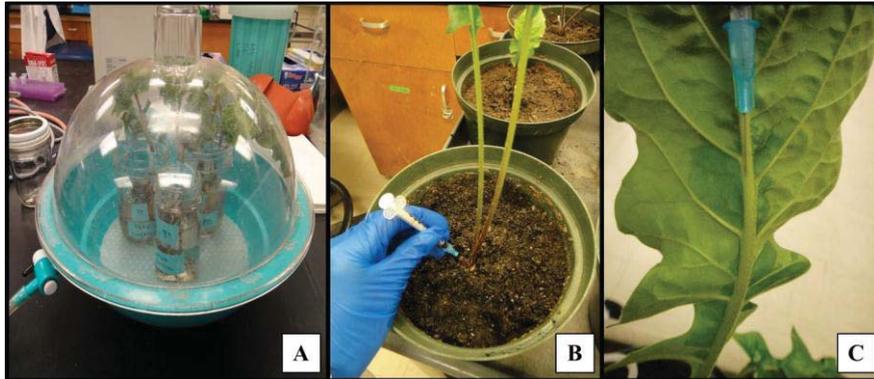


Figura 4 – Diferentes formas de infiltração contendo a *Agrobacterium* carregando os vetores virais testadas para VIGS em gérbera. (A) Infiltração a vácuo; (B) e (C) infiltração por injeção da solução (B) no pecíolo e (C) na nervura.

Para cada um dos diferentes tratamentos de inoculação foram utilizados o meio de infiltração com a *Agrobacterium* contendo o pTRV1 e pTRV2 com o gene PDS inserido, e como controle foram utilizados o meio de infiltração com pTRV1 e pTRV2 e água destilada. A concentração final do meio de infiltração com a *Agrobacterium* transformada foi um O.D 2.0. O experimento constituiu de três métodos de inoculação, duas variedades de gérbera, três diferentes soluções e três repetições. A unidade experimental foi uma planta. Para as soluções controle, meio de infiltração com pTRV1/pTRV2 e água destilada, o número de repetições foi reduzido para duas, totalizando 42 plantas a serem avaliadas.

Após terem sido submetidos aos diferentes tipos de tratamentos, as plantas foram cultivadas na câmara de crescimento com temperatura 20 °C e fotoperíodo 16h luz/8h escuro.

As plantas foram avaliadas semanalmente durante 50 dias. A avaliação consistiu da visualização do sintoma de fotobranqueamento nas folhas causados pelo silenciamento do gene *PDS*, e se o sintoma de fotobranqueamento era completo (em toda a folha) ou variegado.

Experimento 2: Avaliação de diferentes concentrações do meio de infiltração para otimizar a técnica VIGS em gérbera.

O material vegetal utilizado neste experimento foi o mesmo descrito anteriormente, no entanto neste experimento as plantas apresentavam três folhas completamente expandidas. Uma destas folhas foi cortada, deixando-se aproximadamente 3 cm do pecíolo desta folha, para realizar a inoculação do meio de infiltração no pecíolo com auxílio de uma seringa, sendo após o tratamento protegida com parafilme.

O método de inoculação utilizado foi o método de inoculação três descrito no experimento 1. A distribuição dos 2 mL de solução se deu da seguinte forma: 0,6 mL injetados no pecíolo da folha cortada e mais 0,3 mL injetado na base do pecíolo das outras duas folhas não cortadas. Também foi injetado em cada folha, 0,4 mL do meio de infiltração, distribuído de forma aleatória nas nervuras das folhas.

O tratamento consistiu de duas diferentes concentrações do meio de infiltração com *Agrobacterium* contendo o pTRV1 e pTRV2 *PDS*, uma solução com O.D 2.0 e outra com O.D 3.0, e como controle

o meio de infiltração com pTRV1 e pTRV2 e água destilada. O número de repetições foi de quatro plantas, totalizando 32 plantas a serem avaliadas.

Após terem sido submetidas aos diferentes tipos de tratamentos, as plantas foram cultivadas na câmara de crescimento com temperatura de 18 °C e fotoperíodo 16h luz/8h escuro.

As plantas foram avaliadas semanalmente durante um mês. A avaliação consistiu da visualização do sintoma de fotobranqueamento nas folhas causado pelo silenciamento do gene *PDS*, e se o sintoma de fotobranqueamento era completo (em toda a folha) ou variegado.

Após a última avaliação aos 30 dias, o procedimento de inoculação foi repetido semanalmente por 5 semanas. A avaliação da visualização do sintoma de fotobranqueamento, permaneceu sendo realizada semanalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Avaliação da eficácia de diferentes métodos de inoculação da *Agrobacterium* para VIGS em gérbera

Não foi possível realizar o tratamento 2, injeção da solução (meio) de infiltração no rizoma de gérbera, devido a consistência rígida do rizoma que não permitia a injeção da solução, ocasionando quebra e bloqueio (entupimento) da agulha (Figura 5).



Figura 5 – Aspecto do material vegetal das variedades V1 e V2, que seriam utilizadas no método de inoculação mediante a injeção da solução de infiltração no rizoma de gérbera. Davis/EUA, 2010-2011.

A Figura 6 mostra as plantas de gérbera utilizadas no experimento 1, na avaliação dos cinquenta dias após o tratamento, não demonstrando o sinais de fotobranqueamento, que seria visualizado se as técnicas de inoculação tivessem sido eficientes para provocar o silenciamento do gene *Phytoene desaturase*, gene responsável pela biossíntese de carotenóides, molécula que atua na proteção da molécula de clorofila. Assim, quando o gene *PDS* é silenciado a molécula de clorofila é degradada e se observa na folha o fotobranqueamento.



Figura 6 – Aspecto das plantas submetidas aos diferentes métodos de inoculação na avaliação dos 50 dias. (A) inoculação através de vácuo nas variedades 1; (B) inoculação através de vácuo nas variedades 2; (C) inoculação através da injeção da solução de infiltração no pecíolo e nervuras na variedade 1 e (D) inoculação através da injeção da solução de infiltração no pecíolo e nervuras na variedade 2. Davis/EUA, 2010-2011.

Foi possível observar que nas plantas em que se utilizou o método de inoculação a vácuo, que estas apresentaram, visualmente, um menor desenvolvimento do que aquelas submetidas ao método de inoculação pela injeção, tanto que nestas últimas foi possível até o desenvolvimento de flores. A metodologia de injeção da solução de infiltração com seringa e agulha mostrou-se mais adequada para a aplicação da técnica VIGS em gerbera adulta, visto que permitiu o desenvolvimento normal das plantas, o que é necessário para a

eficácia da técnica pois é necessário um equilíbrio entre a planta e o vírus. Gould & Kramer (2007) obtiveram um maior sucesso utilizando a técnica de injeção para a inoculação do que quando utilizado vácuo em plantas adultas de *Aquilegia*.

Neste experimento, utilizou-se a metodologia corriqueiramente utilizada no laboratório Petúnias, vetor viral TRV, concentração da solução de infiltração O.D 2.0, e para as condições de crescimento a temperatura 20 °C e fotoperíodo 16h luz/8h escuro. Com tal procedimento, não se obteve sucesso no silenciamento gênico em gérbera, pois não foi constatado o fenótipo do fotobranqueamento esperado com o uso do gene *PDS*.

Experimento 2 - Avaliação de diferentes concentrações do meio de infiltração para otimizar a técnica VIGS em gérbera

No experimento 2, em que se avaliou o efeito de duas diferentes concentrações da solução de infiltração, O.D 2.0 e 3.0, não foi observada na avaliação aos 30 dias o fenótipo do fotobranqueamento para ambos os tratamentos (Figura 7).

Um fator que pode ter dificultado a visualização do fenótipo do silenciamento pode ter sido a idade da planta. Neste experimento foi utilizado planta adulta, pois tal metodologia tem sido utilizada no laboratório e com ótimos resultados em plântulas de petúnia. Inclusive, a solução de infiltração preparada para ser utilizada em gérbera, também foi aplicada em plântulas de petúnia com quatro folhas, e mostrou-se eficiente, sendo observado o fenótipo do fotobranqueamento entre os 15 a 21 dias após a inoculação (dados não apresentados).

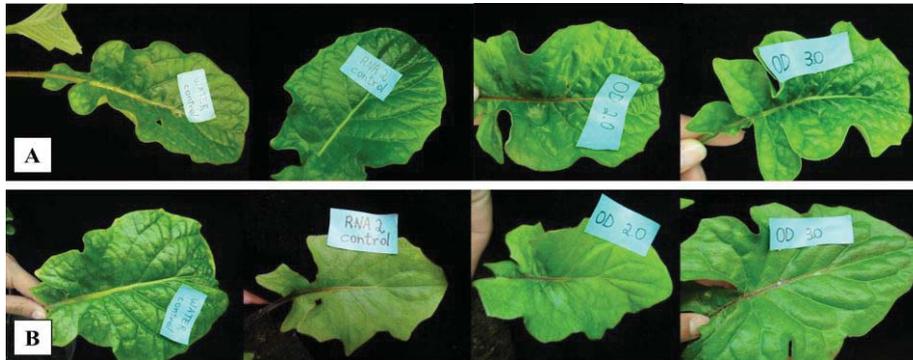


Figura 7 – Avaliação aos 30 dias da visualização do fotobranqueamento em folhas de gérbera submetidas a diferentes concentrações do meio de infiltração. (A) variedade 1 nos controle (água destilada e TRV1(RNA1)/TRV2(RNA2) e TRV1/TRV2-PDS em diferentes concentrações, (B) variedade 2 nos controle (água destilada e TRV1(RNA1)/TRV2(RNA2) e TRV1/TRV2-PDS em diferentes concentrações. Davis/EUA, 2010-2011.

No referido experimento, devido a não visualização do fenótipo nas quatro semanas seguintes a inoculação, tempo indicado pela literatura como suficiente para se observar o silenciamento, optou-se por continuar realizando a inoculação semanalmente nestas plantas, por mais 5 semanas, para verificar se a não visualização era devida a baixa concentração viral, o que totalizou seis aplicações.

A inoculação semanalmente permitiu a visualização do fenótipo do fotobranqueamento, o que não foi observado com uma única inoculação. Este comportamento, pode estar relacionado ao fato de se estar empregando plantas adultas. Gould & Kramer (2007) também utilizaram intervalos semanais, por cinco a seis semanas em *Aquilegia vulgaris* utilizando o meio de infiltração com O.D 2.0, e relataram ter tido um maior sucesso no silenciamento quando utilizado

a inoculação por injeção da solução do que quando utilizou-se o vácuo.

Transcorrido 21 dias após a quinta inoculação, foi possível visualizar em ambas as variedades, V1 e V2, o fenótipo do fotobranqueamento (Figura 8) que permaneceu visível por dois meses, quando utilizada a concentração da solução de infiltração de 3.0 O.D. Para ambas as variedades o fotobranqueamento foi variegado. Talvez tal fato possa estar relacionada a dificuldade relatada por Deng (2007), que o TRV2 tem de se movimentar em gérbera. Outro fato que reforça esta hipótese é que mesmo injetando a solução nas nervuras da folha, e portanto, diretamente no sistema vascular, o que faria o vírus ter uma distribuição sistêmica, não foi observado, visto que as folhas novas não apresentaram o sistema de fotobranqueamento. Tal fenótipo, resultante do silenciamento do *PDS*, somente foi observado nas folhas em que se realizou a inoculação.

O estabelecimento de um processo infeccioso na planta depende da capacidade do vírus de replicar na primeira célula infectada e sua movimentação sistêmica, alcançando células vizinhas e tecidos. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula, através dos plasmodesmas, e o movimento a longa distâncias, que ocorre quando o vírus atinge o sistema vascular, e assim é transportado sistemicamente por toda a planta (GILBERTSON & LUCAS, 1996)

Jiang et al. (2008) em seu estudo visando silenciar o gene relacionado a abscisão em tomateiro, observaram enquanto otimizavam a técnica VIGS utilizando o gene repórter *PDS*, que o tempo e a eficiência da resposta fenotípica para o silenciamento do

referido gene em tomateiro variou entre as espécies e entre cultivares. O tempo desde a infecção até o surgimento dos primeiros sintomas do fotobranqueamento variou de 8 a 14 dias, e a eficiência da infecção variou de 50% a 100%, bem como o fenótipo de fotobranqueamento que variou de quase imperceptível a até o completo fotobranqueamento. Devido a isso, é necessário que se selecione cultivares que respondam adequadamente para os estudos de silenciamento.

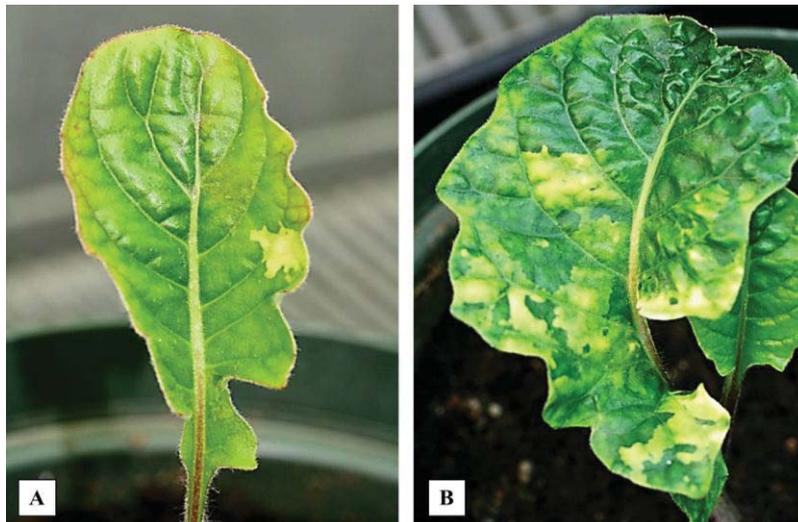


Figura 8 – Fenótipo do fotobranqueamento devido ao silenciamento gênico induzido pelo sistema VIGS, em *Gerbera hybrida* adulta, resultante da inoculação por injeção do meio de infiltração com *Agrobacterium* contendo o pTRV1 e pTRV2 carregando a sequência para o gene PDS, na concentração de 3.0 O.D. observada 21 dias após a quinta inoculação semanal: (A) Detalhe da folha da variedade 1 mostrando fenótipo variegado do fotobranqueamento e (B) folha da variedade 2 mostrando fenótipo variegado do fotobranqueamento. Davis/EUA, 2010-2011.

Outro fator que segundo estes autores tem um forte efeito no silenciamento é a temperatura. Avaliando três diferentes temperaturas para o silenciamento do gene *PDS* em tomate, 20 °C, 22 °C e 25 °C, Jiang et al. (2008) obtiveram a maior porcentagem de plantas com o fenótipo do fotobranqueamento, e em menor tempo, dez dias, usando a temperatura de 22 °C para cultivar as plantas após terem sido submetidas a VIGS. Ambas as temperaturas, mais baixas ou altas, ocasionaram uma redução da eficiência do silenciamento e estenderam o tempo para a visualização do sintoma de fotobranqueamento.

Tal constatação sugere que a movimentação e replicação viral é fortemente afetada por mudanças relativamente pequenas de temperatura. Talvez a temperatura de 18 °C tenha contribuído para melhorar a eficiência da técnica VIGS em gérbera. No entanto sugere-se que mais estudos sejam realizados para melhor avaliar a influência desta na eficiência da VIGS em gérbera, pois é necessário definir a temperatura que proporcione o melhor equilíbrio entre o crescimento e desenvolvimento vegetal e a movimentação e replicação viral. Tal equilíbrio entre planta e vírus é de extrema importância, pois se a temperatura favorece somente a planta e o vírus não tem uma replicação eficiente, e consequentemente ocorrerá a ausência ou um baixo silenciamento. Já, se a temperatura favorece somente o vírus, este se replicará de forma tão acelerada que poderá ocasionar danos à planta.

O experimento realizado permitiu que o objetivo, de avaliar o uso da VIGS utilizando o vetor viral, fosse atingido, apesar não ter se tido o sucesso esperado. No entanto, os dados aqui obtidos, e questionamentos levantados para o desenvolvimento de novos

experimentos visando a otimização desta técnica para a utilização em gérbera favorecerá a realização de estudos tanto da expressão de genes nesta espécie, permitindo um melhor entendimento dos processos metabólicos, bem como na identificação de genes, como por exemplo os relacionados à senescência floral.

CONCLUSÃO

É possível utilizar o vetor viral TRV para VIGS em gérbera, no entanto, são necessários mais estudos avaliando os diferentes fatores, genótipo, temperatura, tempo e número de repetições de inoculação, ou até mesmo a utilização de um outro vetor viral, de forma a aprimorar a técnica para se ter um silenciamento mais efetivo.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de sementes de gérbera tanto por fecundação cruzada quanto por autofecundação (geitonogamia), em acessos coletados e em cultivares, permite que seja realizado o processo de melhoramento entre estas, gerando variabilidade e também a transferências de características adaptativas que os acessos coletados possuem, visto que estes vem sendo selecionados pelo ambiente por um longo período.

A dificuldade na obtenção de sementes relatada na literatura também foi encontrada neste estudo. Nos experimentos constatou-se que há fatores ambientais, entre eles a temperatura, influenciando na produção de sementes, os quais precisam ser melhor investigado para se otimizar a produção de sementes permitindo a realização de estudos mais precisos de herança de caracteres.

A longevidade pós-colheita é uma das uma das características mais importantes de ornamentais, depois dos caracteres morfológicos e coloração, pois permite reduzir as perdas durante a distribuição, contribuindo para que o consumidor tenha flores com uma maior vida de vaso. No presente estudo buscando identificar genes relacionados ao processo de senescência floral em gérbera, foram identificados 13 genes que possivelmente estejam envolvidos com o processo de senescência floral de gérbera, destes, o Ger protease, Ger B-gal, Ger Cys prot, Ger WD, e SAG gene Cyp Ipomea, são promissores para futuros estudos por já terem sido relatados em outras espécies como envolvidos no processo de senescência. No entanto tais genes precisam agora ser avaliados num maior número de cultivares, e

através de PCR quantitativo para se confirmar tal hipótese. A obtenção de tal informação permitirá que estudos sejam realizados para compreender o processo de senescência floral contribuindo tanto para o desenvolvimento de produtos que inibam o processo de senescência, quanto para o desenvolvimento, pela engenharia genética, de cultivares mais longevas.

A metodologia VIGS pode ser utilizada em gérbera, no entanto necessita ser otimizada para se obter um silenciamento mais efetivo. A importância da otimização de tal técnica justifica-se pelo fato desta permitir a avaliação do fenótipo de silenciamento num curto período de tempo, geralmente inferior a 30 dias. Esta rapidez, não é possível processo de transformação genética via *Agrobacterium*, devido a necessidade de indução de calos e regeneração de plantas transformadas, que é em torno de 3 meses, além de a frequência de transformação ser de 50-58% (NAGARAJU et al., 1998). Outro ponto positivo para a VIGS é que pode ser avaliada diretamente na planta adulta, facilitando por exemplo o estudo de caracteres relacionados ao capítulo. Apesar de todas estas vantagens, a VIGS é apenas uma técnica que permite identificação de genes relacionado a determinada função ou caractere, não descartando o uso da engenharia genética para obtenção de plantas transformadas para carregar determinado gene ou silenciá-lo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBINK, T. E.; PEART, J. R.; MOS, T. N.; BAULCOMBE, D. C.; BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology*, v. 295, p. 307–319, 2002.

ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; VAN STADEN, J. Approaches to improve seed production of *Jatropha curcas* L. *SAJB Annual Meeting Abstracts*, v. 74, 2008. Doi: 10.1016/j.sajb.2008.01.023

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. B. *Biologia molecular da célula*. 3a. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ASCHER, P. D. Self-incompatibility systems in floriculture crops. *Acta Horticultura*, Minnesota, v. 63, p. 205-215, 1976.

ASHMAN, T. L. et al. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, v. 85, p. 2408-2421, 2004.

ASSAD, E. D.; MARIN, F. R.; EVANGELISTA, S. R.; PILAU, F. G.; FARIAS, J. R. B.; PINTO, H. S.; JÚNIOR, J. Z. Forecast system of soybean crop yield for Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 5, p. 615-625, 2007.

BALL, V. (ed.). *Ball red book*. 16ed. Batavia: Ball Publishing, 1998. 802p.

BARROSO, G. M. 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Vol. 3. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária. 386p.

BASSET, D. E., EISEN, M. B., BOGUSKI, M. S. Gene expression informatics-it's all in your mine. *Nature Genetics Supplement*, v. 21, p. 51-55, 1999.

BAULCOMBE, D. C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinon in Plant Biology*, v.2, p.109–113, 1999.

BAULCOMBE, D. C. RNA silencing in plants. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 356-363, 2004.

BEERS, E. P.; WOFFENDEN, B. J.; ZHAO, C. S. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 44, p. 399–415, 2000.

BELLÉ, S. *Sistemas de irrigação e concentrações de adubação complementar na produção de Gerbera jamesonii cv. 1187 em vaso*. 1998. 122p. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

BENITO, E. P.; PRINS, T.; VAN KAN, J. A. L. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.32, p.937-947, 1996.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. *Nucleic Acids Research*. v. 36, 2008. (Database issue): D25–D30. Doi:10.1093/nar/gkm929.PMCID: PMC2238942

BIELESKI, R. L. & REID, M. S. Physiological changes accompanying senescence in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiology*, v. 98, p. 1042-1049, 1992.

BOURQUE, J. E. Antisense strategies for genetic manipulation in plants. *Plant Science*, v.105, p. 125–149, 1995.

BOSA, N. *Otimização no enraizamento de plantas de Gypsophila paniculata propaganda in vitro*. 2002. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2002.

BREEZE, E.; WAGSTAFF, C.; HARRISON, E.; BRAMKE, I.; ROGERS, H.; STEAD, A.; THOMAS, B.; BUCHANNAM-WOLLASTON, V. Gene expression patterns to define stages of post-harvest senescence in *Alstroemeria* petals. *Plant Biotechnology Journal*, v. 2, p. 155-168, 2004.

BRIGNETI, G.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; JIN, H.; CHEN, J.; BAULCOMBE, D. C.; BAKER, B.; JONES, J. D. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal* . v. 39, p. 264–272, 2004.

BRUNINI, O.; BERNARDI, J. B., FORNAISER, J. B. Temperatura-base para alface cultivar “White Boston”, em um sistema de unidades térmicas. *Bragantia*, Campinas, v.35, n. 19, 1976.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, v. 4, p. 14, 2004.

BURCH-SMITH, T. M.; ANDERSON, J. C.; MARTIN, G. B.; DINESH-KUMAR, S. P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, v. 39, n. 5, p. 734-746, 2004.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. *Compostas: Tribo mutisieae*. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense S.A., 1973. (Flora Ilustrada Catarinense).

CARDOSO, R. D. L. 2007. Caracterização morfológica e citológica de gérbera: subsídios para o melhoramento genético. 2007. 172p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

CARDOSO, R. D. L., SCHEFFER-BASSO, S. M., GRANDO, M. F. Divergência Genética em Gérbera com Base em Marcadores Morfológicos. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.5, supl. 1, p. 462-464, jul. 2007.

CARDOSO, R. D. L. ; GRANDO, M. F. ; SCHEFFER-BASSO, S. M.; SEGEREN, M. I. ; AUGUSTIN, L. ; SUZIN, M. . Caracterização citogenética, viabilidade de pólen e hibridação artificial em gérbera. *Horticultura Brasileira*, v. 27, p. 40-44, 2009.

CASTIGLIONI, V. B. R.; OLIVEIRA, M. F.de. Hibridação em girassol. IN: BORÉM, A. Hibridação artificial de plantas. Viçosa: UVF, p.295-306, 1999.

CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. C. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal*, v.2, p. 549–557, 1992.

CHEN, W. Q. et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, v. 14, p. 559–574, 2002.

CHEN, J. J.; JIANG, C. Z.;GOOKIN, T.; HUNTER, D.; CLARK, D.; REID, M. S. Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Molecular Biology*, v. 55, p.521-530, 2004.

CHUNG, Y.; KIM, H.; KIM, K.; PARK, S.; Y. I, Y.; LEE, J.; KWON, O. Morphological characteristics and genetic variation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort). *Journal of Plant Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 145-149, 2001.

CHUNG, E.; SEONG, E; KIN, Y. C.; CHUNG, E. J.; OH, S. K.; LEE, S.; PARL, J. M.; JOUNG, Y. H.; CHOI, D. A method of high frequency virus-induced gene silencing in chilli pepper (*Capsicum annum* L. cv. Bukang). *Molecular Cells*, v. 17, p. 377-380, 2004.

CONSTANTIN, G.D.; KRATH, B.N.; MACFARLANE, S.A.; NICOLAISEN, M.; JOHANSEN, E. & LUND, O.S. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal*, v. 40, p. 622-631, 2004.

COLL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCIA, B.T. & TAMES, R. S. *Fisiología vegetal*. Madri: Ediciones Pirâmide S.A, 1995, p. 608-617.

CORDEIRO, M.C.R. *Engenharia genética: conceitos básicos, fermentas e aplicações*. Plantina: Embrapa Cerrados, 2003. 43p.

CRUZ, C.D.; SEDIYAMA, C.S. ; SEDIYAMA, T. Capacidade combinatória e efeitos recíprocos de alguns caracteres em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Ceres*, v.34, n.194, p.432-439, 1987.

CRUZ, C.D. ; REGAZZI, A.J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa : Editora UFV, 1997. 390p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3.ed. Viçosa: UFV, 2004. 480p.

DENG, X. 2007. *Gene silencing induced by RNAi 16K gene mutants of Tobacco rattle virus on Nicotiana benthamiana*. 2007. 69p. Master's thesis. Department of Applied Biology, University of Helsinki, Finland, 2007.

DENG, X.; HYTONEN, T.; VALKONEN, J.P.T.; ELOMAA, P.; TEERI, T. Application of Tobacco rattle virus-based gene silencing in *Gerbera hybrida*. In: Plant Biology 2011, *Abstracts...*Minneapolis, 2011. Disponível em: <http://abstracts.aspb.org/pb2011/public/P01/P01042.html>. Acesso em out., 2011.

DRENNAN, D.; HARDING, J.; BYRNE, T.G. Heritability of inflorescence and floret traits in gerbera. *Euphytica*, Netherlands, v. 35, p. 319-330, 1986.

EASON, J.R.; RYAN, D.J.; PINKNEY, T.T.; O'DONOGUE, E.M. Programmed cell death during flower senescence: Isolation and characterization of cysteine proteinases from *Sandersonia aurantiaca*. *Funct. Plant Biology*, v. 29, p. 1055-1064, 2002.

EBI – EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. *Gene expression*. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?requestFrom=searchBox&db=allebi&query=function+WD&FormsButton3=Find>. Acesso em: 16 jan. 2012.

ELOMAA, P.; HONKANEN, J.; PUSKA, R.; SEPPANEN, P.; HELARIUTTA, Y.; MEHT, M.; KOTILAINEN, M.; NEVALAINEN, L.; TEERI, T.H. *Agrobacterium*- Mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Biotechnology*, v. 11, p. 508-511, abr. 1993.

ELOMAA, P.; TEERI, T.H. Transgenic gerbera. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic crops III*. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH and Co. KG, v. 48, 2001. p.139-154.

FARNHAM, D.S.; REID, M.S. & FUJINO, D.W. Shattering of snapdragons - effects of silver thiosulfate and ethephon. *Acta Horticulturae*, v. 26, p. 39-43, 1981.

FERREIRA FILHO, A.W.P. 1982. *Mecanismos de seleção e seus efeitos em populações de trigo com diferentes níveis de segregação*. 1982, 135p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.

FRANKEL, R.; GALUN, E. *Pollination mechanisms, reproduction, and plant breeding*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1977.

FILLIETTAZ, A. Melhoramento genético de plantas ornamentais. *Biológico*, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 95, 2007.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, p. 806–811, 1998.

FOFANA, I.B.; SANGARE, A.; COLLIER, R.; TAYLOR, C.; FAUQUET, C. M. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology*, v. 56, n. 4, p. 613-624, 2004.

GARDNER, C.O. ; EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. *Biometrics*, v. 22, p. 439-452, 1966.

GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the “vascular highway”? *Trends Plant Science*, v. 1, p. 260–268, 1996.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, v.30, p.503-512, 2002.

GODGE, M.R.; PURKAYASTHA, A.; DASGUPTA, I.; KUMAR, P.P. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Report*, v. 27, p. 209–219, 2008.

GOSSELE, V.; FACHE, I.; MEULEWAETER, F.; CORNELISSEN, M.; METZLAFF, M. SVISS - a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant Journal*, v. 32, p. 859–866, 2002.

GOULD, B.; KRAMER, E. M. Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods*, v. 3, n. 6, 2007 (doi:10.1186/1746-4811-3-6).

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences*, v.9, p. 462-493, 1956.

GUERRERO, C.; DE LA CALLE, M.; REID, M.S.; VALPUESTA, V. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Heimerocallis* spp.) during flower senescence. *Plant Molecular Biology*, Belgium, v. 36, p. 565-571, 1998.

GUISELINI, C. *Microclima e produção de gébera em ambientes protegidos com diferentes tipos de cobertura*. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- ESALQ, USP, Piracicaba, 2002.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *Par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, v. 81, p.611–620, 1995.

HAN, T.; LEE, J. Prospect of molecular markers for the breeding of ornamentals: a case study on alstroemeria. *J. Kor. Flower Res. Soc.*, Korea, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2002.

HANSEN, H.V. A taxonomic revision of the genus *Gerbera* (Compositae, Mutisieae) sections *Gerbera*, *Parva*, *Piloselloides* (in Africa), and *Lasiopus*. *Opera Boany.*, v.78, p.1-36, 1985.

HANSEN, H.V. A story of the cultivated *Gerbera*. *The New Plantsman*, v.6, p.85-95, 1999.

HELARIUTTA, Y., ELOMAA, P., KOTILAINEN, M., SEPPÄNEN, P.; TEERI, T.H. Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. *Regina* (Compositae). *Plant Molecular Biology*, Belgium, v. 22, p. 183–193, 1993.

HÖFTE, H., DESPREZ, T., AMSELEM, J., CHIAPELLO, H., CABOCHE, M., MOISON, A., JOUJON, M.F., CHARPENTAEU, J.L., BERTHOMIEU, P., GUERRIER, D., GIRAUDAT, J., QUIGLEY, F., THOMAS, T., YU, D.Y., MACHE, ., RAYNAL, M., COOKE, R., GRELLET, F., DELSENY, M., PAMENTIER, Y., MARCILLAC, G., GIGOT, C., FLECK, J., PHILIPPS, G., AXELOS, M., BARDET, C., TREMOUSAYGUE, D., LESCURE, B. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v.4, p.1051-1061, 1993.

HUANG, H.; HARDING, J.; BYRNE, T.; FAMULA, T. The effects of inbreeding on cut-flower yield in gerbera. *Euphytica*, Netherlands, v.81, p.157-161, 1995.

HUNTER, D.A.; STEELE, B.C.; REID, M.S. Identification of genes associated with perianth senescence in daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* L. 'Dutch Master'). *Plant Science*, v.163, p. 13–21, 2002.

HUNTER, D.A., YI, M.F.; XU, X.; REID, M.S. Role of ethylene in perianth senescence of Daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* L. 'Dutch Master'). *Postharvest Bioogy Technology*, v. 32, p.269-280, 2004.

INFOAGRO. *El cultivo de la gerbera*. Disponível em: <www.infoagro.com>. Acesso em: 18 jun. 2011.

JEONG, R.D.; HWANG, S.H.; KANG, S.H.; SHOI, H.S.; PARK, J.W.; KIM, H. Virus-induced gene silencing as tool for functional genomics in a *Glycine max*. *Plant Pathology Journal*, v.21, n. 2, p. 158-163, 2005.

JIANG, C.-Z.; CHEN, J.C.; REID, M.S.; CLARK, D.G. Functional analysis of genes associated with flower senescence. *Acta Horticulturae*, v. 682, p. 795-800, 2005.

JIANG, C.-Z., LU, F.; IMSABAI, W.; MEIR, S.; REID, M. Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 4, p. 973-979, 2008

JIANG, C.-Z.; WU, L.; MACNISH, A.J.; KING, A.; YI, M., REID, M.S. Thidiazuron, a non-metabolized cytokinin, shows promise in extending the life of potted plants. *Acta Horticulturae*, v. 847, p. 59-65, 2009.

JINKS, J. L.; HAYMAN, B. I. The analysis of diallel crosses. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Columbia, v. 27, p. 48-54, 1953.

JONES, M.L.; LARSEN, P.B.; WOODSON, W.R. Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence. *Plant Molecular Biology*, v. 28, p. 505-512, 1995.

JONES, M.L.; CHAFFIN, G.S.; EASON, J.R.; CLARK, D.G. Ethylene sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in petunia corollas. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 2733-2744, 2005.

KIYUNA, I.; FREITAS, S. M.; CARMARGO, M. L. B. Comércio exterior brasileiro de flores e plantas ornamentais. *Informações econômicas*. São Paulo, v. 33, n. 6, p. 50-61, 2003.

KJEMTRUP, S.; SAMPSON, K.S.; PEELE, C.; NGUYEN, L.; CONKLING, M.; THOMPSON, W. & ROBERSON, D. Gene

silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v. 14, p. 91-100, 1998.

KLEIN D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, p. 257-260, 2002.

KLOSS, W.E.; GEORGE, C.G.; SORGE, L.K. Inheritance of the flowers types of *Gerbera hybrida*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 129, p. 802-810, 2004.

KLOSS, W.E.; GEORGE, C.G.; SORGE, L.K. Inheritance of powdery mildew resistance and leaf macrohair density in *Gerbera hybrida*. *HortScience*, v. 40, p. 1246-1251, 2005a.

KLOSS, W.E.; GEORGE, C.G.; SORGE, L.K. Dark disk color in the flower of *Gerbera hybrida* is determined by a dominant gene, Dc. *HortScience*, v. 40, p.1992-1994, 2005b.

KNIGHT, T.M., STEETS, J.A., VAMOSI, J.C., MAZER, S.J., BURD, M., CAMPBELL, D.R., DUDASH, M.R., JOHNSTON, M.O., MITCHELL, R.J. & ASHMAN, T. Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, v. 36, p.467-497, 2005.

KOTILAINEN, M., ALBERT, V.A., ELOMAA, P., HELARIUTTA, Y., KOSKELA, S., MEHTO, M., PÖLLÄNEN, E., UIMARI, A., YU, D., TEERI, T.H. Flower development and secondary metabolism in *Gerbera hybrida*, an Asteraceae. *FNL*, v.28, p. 20-31, 1999.

KREUZER, H; MASSEY,A. *Engenharia genética e biotecnologia*. 2ed. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga...[et al.]. Porto Alegre: Artmed, 2002.

KUO, W. P.; JENSSEN, T-K.; BUTTE, A. J.; OHNO-MACHADO, L.; KOHANE, I. S. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics*, v. 18, p. 405–412, 2002.

KUMAGAI, M.H.; DONSON, J.; DELLA-CIOPPA, G.; HARVEY, D.; HANLEY, K.; GRILL, L.K. Cytoplasmatic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, v. 92, n. 5, p. 1679-1683, 1995.

LAITINEN, R.; IMMANEN, J.; AUVINEN, P. ; RUDD, S., ALATO, E. ; PAULIN, L. ; AINASOJA, M. ; KOTILAINEN, M. ; KOSKELA, S. ; TEERI, T.H.; ELOMAA, P. Analysis of the floral transcriptome uncovers new regulators of organ determination and gene families related to flower organ differentiation in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Genome Research*, v. 15, p. 475-486, 2005.

LAITINEN, R. 2006. *The Gerbera cDNA Microarray: A Tool for Large-Scale Identification of Genes Involved in Flower Development*. 2006. 76p. Academic Dissertation. Department of Applied Biology and Department of Biological and Environmental Science, University of Helsinki, Finland, 2006.

LAITINEN, R.A.E.; PÖLLÄNEN, E.; TEERI, T.H.; ELOMAA, P. ; KOTILAINEN, M. Transcriptional analysis of petal organogenesis in *Gerbera hybrida*. *Planta*, v. 226, p. 347-360, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L., COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Darvier, 2002.

LIN, N.; WANG, H.; LI, D.; BLACKMORE, S. Pollen morphology of eight genera of the subtribe *Mutisiinae* Less. sensu Bremer (Compositae) from Asia. *Journal of Integrative Plant Biology* (Formerly *Acta Botanica Sinica*), v. 47, n. 9, p. 1036-1046, 2005.

LIU, Y.; SCHIFF, M. and DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, v. 31, n. 6, p. 777-786, 2002.

LORENCETTI, C.; CARVALHO, F.I.F.; BENIN, G.; MARCHIORO, V.S.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, J.A.G.; HARTWIG, I.; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P. Capacidade combinatória e heterose em cruzamento dialélico de aveia (*Avena sativa* L.). *Revista Brasileira de Agrociência*, v.11, p. 143-148, 2005.

LU, R.; MALCUIT, U.; MOFFETT, P.; RUIZ, M.T.; PEART, J.; WU, A.J.; RATHJEN, J. P.; BENDAHMANE, A.; DAY, L.; BAULCOMBE, D.C. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease. *EMBO Journal*, v.22, p. 5690-5699, 2003.

MACNISH, A.J.; THEIJE, A.; REID, M.S.; JIANG, C.-Z. An alternative postharvest handling strategy for cut flowers- dry handling after harvest. *Acta Horticulturae*, v. 847, p. 215-221, 2009.

MACNISH, A.J.; JIANG, C.-Z.; REID, M.S. Treatment with Thidiazuron Improves Opening and Vase Life of Iris Flowers. *Postharvest Biology and Technology*, v. 56, p. 77-84, 2010.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; BINNECK, E.; PESKE, S.T. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 07-13, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. *Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de Gerbera*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 16 jun. 2011.

MARIA, C.; CHIS, L. Breeding of *Gerbera hybrida* at the fruit research station cluj. *Buletin USAMV-CN*, v. 63, 2006. Disponível em: <<http://journals.gotea.org/horticulture/article/viewPDFinterstitial/1723/1690>>. Acesso em: 06 jan. 2009.

MEYERS, B. C.; GALBRAITH, D. W.; NELSON, T.; AGRAWAL, V. Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. *Plant Physiology*, v. 135, p. 637-652, 2004.

MIYOSHI, K.; ASAKURA, N. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Report*, v. 16, p. 1-5, 1996.

MORENO, J.A. *Clima do Rio Grande do Sul*. Secção de Geografia. Secretaria da Agricultura. Porto Alegre, 1961. 42p.

NAGARAJU, V.; SRINIVAS, G.S.L.; LAKSHMI SITA, G. Agrobacterium-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida*. *Current Science*, v. 74, n.7, p. 630-633, 1998.

NAKATSUKA, T.; ABE, Y.; KAKIZAKI, Y.; YAMAMURA, S.; NISHIIHARA, M. Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant Cell Report*, v. 26, n. 1951-1959, 2007.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, p. 279-289, 1990.

NEER, E.J.; SCHMIDT, C.J.; NAMBU DRIPAD, R.; SMITH, T.F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, v. 371, p. 297-300, 1994.

NICHOLS, R. Ethylene production during senescence of flowers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 41, p. 279-290, 1966.

NIELSEN, H. B.; WERNERSSON, R.; KNUDSEN, S. Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. *Nucleic Acids Research*, v. 31, p. 3491-3496, 2003.

NOGUEIRA, M.L.; PACCA, C. Interferência de RNA em flavivírus: a experiência com febre amarela. *Biológico*, São Paulo, v.70, n.2, p.61-62, 2008.

NONNECKE, G.R. & GLADON, R.J. Postharvest handling for the Bramble Grower with a smaller number of acres. In: *Nabga Conference proceedings*, Orlando, p. 65-70, 1995.

OMETTO, J. C. *Bioclimatologia vegetal*. São Paulo: Agronômica Ceres 1981. 440p.

OTTAVIANO, E.; SCHIVA, T.; SARI-GORLA, M. Analisi multivariata per lo studio delle differenze genetiche in popolazioni di *Gerbera jamesonii*. *Genetica agricola*, v. 28, p. 292-306, 1974.

PAK, P.; van DOORN, W.G. Delay of *Iris* senescence by protease inhibitors. *New Phytologist*, v. 165, p. 473-480, 2005.

PEREIRA et al. *Agrometeorologia: fundamentos e aplicações*. Guaíba: Agropecuária, 2002. p.121).

PETRY, C.; BELLÉ, S. Situação da Floricultura. 2000. In: PETRY, C. (coord.). *Plantas Ornamentais – aspectos para a produção*. EDIUPF, Passo Fundo, 155p.

RAJU, A.J.S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Current Science*, v. 13, p. 1395–1398, 2002.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J. de O. *Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro*. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

RATCLIFF, F.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; BAULCOMBE, D.C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*, v. 25, p. 237-245, 2001.

REID, M. & WU, M.J. Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regulation*, v. 11, p. 37-43, 1992.

REID, M. *Gerbera, Transvaal Daisy: recommendations for maintaining postharvest quality*. *Postharvest Technology Research & Information Center*. Davis: University of California, 2004.

REID, M.; CHEN, J.C.; JIANG, C.Z. Virus-induced Gene Silencing for Functional Characterization of Genes in *Petunia*. In: GERATS, T.; STROMMER, J (eds). *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiology Genetics*. Netherlands: Springer Science+Business Media B.V., 2009, p.381-394.

REISDÖRFER, A. F. Flores e plantas ornamentais: um mercado em expansão. *Conselho em revista*, Porto Alegre, v.23, p. 11-13, jul. 2006.

RENSINK, W. A.; BUELL, C. R. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science* 10, 603–609. levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiology*, v. 98, p. 626–631, 2005.

REYNOIRD, J.; CHRIQUI, P.; NOIN, M.; BROWN, S.; MARIE, D. Plant regeneration from in vitro leaf culture of several gerbera species. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 33, p. 203-210, 1993.

ROBERTSON, D. VIGS Vectors for Gene Silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 495-519, 2004.

ROGERS, M.N.; TJIA, B.O. *Gerbera production for cut flowers and pot plants*. Timber Press, Portland, Ore., 1990.

RUAN, Y., GILMORE, J., CONNER, T. Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *The Plant Journal*, v. 15, n. 6, p. 821-833, 1998.

RYU, C.M.; ANAND, A.; KANG, L.; MYSORE, K.S. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous* species. *Plant Journal*, v. 40, n. 2, p. 322–331, 2004.

RUIZ, F.; VAVSSIE, L.; KLOTZ, C.; SPERLING, L. and MADEDDU, L. Homology dependent gene silencing in *Paramecium*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 9, n. 4, p. 931-943, 1998.

RYU, C.M.; ANAND, A.; KANG, L.; MYSORE, K.S. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous* species. *Plant Journal*, v. 40, p. 322-331, 2004.

SANE, A.; GOWDA, J.V.N. 2005. Characterization of gerbera (*Gerbera jamesonii*) genotypes using morphological characters.

Disponível em <<http://www.fao.org>> Acessado em 5 de dezembro de 2005.

SHAO, Y.; ZHU, H.; TIAN, H.; WANG, X.; LIN, X.; ZHU, B.; XIE, Y.; LUO, Y. Virus-induced gene silencing in plant species. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 55, n. 2, p. 168-174, 2008.

SCHIVA, T. Gerbera Breeding-Preliminary evaluations of genotypes for improved populations of production. *Acta Horticulturae*, v. 63, p. 177-185, 1976.

SEREK, M.; JONES, R.B. & REID, M.S. Role of ethylene in opening and senescence of Gladiolus sp. flowers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 119, n. 5, p. 1014-1019, 1994.

SHILLO, R.; MOR, Y. & HALEVY, A.H. Prevention of flower drop in cut sweet peas and delphiniums. *Hassade*, v. 61, p. 274-276, 1980.

SOUTHWORTH, D. Exine development in *Gerbera jamesonii* (Asteraceae: Mutisieae). *American Journal of Botany*, v. 70, n.7, p. 1038-1047, 1983.

SOUZA, J.C.; MENEZES, A.C.P.; SILVA, A.F.; PAZ, C.D.; SÁ, P.G. Hibridação artificial e germinação de sementes de gérbera (*Gerbera jamesonii*) no Semi-árido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45, CONGRESSO BRAS. DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15, CONG. BRAS. DE CULTURA DE TECIDOS, 2. *Resumos...* Fortaleza: SBH (CD-ROM), 2005. p. 547.

SPARNAAIJ, L.D. Activities in floriculture plant breeding and genetics in the Netherlands. *Acta Horticulturae*, Netherlands, v. 63, p. 27-36, 1976.

SPRAGUE, G.F.; TATUM, L.A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. *Journal of the American Society of Agronomy*, v. 34, n. 10, p. 923-932, 1942.

STEAD, A.D. & MOORE, K.G. Studies on flower longevity in *Digitalis* – the role of the ethylene in corolla abscission. *Planta*, v. 157, p. 15-21, 1983.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. *Principles and procedures of statistics*. New York : McGraw-Hill, 1980. 633 p.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. *Journal of Biotechnology*, v.76, p. 1-31, 2000.

STIMART, D.P.; BROWN, D.J. & SOLOMONS, T. Development of flowers and changes in carbon dioxide, ethylene, and various sugars of cut *Zinnia elegans*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 108, p. 651-655, 1983.

SUGAWARA, H.; SHIBUYA, K.; YOSHIOKA, T.; HASHIBA, T.; SATOH, S. Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 407-413, 2002.

TEERI, H.T.; ELOMAA, P.; KOTILAINEN, M.; ALBERT, V. Mining plant diversity: *Gerbera* as a model system for plant development and biosynthetic research. *BioEssays*, v. 28, p. 756–767, 2006.

TYRACH, A.; HORN, W. Inheritance of flower colour and flavonoid pigmentos in *Gerbera*. *Plant Breeding*, Berlin, v. 166, p. 377-381, 1997.

TOURJEE, K.; HARDING, J.; BYRNE, G. Complex segregation analysis of *Gerbera* flower colour. *Heredity*, v. 74, p. 303-310, 1995.

TROBACHER, C.P.; SENATORE, A.; GREENWOOD, J.S. Masterminds or minions? Cysteine proteinases in plant programmed cell death. *Canadian Journal of Botany*, v. 84, p. 651–667, 2006.

TURNAGE, M.A.; MUANGSAN, N.; PEELE, C.G., ROBERSON, D. Genimivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 30, p. 107-117, 2002.

UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing Method. *International Journal of Plant Genomics*, v. 2009, 2009. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijpg/2009/198680/cta/>

VALENTINE, T.; SHAW, J.; BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; OPARKA, K.J.; LACOMME, C. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiology*, v. 136, p. 3999–4009, 2004.

VALPUESTA, V.; LANGE, N.E.; GUERRERO, C.; REID, M.S. Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Heimerocallis*) flowers. *Plant Molecular Biology*, Belgium, v. 28, p. 575-582, 1995.

VAN DER KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, v. 2, p. 291-299, 1990.

VAN DOORN, W.G.; WOLTERING, E.J. Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 453-480, 2008.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Pós-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, v.114, 308-309, 2001.

VIDAL, M.S. Estratégias para obtenção de resistência a viroses vegetais. Documentos 107. 26p. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPA/16630/1/DOC107.PDF>. Acesso em: 10 de jun. 2010.

WAGSTAFF, C.; LEVERENTZ, M.K.; GRIFFITHS, G.; THOMAS, B.; CHANASUT, U.; STEAD, A.D.; ROGERS, H.J. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 233-240, 2002.

WALL, S. J.; EDWARDS, D. R. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RTPCRs. *Annals of Biochemistry*, v. 300, p. 269–273, 2002.

WANG, C.; CAI, X.; WANG, X.; ZHENG, Z. Optimisation of tobacco rattle virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology*, v. 33, p. 347–355, 2006.

WARINGTON, I.J.; KANEMASU, E.T. Corn growth response to temperature and photoperiod, 1, seedling emergence, tassel initiation and anthesis. *Agronomy Journal*. Madson, v. 75, p. 154-180, 1983.

WHITEHEAD, C.S.; HALEVY, A.H. & REID, M.S. Roles of ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in pollination and wound-induced senescence of *Petunia hybrida* flowers. *Physiologia plantarum*, v. 61, p. 643-648, 1984.

WODEHOUSE, R.P. Pollen grains in the identification and classification of plants. IV. The Mutisieae. *American Journal of Botany*, v. 16, p. 297-313, 1929.

WOLTERING, E.J.; TEN HAVE, A.; LARSEN, P.B. & WOODSON, W.R. Ethylene biosynthetic genes and inter-organ signaling during flower senescence. *Society for Experimental Biology Seminar: Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*, v. 55, p. 285-307, 1994.

WOODSON, W.R.; HANCHEY, S.H. & CHISHOLM, D.N. Role of ethylene in the senescence of isolated *Hibiscus* petals. *Plant Physiology*, v. 79, p. 679-683, 1985.

XIE, G.; BONNER, C.A.; SONG, J.; KEYHANI, N.O.; JENSEN, R.A. Inter-genomic displacement via lateral gene transfer of bacterial trp operons in an overall context of vertical genealogy. *BMC Biology*, v. 2, n. 15, 2004. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/2/15> Acesso em: maio de 2011.

XU, X.; GOOKIN, T.; JIANG, C.-Z., REID, M. Genes associated with opening and senescence of *Mirabilis jalapa* flowers. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 8, p. 2193-2201, 2007a.

XU, X.; JIANG, C.-Z., DONNELLY, L.; REID, M. Functional analysis of a RING domain ankyrin repeat protein that is highly expressed during flower senescence. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 13, p. 3623-3630, 2007b.

YACONI, D.V. O mundo das gérberras: melhoramento e criação de novas variedades. *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*, Lisboa, n.92, p. 9-12, 2008.

YAMAMOTO, K., SASAKI, T.L. Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Molecular Biology*, v.35, p. 135-144, 1997.

YU, Y.; BYRNE, T.; HARDING, J. Quantitative genetic analysis of flowering time in the Davis Population of gerbera. I. Components of genetic variance and heritability. *Euphytica*, Netherlands, v. 53, p. 19-23, 1991.

YU, D., KOTILAINEN, M., PÖLLÄNEN, E., ELOMAA, P., HELARIUTTA, Y., ALBERT, V.A., TEERI, T.H. Organ identify genes and modified patterns of flower development in Gerbera hybrida (Asteraceae). *Plant Journal*, v. 17, p.51-62, 1999.

ZAHA, A. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003

ZAPATA, T.R; ARROYO, M.T.K. Plant Reproductive Ecology of a secondary Deciduous Tropical Forest in Venezuela. *Biotropica*, v.10, n. 3, p. 221-230, 1978.

ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. de. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.13, p.191-244, 2005.