

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E  
CITOLÓGICA DE GÉRBERA: SUBSÍDIO PARA O  
MELHORAMENTO GENÉTICO**

**RAQUEL DALLA LANA CARDOSO**

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

Passo Fundo, outubro de 2007.

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E  
CITOLÓGICA DE GÉRBERA: SUBSÍDIO PARA O  
MELHORAMENTO GENÉTICO**

**RAQUEL DALLA LANA CARDOSO**

**Orientadora: PhD. Magali Ferrari Grando**

**Co-orientadora: Dra. Simone Meredith Scheffer-Basso**

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

Passo Fundo, outubro de 2007.



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 Dissertação.

“Caracterização morfológica e citológica de gérbera: subsídio para o melhoramento genético”

Elaborada por

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO

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

Aprovada em: 05/10/2007  
Pela Comissão Examinadora

  
Dra. Magali Ferrari Grando  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora

  
Dr. Pedro A. Varella Escosteguy  
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

  
Dra. Simone Meredith Scheffer-Basso  
Co-orientadora  
UPF

  
Dr. Mauro Antonio Rizzardi  
Diretor FAMV

  
Dra. Cláudia Petry  
UPF

  
Dra. Monique Inês Seregen  
Empresa Proclone Biotecnologia Ltda

## AGRADECIMENTOS

Às professoras Ph.D. Magali Ferrari Grando e Dr<sup>a</sup>. Simone Meredith Scheffer-Basso, pela orientação, confiança, incentivo, ensinamentos, profissionalismo e amizade demonstrada ao longo do curso, e por terem aceito o desafio de estudar uma planta não tão comum em nosso meio acadêmico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela possibilidade de realização do Curso de Mestrado e deste trabalho.

À Universidade de Passo Fundo e ao Centro Nacional de Pesquisa de Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), pela disponibilização de infra-estrutura para a realização deste trabalho.

Aos professores do curso pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição na construção do conhecimento.

Aos colegas do curso, em especial a colega e amiga Aline Rizzardi, pela amizade, colaboração, convivência e apoio.

À Marilei Suzin pela amizade, cooperação e auxílio.

À professora Lizete Augustin pela amizade, apoio e incentivo.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal Clarício, Abrelino e Marizete pela amizade, incentivo e auxílio nos experimentos.

As alunas do Curso de Ciências Biológicas Paula Astolfi, Caroline Chitolina e Carla Kurle pela dedicação e colaboração nos trabalhos.

À Dra. Monique Inês Segeren, da empresa ProClone, pela cedência do material vegetal utilizado e incentivo.

Aos meus pais Cladimir e Eliane, meus avós e familiares por acreditarem na minha capacidade, pela compreensão e esforços

despendidos durante a realização do curso e por me incentivarem a concluir este trabalho, minha eterna gratidão.

À família Moreira que me acolheu com carinho e paciência e me incentivou em todos os momentos.

Ao meu marido Ricardo Moreira pelo companheirismo, amor, incentivo e paciência, compartilhando todos os momentos alegres e difíceis no decorrer do curso.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

E, principalmente, a DEUS, pela vida, saúde, família, força, coragem, persistência, oportunidades e por me fortalecer nos momentos difíceis.

## SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas .....	viii
Lista de figuras .....	x
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
1 INTRODUÇÃO .....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2.1 Origem e classificação taxonômica .....	9
2.2 Aspectos morfológicos .....	10
2.3 Sexualidade e sistema reprodutivo .....	16
2.4 Melhoramento vegetal .....	18
2.5 Hibridação .....	21
2.6 Caracterização e análise da diversidade genética .....	25
2.6.1 Caracterização e divergência genética através de caracteres morfológicos .....	29
2.6.2 Marcadores moleculares e diversidade genética..	31
2.7 Extração de DNA .....	39
2.7.1 Teoria subjacente aos procedimentos de extração .....	40
2.7.2 Método CTAB 2 % .....	43
2.7.3 Método Dellaporta, Woods e Hicks (1983) .....	44
2.7.4 Quantificação e controle da qualidade .....	46
 <b>CAPÍTULO I</b>	
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	53
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4 CONCLUSÕES.....	98
 <b>CAPÍTULO II</b>	
RESUMO.....	99
ABSTRACT.....	100

1 INTRODUÇÃO.....	102
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	104
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
4 CONCLUSÕES.....	113
<b>CAPÍTULO III</b>	
RESUMO.....	115
ABSTRACT.....	116
1 INTRODUÇÃO.....	118
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	119
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
4 CONCLUSÕES.....	134
<b>CAPÍTULO IV</b>	
RESUMO.....	135
ABSTRACT.....	137
1 INTRODUÇÃO.....	139
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	141
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	148
4 CONCLUSÕES.....	154
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I: Divergência genética de gérbera com base em marcadores morfológicos florais

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Denominação, procedência e características gerais dos acessos de gérbera .....	59
2	Composição química das soluções nutritivas utilizadas nas fertilizações de gérbera .....	61
3	Sigla, descrição e unidade de medida dos caracteres morfológicos avaliados nos capítulos e escapos de gérbera .....	63
4	Sigla, descrição e unidade de medida dos caracteres morfológicos avaliados nos diferentes tipos de flores de gérbera .....	65
5	Amplitude e contribuição relativa (CR) dos caracteres quantitativos para diversidade genética estimada pela distância de Malahanobis para 13 acessos de gérbera (média não padronizada) .....	78
6	Características morfológicas de acessos de gérbera com maior contribuição relativa para a divergência genética dos acessos avaliados .....	81
7	Estatísticas descritivas e contribuição relativa (CR) dos caracteres semi-quantitativos codificados para divergência genética de 13 acessos de gérbera .....	85
8	Acessos, índice de sobreposição, classificação dos capítulos pelo critério subjetivo e pelo índice de sobreposição .....	90
9	Divergências na classificação dos capítulos de gérbera .....	97

### CAPÍTULO II: Expressão sexual e sistema reprodutivo em gérbera

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Denominação, procedência e características gerais dos acessos de gérbera .....	105



**CAPÍTULO III: Caracterização citogenética, viabilidade de pólen e hibridação artificial em gérbera**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Denominação, procedência e características gerais dos acessos de gérbera .....	120
2	Composição química das soluções nutritivas utilizadas nas fertilizações de gérbera .....	122
3	Frequência de pólen viável em acessos comerciais e não comerciais de gérbera .....	128
4	Cruzamento, número de flores e número de sementes obtidas dos cruzamentos entre os progenitores femininos, cv. Terra Fame e A8 (acesso não comercial), e masculinos cv. Cariba e cv. Azteca .....	131

**CAPÍTULO IV: Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA genômico de gérbera extraído por diferentes metodologias**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Denominação, procedência e características gerais dos acessos de gérbera .....	142
2	Médias de quantidade de DNA em ng/mg de tecido obtidos nos diferentes tratamentos (T1= CTAB 1, T2 = CTAB2, T3= SDS 1 e T4 = SDS 2) e em diferentes acessos (A1= Cariba, A2 = Amazone, A4= Terra Fame E A8= Não comercial) .....	148
3	Médias da qualidade do DNA (OD260/OD280) obtidos nos diferentes tratamentos (T1= CTAB 1, T2 = CTAB2, T3 = SDS 1 e T4 = SDS 2) para os genótipos (A1= Cariba, A2= Amazone, A4= Terra Fame e A8= Não comercial) .....	149

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I: Divergência genética de gérbera com base em marcadores morfológicos florais

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Temperaturas médias externa (TME), interna (TMI) e normais regionais (TN) durante o período experimental .....	60
2	Aspecto do ambiente semi-protegido onde foram cultivados os acessos de gérbera .....	60
3	Aspecto do capítulo de gérbera em estágio comercial, com detalhe para as duas fileiras de flores do disco abertas .....	62
4	Aspecto do capítulo em vista frontal, com detalhe para a largura do conjunto das flores do raio (C6), conjunto das flores <i>trans</i> (C7), conjunto das flores do disco (C8) e do lábio superior de cinco flores do raio (C13) .....	66
5	Aspecto do capítulo em vista dorsal, com detalhe para diâmetro do capítulo floral (C4), centro da inflorescência (C5), involúcro (C9) e receptáculo (C11), altura do receptáculo (12) .....	67
6	Aspecto dorsal da flor do capítulo de gérbera, com detalhe para comprimento da corola (C32), receptáculo floral (C34), lábio superior (C35) e lábio inferior (C36), altura do pistilo (C37) e do tubo da corola (C33) .....	67
7	Capítulo de gérbera: em A largura do conjunto das flores do raio interno e em B soma da largura do conjunto das flores do raio interno e externo ...	69
8	Aspecto dos acessos comerciais (A1 Cariba, A2 Amazone, A3 Pink Elegance, A4 Terra Fame, A5 Azteca e A6 Tennessee). A1 acesso de capítulo semidobrados, A3 dobrados e A2, A4, A5 e A6 simples. Em B, diferentes tipos de flores encontrados: flor do raio (1), flor trans (2) e flor do disco (3) .....	70
9	Aspecto dos acessos não comerciais. A8, A9, A10 e A13 acessos de capítulo simples, A7	

	semidobrado e A11 e A12 dobrado. Em B, os três diferentes tipos de flores encontrados: flor do raio (1), flor trans (2) e flor do disco (3) .....	71
10	Aspecto das flores do raio dos acessos comerciais (A) e acessos não comerciais (B): óvulo (o), receptáculo floral (r), tubo da corola (t), <i>pappus</i> (pa), pistilo (pi), lábio superior (ls), lábio inferior (li) e estaminódios (e) .....	72
11	Aspecto da flor <i>trans</i> de um capítulo simples: óvulo (o), receptáculo floral (r), tubo da corola (t), <i>pappus</i> (pa), pistilo (pi), lábio superior (ls) e lábio inferior (li) .....	74
12	Aspecto da flor do disco (A): óvulo (o), receptáculo floral (r), tubo da corola (t), <i>pappus</i> (pa), lábio superior (ls), lábio inferior (li) e (a)anteras fusionadas. Em B, detalhe das anteras fusionadas retiradas para mostrar o estilete e estigma .....	75
13	Dendrograma de dissimilaridade genética entre 13 acessos de gérbera com base em caracteres quantitativos, obtido pelo método do vizinho mais próximo, baseado na matriz de Distância de Mahalanobis .....	80
14	Dendrograma de dissimilaridade genética entre 13 genótipos de gérbera com base em caracteres semi-quantitativos, obtido pelo método do vizinho mais próximo, baseado matriz de Distância Euclidiana Média .....	86
15	Dendrograma de dissimilaridade genética entre 35 acessos de gérbera com base no índice de sobreposição do conjunto das flores trans, obtido pelo método do vizinho mais distante, baseado na matriz de Distância Euclidiana Média .....	91
16	Tipos de capítulo em gérbera .....	93
17	Apenas cultivares semidobradas ou dobradas: Capítulo: largura do conjunto das flores liguladas do raio interno (A) comparado à largura do capítulo (B) .....	93
18	Comparação dos capítulos de gérbera classificados como simples pelo critério atual e	

	pele índice de sobreposição .....	94
19	Comparação dos capítulos de gérbera classificados como semidobrados pelo critério atual e pelo índice de sobreposição .....	95
20	Comparação dos capítulos de gérbera classificados como dobrados pelo critério atual e pelo índice de sobreposição .....	96

## CAPÍTULO II: Expressão sexual e sistema reprodutivo em gérbera

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Temperaturas médias externa (TME), interna (TMI) e normais regionais (TN) durante o período experimental.....	106
2	Tratamentos de isolamento de flores: T1 capítulo inteiro; T2 capítulo somente com as flores do raio; T3 capítulos somente com as flores do disco; T4 capítulos somente com as flores <i>trans</i> e T5 capítulos com somente as flores do raio e flores <i>trans</i> .....	108
3	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 superior tridentado e inferior bífido; D) flor trans, feminina, com óvulo e corola bilabiado-ligulada com lábio superior tridentado e inferior bífido e E) flor do disco, andróginas, férteis ou estéreis, com corola bilabiada .....	109
4	Aspecto dos aquênios de gérbera: em “A” aspecto dos aquênios coletados nos diferentes tratamentos de isolamento de flores; em B, sementes comerciais de gérbera híbrida .....	112

**CAPÍTULO III: Caracterização citogenética, viabilidade de pólen e hibridação artificial em gérbera**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Temperaturas médias externa (TME), interna (TMI) e normais regionais (TN) durante o período experimental .....	121
2	Aspecto do ambiente semi-protegido onde foram cultivados os acessos de gérbera .....	122
3	Acessos utilizados nos cruzamentos: A4 (Terra Fame) e A8 progenitores femininos, A5 (Azteca) e A1 (Cariba) progenitores masculinos. Em E, detalhe do estigma receptivo .....	125
4	Aspecto dos capítulos e das lâminas para contagem de cromossomos: A, B e C acessos comerciais, sendo A) simples; B) semidobrado e C) dobrado, e D, E e F acessos não comerciais, sendo D) simples; E) semidobrado e em F) dobrado .....	127
5	Aspecto das lâminas com grãos de pólen. A) Pólens viáveis (aumento 100x), B) Pólens viáveis corados e pólen não viável (aumento de 400x), C) Pólen viável e D) Pólen não viável (aumento de 1000x) .....	128
6	Aspecto do estigma sendo polinizado (A), após polinização (B) e do capítulo após a polinização (C), mostrando os estigmas escuros, sinal de fertilização .....	129
7	Aspecto das estruturas obtidas na debulhas dos acessos comerciais (B) e não comerciais (A): corola das flores do raio (a), corola das flores trans (b), flores do disco (c), escapo (d), aquênios que não desenvolveram em semente (e) e sementes (f) .....	133

**CAPÍTULO IV:** Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA genômico de *gerbera* extraído por diferentes metodologias

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Perfil eletroforético de DNA (5 µg) extraído de folhas jovens de quatro acessos de <i>Gerbera</i> (A1= Cariba, A2= Amazone, A4= Terra Fame e A8=Selvagem) submetidos a quatro métodos de extração de DNA (T1= CTAB 1, T2= CTAB2, T3 = SDS 1 e T4 = SDS 2) .....	151
2	Digestão com enzima de restrição <i>HinfI</i> (Gibco)...	152
3	Perfil eletroforético de PCR de DNA extraído do acesso A4 (Terra Fame) .....	153

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOLÓGICA DE  
GÉRBERA: SUBSÍDIO PARA O MELHORAMENTO  
GENÉTICO**

**RAQUEL DALLA LANA CARDOSO<sup>1</sup>, MAGALI FERRARI  
GRANDO <sup>2</sup> E SIMONE MEREDITH SCHEFFER-BASSO<sup>3</sup>**

RESUMO – A produção brasileira de gérbera (*Gerbera hybrida* Hort.) é inteiramente dependente da importação das mudas de empresas multinacionais, o que poderia ser reduzido com lançamento de novos híbridos competitivos no mercado. Para isso, é necessária a geração de conhecimentos básicos sobre a espécie, como: forma de reprodução, morfologia floral, polinização e, principalmente, a variabilidade genética natural existente. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de fornecer subsídios para o melhoramento de gérbera no Brasil. Treze acessos de gérbera, sendo seis cultivares (*G. hybrida*) e sete acessos não comerciais (*Gerbera* sp.) foram cultivados em ambiente semi-protégido e avaliados em quatro diferentes estudos: caracterização e divergência genética com base em marcadores morfológicos; determinação da expressão sexual e sistema reprodutivo; caracterização citogenética, viabilidade do pólen e

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do programa de Pós-Graduação em Agronomia, (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV)/ Universidade de Passo Fundo (UPF), Área de concentração em Produção Vegetal – raqueldlcardoso@bol.com.br

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, PhD., professora da FAMV/PPGAgro/UPF – magali@upf.br

<sup>3</sup> Co-orientadora, Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., professora do PPGAgro e do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UPF – sbasso@upf.br.

hibridação artificial; e eficiência de diferentes métodos de extração de DNA genômico visando o emprego de marcadores moleculares. Os dados referentes à caracterização morfológica foram submetidos à análise multivariada e de variância. Com a análise multivariada constatou-se haver variabilidade genética em gérbera a qual pode ser utilizada em programas de melhoramento. A gérbera apresenta três tipos de flores: flores do raio e trans (femininas) e as do disco (hermafroditas). A hibridação entre as cultivares e os acessos não comerciais é possível em decorrência de estes possuírem genoma compatível, o que foi constatado na caracterização citogenética ( $2n = 50$ ) e confirmado com a obtenção de sementes nos cruzamentos entre eles, e devido à percentagem média de viabilidade do pólen ser alta, 89,6%. Constatou-se não ser necessário emasculas as flores hermafroditas para fins de cruzamento e que não há indícios de apomixia nos acessos avaliados. A obtenção de DNA genômico com bom padrão qualidade e quantidade através do método CTAB 2% indica ser esta metodologia eficiente para o emprego de marcadores moleculares, objetivando acessar molecularmente a variabilidade genética em gérbera.

**Palavras-chave:** *Gerbera* sp., citogenética, descrição morfológica, divergência genética, extração de DNA, hibridização, viabilidade do pólen



**MORPHOLOGIC AND CYTOLOGICAL  
CHARACTERIZATION OF GERBERA: SUBSIDY FOR THE  
GENETIC IMPROVEMENT**

**ABSTRACT** - The Brazilian production of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) is entirely dependent of seedlings import of multinational companies, what could be reduced with the new hybrid competitive production. For that, it is necessary the development of basic knowledge about the species, such as: reproduction form, floral morphology, pollination and, mainly, evaluation of the natural genetic variability existent. This work was conducted with the objective of to furnish subsidies for the gerbera improvement in Brazil, providing to the producers new alternatives forms to the extreme dependence to the multinationals. Thirteen gerbera accesses, being six cultivars (*G. hybrida*) and seven non commercial accesses (*Gerbera sp.*) were cultivated in semi-protected atmosphere and appraised in four different studies: characterization and genetic divergence based on morphologic markers, determination of the sexual expression and reproductive system, cytogenetics characterization, pollen viability and artificial hybridization, and efficiency of different methods of extraction of DNA genômico seeking the use in molecular markers. The morphological data were submitted to the multivariate analysis and variance. With the multivariate analysis was possible to verify the existence of genetic variability in gerbera that's could be useful to improvement programs. In gerbera there are three types of flowers: flowers of the ray and *trans* (feminine) and the disk flower (hermaphrodite). The hybridization among the cultivars and non

commercial accesses is possible due to they possess compatible genome, what was verified in the cytogenetics characterization ( $2n = 50$ ) and confirmed through seeds production in crossings among them, and due the average percentage of pollen viability be high, 89,6%. It was verified that is not necessary to emasculate hermaphrodite flowers for crossing and that there is not apomitic indications in the evaluated accesses. The obtention good quality pattern and amount of genomic DNA with the method CTAB 2% indicates that it is an efficient methodology, to use in molecular markers as a way to access the genetic variability at molecular level.

**Key words:** *Gerbera* sp., cytogenetic, DNA extraction, genetic divergence, hybridization, morphologic description, pollen viability

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de flores e plantas ornamentais ocupa uma área estimada de 190 mil hectares, movimentando 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. A Holanda continua dominando o mercado das exportações nesse ramo, comercializando para 130 países, perfazendo um total de 1,7 bilhões de dólares na Bolsa Aalsmer (KIYUNA et al., 2003; BOSA, 2002; PETRY & BELLÉ, 2000).

O cenário que se apresenta atualmente para a floricultura nacional é bastante promissor devido ao aumento de negociações com o mercado externo e, especialmente com o Mercosul, pelo fato de a Argentina ter um perfil de consumo mais cultural para flores do que o Brasil, tendo um gasto anual médio/pessoa de US\$ 25,00. Segundo o Instituto Brasileiro de Floricultura, IBRAFLOR, existem no país aproximadamente 10 mil produtores distribuídos em 304 municípios, que ocupam uma área de 6 mil hectares. No Rio Grande do Sul há cerca de 750 produtores em 180 municípios que representam mais de 800 hectares de área cultivada, os quais movimentaram no Estado, cerca de R\$ 800 milhões em 2004. O IBRAFLOR afirma, ainda, que o comércio de flores e plantas ornamentais propicia rendimentos entre R\$50 mil e R\$100 mil por hectare, gerando, na média nacional, 3,8 empregos diretos/ha (REISDÖRFER, 2006).

Atualmente, o comércio mundial de flores é dominado pela Holanda, que representa 48% do mercado exportador, seguido pela

Colômbia, com 6%. No Brasil o maior exportador é o Estado de São Paulo, com 75% das exportações. O Rio Grande do Sul, ao lado de Paraná, Santa Catarina, Goiás, entre outros, faz parte dos chamados pólos de produção em desenvolvimento. O estado gaúcho ocupa o segundo lugar com 9% das exportações de flores e plantas ornamentais (REISDÖRFER, 2006).

Outro fator a ser levado em consideração e que tem contribuído para o crescimento do setor florístico, é a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares nº.9456, em 10 de abril de 1997, a qual favoreceu e favorecerá ainda mais a entrada de empresas fornecedoras de material de propagação e tecnologias, parcerias com empresas nacionais, formação de novos pólos regionais de produção e aplicação de conceitos internacionais de qualidade. Tais fatores irão beneficiar o consumidor brasileiro, que terá acesso a produtos de melhor qualidade e preços médios cada vez mais compatíveis com a realidade brasileira.

Dentro de toda essa cadeia produtiva, a gérbera (*Gerbera hybrida* Hort.) é uma das mais importantes flores de corte do mercado internacional, destacando-se especialmente na Europa, em países como Holanda, Alemanha, França, Itália, Israel, Colômbia e Estados Unidos. A procura por esta ornamental é tanta que, anualmente, no estado da Califórnia (EUA) são produzidos mais de 60 milhões de hastes (escapo e capítulo) de gérbera o que gera 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; CHUNG et al., 2001).

No Brasil, a produção está concentrada no estado de São Paulo, e, em Holambra, apenas um produtor vende semanalmente oito

mil dúzias de gérbera, tendo uma produção anual de 480.000 dúzias de gérbera de corte (GLOBO RURAL, 2005).

A necessidade de lançamento de novos híbridos no mercado de plantas ornamentais torna imprescindível o desenvolvimento de programas de melhoramento no Brasil. Porém, faltam estudos referentes à biologia reprodutiva dessa ornamental e os métodos de hibridização utilizados pelas grandes empresas não são divulgados no meio científico. Portanto, se faz necessário, obter informações básicas sobre a forma de reprodução, morfologia floral, polinização, citogenética, bem como caracterizar em nível molecular os genótipos existentes para seleção de parentais a serem utilizados nos cruzamentos genéticos. Isso contribuirá para a implementação de programas de melhoramento de gérbera no Brasil.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo geral de gerar subsídios e conhecimentos básicos para o melhoramento de gérbera, sendo os objetivos específicos:

- 1) Caracterizar morfológicamente os diferentes tipos de flores existentes no capítulo de gérbera, acessar a variabilidade morfológica em um conjunto de acessos de gérbera e propor uma metodologia para classificação comercial dos capítulos de gérbera com base no coeficiente de sobreposição das flores ( $CS = \frac{\text{largura do conjunto das flores do raio interno}}{\Sigma \text{ da largura do conjunto das flores do raio interno e do externo}}$ );
- 2) Avaliar a expressão sexual das flores dos capítulos de gérbera e do sistema reprodutivo preponderante;
- 3) Confirmar o número de cromossomos em híbridos de gérbera; determinar o número de cromossomos em acessos não

comerciais; avaliar a taxa de viabilidade do pólen e a possibilidade de cruzamentos entre os acessos estudados mediante da hibridação artificial.

- 4) Comparar a eficiência de diferentes métodos de extração de DNA de gérbera para futura utilização de marcadores moleculares, mediante a quantificação por espectrofotometria e a avaliação da qualidade pela restrição enzimática e amplificação do DNA por PCR.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Origem e classificação taxonômica

A primeira descrição oficial da espécie, *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook, também conhecida por Transvaal Daisy ou Barberton Daisy, foi feita por J. D. Hooker, em 1889, no Curtis Botanical Magazine. A gérbera é uma espécie originária da Ásia, África do Sul (Transvaal) e Tasmânia. A gérbera pertence à Ordem Asterales, Família Asteraceae (Compositae), Tribo Mustisieae, Subtribo Mustisiinae. O gênero *Gerbera* L. foi assim denominado em homenagem ao naturalista alemão Traugott Gerber, no século 18 (JOHNSON, 2002).

Segundo Hansen (1985), Bremer (1994) e Elomaa & Teeri (2001), o gênero compreende cerca de 30 espécies, distribuídas pela África, Madagascar e Ásia tropical. Barroso (1991) comenta a existência de uma espécie originada nos Andes do Peru, América do Sul. De acordo com Cabrera & Klein (1973), o gênero é muito próximo ao *Trichocline*, da mesma subtribo, que apresenta uma distribuição no sul do Brasil e em outros países da América do Sul, do qual difere pelas lígulas com 3-4 nervuras e invólucros campanulado-turbinados.

As modernas cultivares de gérbera apresentam uma grande variabilidade em decorrência do melhoramento desta espécie, o qual iniciou no final do século XX em Cambridge, Inglaterra, quando duas espécies sul-africanas, *G. jamesonii* e *G. viridifolia* Schultz Bip, foram cruzadas por R.I. Lynch. Ele nomeou este híbrido como *Gerbera* x

*cantebriensis*, conhecido atualmente como *Gerbera hybrida* Hort. Dentre estas duas espécies, *G. jamesonii* 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 gérberras tenham sido utilizadas pelos melhoristas nos cruzamentos (HANSEN, 1985).

## **2.2 Aspectos morfológicos**

A gébera é uma planta herbácea, vivaz, de aproximadamente 45 cm de altura. O caule subterrâneo é um rizoma simpodial, que emite brotos aéreos foliares e floríferos (escapo floral). De acordo com o sistema de formas vitais de Raunkiaer, a gébera é hemicriptófita radicante. No habitat natural é hemicriptófita, sendo que durante o inverno a folhagem desseca e na primavera as gemas, dispostas ao nível do solo, emitem brotos. Este repouso é ocasionado por um estresse hídrico a que as plantas são submetidas em seu habitat natural no inverno seco. O cultivo de gébera pode durar vários anos, mas comercialmente isso não é interessante, pois diminui a produção de flores. Em decorrência disso, as plantas são cultivadas comercialmente apenas por dois ou três anos (PENNINGSFELD & FORCHTHAMMER, 1980).

O sistema radical inicial é pivotante, porém, à medida que se desenvolve se converte em fasciculado, formado por raízes carnosas (engrossadas pelo parênquima cortical, que representa  $\frac{3}{4}$  do seu diâmetro) e fibrosas (delgadas e frágeis) (INFOAGRO, 2005).



As folhas estão dispostas em roseta, são alargadas, podendo chegar a 40 cm. As folhas jovens são inteiras e as adultas são ligeiramente fendidas ou partidas nas bordas. Existem variações no tamanho e na coloração da lâmina foliar, dependendo da cultivar. Da axila de algumas destas folhas evoluem os botões florais, que se desenvolvem sobre grandes escapos, com uma inflorescência terminal denominada capítulo. O escapo floral é levemente piloso e seu comprimento e diâmetro varia de acordo com a cultivar, a idade da planta e as condições de cultivo. Existem cultivares com escapos longos, podendo alcançar 60 cm e são próprias para o emprego como flor de corte, e outras mais compactas são utilizadas no cultivo em vaso (PENNINGSFELD & FORCHTHAMMER, 1980; INFOAGRO, 2005).

A gérbera apresenta a típica inflorescência da família Asteraceae, o capítulo, que são grandes e solitários, sobre largos escapos áfilos e tomentosos. É uma estrutura racemosa, de desenvolvimento centrípeto, com aparência de uma flor simples, mas é constituído por muitas flores, denominadas flósculos, as quais estão assentadas sobre um receptáculo comum cercado por brácteas involucrais, denominadas filárias, dispostas em uma ou mais séries. Estas representam o papel das sépalas. As flores do raio lembram as pétalas e as flores do disco lembram os órgãos reprodutores. Biologicamente, o capítulo funciona como uma flor simples e sua principal função é a de ser um chamariz para polinizadores (BARROSO, 1991; YU et al., 1999).

Os capítulos podem ser classificados em amorfos, haplomorfos, actinomorfos, pleiomorfos e estereomorfos (CABRERA

& KLEIN, 1973; BARROSO, 1991). Botanicamente, o capítulo de gérbera é classificado, como actinomorfo, ou seja, apresenta simetria radial (CABRERA & KLEIN, 1973; BARROSO, 1991; YU et al., 1999; ELOMAA & TEERI, 2001). No entanto, comercialmente, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) classifica os capítulos de gérbera em simples, semidobrados e dobrados.

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 (KLOSS et al., 2004).

De acordo com a descrição de Barroso (1991), o capítulo de gérbera é actinomorfo, com flores heteromorfas, flores unissexuadas femininas em uma série radial com corola ligulada ou bilabiada-ligulada, e andróginas bilabiadas no disco. Para outros autores, como Elomaa & Teeri (2001), Kloss et al. (2004) e Teeri et al. (2006), o capítulo é actinomorfo-radiado e abriga três tipos de flores: as do raio, pistiladas, localizadas na parte mais externa do capítulo em uma a três séries radiais, as *trans*, pistiladas, localizadas entre as flores do raio e do disco, e as do disco, andróginas, localizadas no centro do capítulo. Porém, ainda não está bem esclarecido se todos os tipos de capítulos ou cultivares de gérbera apresentam os três tipos de flores.

As flores de gérbera apresentam quatro verticilos florais: o cálice, que forma uma estrutura especializada na dispersão do fruto, denominada *pappus*, a corola, o androceu, com estames fusionados, e o gineceu, com ovário ínfero. Nesta espécie ocorre o processo feminilização das flores marginais, localizadas na parte mais externa do capítulo. Durante o desenvolvimento floral, as anteras têm seu

desenvolvimento paralisado, resultando na formação de estaminódios, ou seja, estames não funcionais (BARROSO, 1991; ELOMAA et al., 1998; YU et al., 1999; TEERI et al. 2006).

Quanto à simetria, o grau de zigomorfia é mais alto nas as flores do raio e gradualmente se reduz nas flores do disco. No entanto, as flores do disco são radialmente simétricas e classificadas como actinomorfas (TEERI et al., 2006).

A corola é gamopétala, pentâmera, raramente tetrâmera, glabra, pilosa ou glandulosa e apresenta os seguintes tipos: tubulosas (com tubo cilíndrico curto ou longo e limbo infundibuliforme, campanulado urceolado ou hipocrateriforme, com lobos curtos ou mais ou menos profundos, geralmente encontrado em flores andróginas ou masculinas, em geral, constituem as flores do disco, que enchem o centro dos capítulos), filiforme (tubo cilíndrico, curto ou longo, muito estreito, o ápice pode ser truncado, denteado, bilabiado, fimbriado ou curtíssimo ligulado), bilabiada (lábio tridentado ou inteiro e o inferior inteiro ou dividido em dois segmentos estreitos, curtos ou longos, às vezes enrolados em espiral), ligulada (com tubo cilíndrico curto ou longo e limbo aberto, distendido, patente ou ereto, com ápice emergindo, trilobado ou 5-denteado, mais raramente inteiro) (BARROSO, 1991).

A tribo Mustisieae, a qual pertence à gérbera, geralmente apresenta receptáculo alveolado ou ciliado, raramente paleáceo, o qual abriga flores unissexuadas ou andróginas, com corola de tipos variados, podendo esta ser: tubulosa-actinomorfa, com limbo 5-denteado ou 5-lobado, bilabiada, com lábio externo tridentado e o interno bífido, ou ligulada, com lígula 5-denteada. Os tipos de

transição de flores podem ocorrer dentro de um mesmo capítulo, variando quanto à sexualidade, simetria, fusão de órgãos e pigmentação antociânica.

O androceu é formado por cinco estames epipétalos, com filetes curtos ou longos, geralmente espessados no ápice, livres entre si e anteras rimosas, bitecas, introsas, de textura membranácea, concrecidas entre si, formando um tubo através do qual passa o estilete. A base das anteras pode ser obtusa, truncada, sagitada ou com apêndices caudados. O conectivo pode apresentar um apêndice apical curto ou desenvolvido, hialino (BARROSO, 1991).

O gineceu é constituído por um ovário ínfero aderente ao receptáculo floral, bicarpelar, unilocular, uniovulado, com óvulo basal, anátropo, unitegmentado e ocupa toda a cavidade ovariana. O estilete é dividido em dois ramos (estigma bifido), curtos ou longos, providos no lado interno de uma área estigmática e no lado externo com pêlos coletores (BARROSO, 1991).

O mecanismo de liberação do pólen nas asteráceas foi observado pela primeira vez por Cassini (1826-1834) e é denominado de êmbolo. Nesse processo, o pólen é liberado introrsamente e o estilete, ao se alongar, com seus ramos fechados, “varre” o pólen das anteras, com seus pêlos coletores. O apêndice apical das anteras, de acordo com Small apud Barroso (1991), têm por função manter o pólen fora da corola, enquanto que os ápices basais impedem-no de cair no fundo da corola. De acordo com Werpachowski et al. (2004), geralmente, na fase inicial, não há contato entre pólen e estigma de uma mesma flor, visto que os ramos estigmáticos estão fechados. A deposição secundária de pólen no estilete juntamente com a

ocorrência freqüente de mecanismos de auto-incompatibilidade homomórfica esporofítica faz com que muitas asteráceas apresentem xenogamia, mas poucas espécies têm sido estudadas. A polinização em gérbera é predominantemente do tipo entomófila (BARROSO, 1991).

O capítulo, depois de frutificado, pode ter diferentes tipos de comportamento, variando de espécie para espécie. Alguns são xerocásicos (abrindo-se em tempo seco), higrocásicos (tempo úmido) e outros são sinaptostérmicos, onde os aquênios permanecem no capítulo, que fica endurecido, sendo disperso como uma estrutura única. A dispersão dos aquênios é feita geralmente por animais ou pelo vento, sendo que a mais comum é pelo vento, tendo o *pappus* como mecanismo de locomoção, agindo ele como um pára-quadras. Em alguns casos as páleas do receptáculo do capítulo são as responsáveis pela dispersão dos aquênios, por estas serem higroscópicas, em condições favoráveis, curvam-se facilitando desta forma a expulsão dos disseminulos (BARROSO, 1991).

Os aquênios variam muito, podendo ser cilíndricos, fusiformes, ovóides, elipsóides, turbinados, túrgidos ou comprimidos, com ou sem bordo alado ou ciliado, com superfície lisa, verrugosa estriada, glabra ou pilosa, glandulosa, com ápice obtuso, agudo, truncado ou prolongado com rostro, coroadado ou não por *pappus* caduco ou persistente. Este pode ser cerdoso, de cerdas simples ou ramificadas, de páleas livres ou concrecidas, curtas ou longas, coroliforme ou cupuliforme. A semente se apresenta sem endosperma, tem testa muito fina e embrião reto, carnosos e com cotilédones plano-convexo e carnosos (BARROSO, 1991).

### 2.3 Sexualidade e sistema reprodutivo

Em relação à sexualidade das flores há divergência: para Kloss et al. (2004) e Teeri et al. (2006), a gérbera apresenta flores femininas e flores hermafroditas, ao passo que, para Souza et al. (2005), as flores são femininas e masculinas. A poliploidia e hibridização são freqüentes em muitos gêneros da tribo Mustisieae. A apomixia tem sido apontada para 16 gêneros e para outros há informação de número triplóide e não balanceado de cromossomos, o que indica possibilidade de apomixia (BARROSO, 1991). De acordo com Werpachowski et al. (2004), a ocorrência de apomixia parece ser bastante comum na família Asteraceae, inclusive em gérbera (Nygren apud WERPACHOWSKI et al., 2004).

Souza et al. (2005), analisando a estrutura floral de gérbera, observaram que há 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.

A gérbera pode ser propagada tanto sexualmente quanto assexuadamente, através da divisão da planta adulta ou micropropagação. A propagação por sementes é a forma menos utilizada para a produção de flores de corte, por exigir um maior investimento de recursos e trabalho, sendo um processo lento e que traz maiores probabilidades de se perder características desejáveis,

pois a segregação genética resulta na manifestação de uma grande variedade de suas características fenotípicas e genotípicas. Portanto, a propagação vegetativa é mais adequada para manter características híbridas. Após a hibridação, demora em torno de 18 dias para ocorrer a formação de semente (SOUZA et al., 2005). A germinação da semente ocorre entre sete a quatorze 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, já no segundo e terceiro ano a produção se eleva para seis a dezoito flores por ano (BELLÉ, 1998; INFOAGRO, 2005).

A técnica de propagação vegetativa, assim como a de reprodução sexuada, é lenta e pode oferecer ao produtor mudas portadoras de doenças, ocasionando um grande prejuízo para o produtor e o que, conseqüentemente, eleva o custo de produção. Em decorrência disso, muitos estudos sobre a micropropagação de gérbera tem sido realizados nos últimos anos, a fim de estabelecer protocolos e vários meios de cultura e diferentes explantes são testados como: ápice (HUANG & CHU, 1985), ápices de rizoma (SEVERIN et al., 2000), capítulos jovens e pequenos explantes (LALIBERTÉ et al., 1985; SEVERIN et al., 2000; CARDOSO et al., 2005), folhas (JERZY & LUBOMSKI, 1991; REYNOIRD et al., 1993), inflorescência (PIERIK et al., 1973; PREIL et al., 1977; SEVERIN et al., 2000) e óvulos (MIYOSKI & ASAKURA, 1996; TOSCA et al., 1999). No entanto, não é permitida a multiplicação das cultivares comercializadas.

Há poucos estudos detalhados sobre gérbera em relação ao seu sistema reprodutivo, com questões ainda a serem respondidas, referentes ao modo como ocorre a fecundação, se o capítulo é autofecundado, que tipo de emasculação pode ser utilizado, viabilidade do pólen, tempo de viabilidade do estigma, etc. Apesar de não se encontrar estas informações, há muitos trabalhos relacionados ao melhoramento desta espécie: hibridações (SOUZA et al., 2005), análises utilizando genética quantitativa e avaliando herdabilidade de caracteres (SCHIVA, 1975; HARDING et al., 1981; WRICKE et al., 1982; DRENNAN et al., 1983; DRENNAN et al., 1986; YU et al., 1991; HUANG & HARDING, 1998), genética mendeliana (KLOSS et al., 2004; KLOSS et al., 2005a; KLOSS et al., 2005b), mecanismos de ação de genes e controle da identidade de órgãos florais (TOURJEE et al., 1995; ELOMAA et al., 1998; HELARIUTTA et al., 1995; KOTILAINEN et al., 1999; YU et al., 1999), “inbreeding” (HUANG et al., 1995), engenharia genética e transgênia em gérbera (ELOMAA et al., 1993; NARAJU et al., 1998; ELOMAA & TEERI, 2001).

## **2.4 Melhoramento Vegetal**

O melhoramento genético é a ciência voltada à obtenção de genótipos vegetais superiores aos atualmente utilizados sob determinadas condições ecológicas. O melhoramento consiste na seleção de genótipos considerando-se a variabilidade genética existente ou através de cruzamentos entre indivíduos a fim de se obter uma população com genótipos superiores, e assim elevar o valor econômico da espécie. Porém, para que se possa produzir uma nova



cultivar, são necessários vários procedimentos, vários ciclos de avaliação, seleção e recombinação o que torna o processo de melhoramento genético relativamente lento (PINTO, 1995, BORÉM & MIRANDA, 2005).

O melhoramento vegetal vem cumprindo um relevante papel, contribuindo em vários aspectos entre eles o aumento de rendimento, produção, tolerância à acidez do solo, resistência à toxicidade e pragas, deficiências hídricas, melhoria na qualidade, aumento da eficiência fotossintética, promoção de interesses e efeitos estéticos em folhas, frutos e flores em plantas ornamentais.

As plantas, quanto aos seus sistemas reprodutivos, se dividem em três grandes grupos: as espécies alógamas, espécies autógamas e espécies de propagação vegetativa.

As plantas alógamas, grupo ao qual a gérbera pertence, são heterozigotas para muitos de seus locos. Os alelos dominantes mascaram o efeito dos alelos recessivos. Devido a alguns alelos recessivos serem deletérios, a expressão fenotípica das autofecundações artificiais pode provocar a endogamia, a qual resulta em uma perda de vigor, a chamada “depressão endogâmica”. As plantas autógamas se reproduzem por autofecundação, o que eleva o nível de homozigose. A elevada endogamia nestas plantas não eleva a perda de vigor “depressão endogâmica”. Já, as plantas de propagação assexual (vegetativa) são normalmente alógamas e por isso ocorre ampla segregação quando se reproduzem pela via sexual (PINTO, 1995, BORÉM & MIRANDA, 2005).

De acordo com Horner apud Pinto (1995), a heterozigose, o mascaramento da expressão gênica decorrente da dominância e a

epistasia contribuem ainda mais para que em plantas alógamas a variação genética não seja expressa como variação fenotípica na mesma extensão. No entanto, as espécies alógamas têm mais variabilidade intrapopulacional do que as autógamas.

O melhoramento de espécies alógamas visa alterar as frequências gênicas de uma população, aumentando a frequência de alelos favoráveis e reduzindo ou eliminando a frequência dos alelos indesejáveis nas mesmas. Já para uma população de autógamas, o melhoramento buscará a criação de novos e melhores genótipos que devem manter a homozigose.

As plantas alógamas possuem alta possibilidade de recombinação devido à união casual de alelos idênticos pela fecundação cruzada. A heterose é modelada pela seleção natural, sendo a variabilidade genética liberada de forma gradual e lenta. Em espécies perenes como a gérbera, a seleção age primeiramente nas fases vegetativas de crescimento, em vez de agir na produção de sementes. Porém, a adaptação imediata é alcançada pela propagação vegetativa (PINTO, 1995).

Para cruzamentos direcionados e produção de híbrido são necessários o desenvolvimento de técnicas de emasculação e polinização, sendo que tais técnicas requerem o conhecimento da biologia floral (PINTO, 1995; CASTIGLIONI & OLIVEIRA, 1999).

O melhoramento de plantas ornamentais vem sendo realizado tradicionalmente por empresas privadas (SPARNAAIJ, 1976). 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). Em gérbera as técnicas mais utilizadas são a seleção e hibridação.

As plantas ornamentais são produzidas exclusivamente por seu valor estético. Dessa forma, nos programas de melhoramento buscam melhorar os atributos qualitativos, como a coloração de flores, longevidade e forma, 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, etc. (SPARNAAIJ, 1976).

O melhoramento de gérbera consiste basicamente nos cruzamentos e seleção e os genótipos elites têm sido propagados através da cultura de tecidos (NARAJU et al., 1998).

## **2.5 Hibridação**

A hibridação é a fusão de gametas geneticamente diferentes, o que originará um híbrido heterozigótico. O híbrido é o produto proveniente da união de dois gametas quaisquer que diferem na sua constituição alélica para um ou mais locos. Há vários graus de dihibridação cada qual produzindo seus respectivos níveis de segregação e recombinação, o que varia de acordo com o grau de semelhança genética entre os pais (BORÉM & MIRANDA, 2005).

A falta de variabilidade genética disponível em uma espécie cultivada pode representar um grave problema para o seu melhoramento. Dessa forma, a busca de genes em espécies do mesmo gênero ou gêneros botânicos solucionaria o impasse utilizando cruzamentos interespecíficos. Os cruzamentos seriam exitosos se vencessem as barreiras pré-zigóticas (inerentes à fecundação, adesão do pólen ao estigma, hidratação do pólen, germinação do pólen, crescimento do tubo polínico ou penetração do mesmo no saco embrionário) e pós-zigóticas (falta de afinidade cromossômica dos pais, dificuldade de pareamento durante a meiose o que pode ocorrer se o número de cromossomos das espécies utilizadas for diferente) (PINTO, 1995).

Os cruzamentos interespecíficos têm sido muito utilizados no melhoramento de espécies onde a qualidade é prioritária sob a quantidade de produção. Assim os cruzamentos interespecíficos vêm sendo mais utilizados em ornamentais e frutíferas do que nas demais espécies.

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 defasagem na floração. Entretanto, a utilização de técnicas não adequadas de coleta, transporte, extração e armazenamento de pólen podem comprometer sua viabilidade, e, conseqüentemente, dificultar a produção de híbridos interespecíficos. Além disso, a grande maioria dos híbridos produzida através da hibridação interespecífica possui um alto índice de esterilidade, dessa forma a poliploidia é uma das

técnicas mais utilizadas junto com a hibridação visando restaurar a fertilidade dos híbridos F1, a combinação destas duas técnicas tem sido amplamente utilizada nos programas de melhoramento de ornamentais (VAN TUYL & LIM, 2003).

O melhoramento de gérbera é baseado no cruzamento sexual, hibridação, e seleção. Os melhoristas desta espécie têm buscado em seus programas, melhorar propriedades estéticas (coloração e morfologia da flor), arquitetônicas (ordem e número de órgãos florais, simetria da flor, estrutura da inflorescência) e características econômicas como produtividade, cronograma e sincronia de florescimento, tempo de florescimento, vida de vaso (duração pós-colheita), resistência a pragas, doenças. O melhoramento convencional tem oferecido bons resultados devido a grande variabilidade genética entre espécies de gérbera gerando a produção de genótipos elite ricos em cores e padrões de coloração dentro do capítulo, combinados com boas características produtivas e econômicas desejáveis comercialmente.

Apesar deste método de melhoramento convencional estar produzindo genótipos de elites ricos em coloração e padrões de coloração combinados com boas características produtivas, graças à variação genética existente em gérbera, o método tradicional apresenta como desvantagem o tempo consumido e a laboriosidade necessário para o processo de melhoramento, além da alta heterozigose em gérbera. Devido a esse fato, alguns pesquisadores têm utilizado técnicas biotecnológicas e moleculares para realizarem a transferência de genes, a fim de realizar uma rápida introdução de novas características nos genótipos superiores, de elite, sem alterar a boa

combinação nas características já fixadas (ELOMAA et al., 1993; NAGARAJU et al., 1998; ELOMAA & TEERI, 2001).

Já foram realizadas modificações no desenvolvimento floral e na estrutura do capítulo de gérbera através da transformação de vários cDNAs pertencentes a família dos genes MADS-box na cultivar Terra Regina (KOTILAINEN et al., 1999; YU et al., 1999).

Elomaa et al. (1998) desenvolveram um método de regeneração e transformação genética mediados por *Agrobacterium* utilizando como explante pecíolo de gérbera híbrida da cultivar Terra Regina para realizarem uma transformação na coloração vermelha desta cultivar e para melhor entender as bases moleculares do desenvolvimento da inflorescência de gérbera. Nagaraju et al. (1998), realizando transformação genética mediada por *Agrobacterium* em gérbera híbrida, comprovaram que esta metodologia é eficiente para introduzir importantes genes que governam a biossíntese de pigmentos em flores.

As gérberas são agrupadas em dois grupos distintos: as gérberas de vaso, que apresentam escapos curtos e são principalmente propagadas por semente, e as gérberas de corte, com escapos longos resultantes de programas de melhoramento e propagadas principalmente através da micropropagação. De acordo com Miyoshi & Asakura (1996), dois a três ciclos de autofecundação resultam freqüentemente nesta espécie em degeneração da progênie, malformações e esterilidade devido à espécie ser alógama.

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, Souza et al. (2005) realizaram a hibridação levando o pólen coletado com o dedo ao estigma do capítulo utilizado como mãe. Eles observaram as estruturas florais, horários de liberação do pólen e receptibilidade do estigma para realizarem a hibridação artificial em géberas de variedade híbrida e variedades não definidas, e constataram que a gébera apresenta dicogamia protogínica, também observaram que a liberação de pólen ocorreu entre 10 e 16h e que as flores das variedades híbridas não produziram sementes sem a polinização manual.

O uso de métodos altamente discriminatórios para a identificação e caracterização de genótipos é essencial para os programas de melhoramento e para a proteção de patentes em plantas. A introdução e o proteção de cultivares ocasionaram a necessidade de sistemas de identificação. A caracterização das cultivares é a base para trabalhos de estimativa de similaridade genética e identificação. A caracterização pode se basear em características morfológicas, fisiológicas e moleculares.

## **2.6 Caracterização e análise da diversidade genética**

O sucesso de um programa de melhoramento depende da variabilidade, da diversidade da espécie e do processo de seleção que se exerce sobre esta. Dessa forma, para que a diversidade genética seja utilizada é necessário que os acessos sejam caracterizados, documentados e identificados quanto aos caracteres morfológicos e fisiológicos, para que o melhorista possa identificar os potenciais úteis

para o seu programa de melhoramento (BOREM & MIRANDA, 2005).

As coleções de germoplasma se revelam extremamente úteis como fontes de variabilidade genética à disposição dos programas de melhoramento. No entanto, se as coleções não forem caracterizadas seu uso é inviável. Os trabalhos de caracterização de germoplasma, baseados em caracteres morfológicos, moleculares e agronômicos visam avaliar as fontes de variabilidade genética à disposição dos programas de melhoramento. A caracterização morfológica da coleção é feita, de maneira geral, descrevendo-se as variações entre diferentes populações ou acessos, com posterior classificação em grupos similares para as características observadas (BURT et al., 1980; MOREIRA et al., 1994). A informação obtida sobre a coleção pode então ser utilizada por um grande número de cientistas de diferentes áreas de pesquisa (taxonomistas, geneticistas, etc.), e evidentemente, também pelo melhorista, auxiliando-o na escolha dos materiais a serem avaliados agronomicamente (BURT et al., 1980).

A classificação dos acessos é importante, pois através dela pode se proceder ao agrupamento destes com base em suas similaridades e com isto torna mais fácil o manuseio da coleção para os trabalhos de melhoramento (MOREIRA et al., 1994).

A divergência genética relaciona-se ao grau em que as populações se distanciam umas das outras quanto ao conjunto de caracteres que lhe são peculiares. A importância destes estudos para o melhoramento vegetal deve-se a possibilidade de identificar os genótipos de interesse específico, promover uma melhor gestão dos recursos genéticos e ou a divisão dos genótipos em grupos heteróticos,



além de acelerar o progresso genético para determinados caracteres (CUI et al., 2001).

Outro fato importante, é que a superioridade dos híbridos é proporcional à distância genética entre os seus respectivos progenitores, ou seja, quanto mais divergentes forem os genitores, maior a variabilidade resultante na população segregante, e maior a probabilidade de reagrupar os alelos em novas combinações favoráveis, e esta distância é avaliada através da análise da divergência genética. Deste modo, nas espécies onde esta relação é verificada, os melhoristas podem contar com um critério rápido e fácil na escolha dos progenitores para os programas de hibridação (MOREIRA et al., 1994; BENIN et al., 2003).

A divergência genética tem sido avaliada por meio de técnicas biométricas, diferenças morfológicas, as quais são submetidas a uma análise de aglomeração que tem por finalidade de reunir por um critério de classificação, os progenitores em grupos, de forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre os grupos. Também visa dividir um grupo original de observações em vários grupos segundo um critério de similaridade ou dissimilaridade (CRUZ et al., 2004).

Diferentes técnicas de análise multivariada têm sido usadas para estimar a divergência genética (BENIN et al., 2003), incluindo análises de componentes principais, variáveis canônicas e métodos aglomerativos (CRUZ & REGAZZI, 1994).

Análises multivariadas têm por objetivo avaliar um conjunto de variáveis aleatórias relacionadas entre si, onde cada uma possui o mesmo grau de importância. A análise multivariada fornece

coeficientes de distância genética entre os genótipos, proporcionando grande contribuição ao melhoramento genético. Neste conceito, parte-se da hipótese de que quanto maior a distância genética entre dois genótipos, maiores são as chances de combinações mais promissoras.

A análise de agrupamento trata da identificação de grupos de indivíduos similares após a estimação de uma matriz de dissimilaridade. Há vários métodos de agrupamento que se diferenciam pelo tipo de resultado e pelas diferentes formas de definir a proximidade entre indivíduos ou grupos formados. Em todos os casos, não se conhece *a priori*, o número de grupos a ser estabelecido (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Os métodos de agrupamento baseiam-se principalmente em métodos hierárquicos e de otimização. Nos hierárquicos, destaca-se o método do vizinho mais próximo, onde os agrupamentos são identificados na forma de dendrogramas. Nos de otimização, destaca-se o algoritmo de Tocher, onde o objetivo é alcançar uma partição dos indivíduos que otimize alguma medida predefinida (CRUZ & REGAZZI, 1994).

A finalidade da análise de agrupamento é reunir por algum critério de classificação os acessos (qualquer tipo de unidade amostral) em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupo. O método do vizinho mais próximo identifica os genitores mais similares na matriz de dissimilaridade, os quais são reunidos para formar o grupo inicial homogêneo (CRUZ et al., 2004).

A utilização dos métodos de agrupamento requer medidas de similaridade ou dissimilaridade. A escolha de uma ou de outra é feita

subjetivamente levando em consideração vários fatores como a natureza das variáveis ou as escalas das medidas (FERREIRA, 1993). As medidas de dissimilaridade para variáveis quantitativas são de grande importância em estudos de diversidade genética, em que se procura identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Na estruturação da matriz de dissimilaridade empregam-se a distância euclidiana e a distância generalizada de Mahalanobis. Em estudos de divergência genética avaliam-se caracteres com grau significativo de correlação, empregando-se a distância generalizada de Mahalanobis, mais robusta para esta finalidade (ARUNACHALAM, 1981), desde que os dados obtidos sejam retirados de delineamentos estatísticos que possuam repetições, gerando a matriz de covariância residual.

### **2.6.1 Caracterização e divergência genética através de caracteres morfológicos**

A variabilidade genética geralmente é perceptível com base em características morfológicas, porém essa variabilidade é influenciada pelas condições do meio ambiente onde a planta se desenvolve. Em decorrência disso, Tatieni et al. (1996) afirmam que caracteres fenotípicos, tradicionalmente usados para estimar a diversidade genética, são de importância limitada, uma vez que são geralmente influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta, e porque, em algumas espécies, adequado nível de polimorfismo fenotípico não está disponível. Portanto, marcadores isoenzimáticos e

de DNA são pouco influenciados pelo ambiente, sendo mais adequados para estimação da divergência genética por técnicas multivariadas (SMITH et al., 1990; WILLIAMS et al., 1990 e FRANCO et al., 2001).

Apesar disso, muitos autores vêm realizando a caracterização, variabilidade, estudos de divergência e diversidade genética, através de caracteres morfológicos e análise estatística multivariada, obtendo bons resultados nas mais variadas espécies: amendoim, gênero *Arachis* L (WILCHES, 1983), milho, *Zea mays* (CRUZ, 1990), mandioca, *Manihot esculenta* Crantz (PEREIRA & SOUZA, 1992), coqueiro gigante, *Cocos nucifera* L. (RIBEIRO, 1993), tangerinas, gênero *Citrus* (DOMINGUES et al., 1999), feijão (RODRIGUES et al., 2002), batata-doce, *Ipomea batatas* L. (DAROS et al., 2002), *Adesmia latifolia* Spreng (SCHEFFER-BASSO et al., 2003), maracujazeiro-doce, *Passiflora alata* Curtis (MELETTI et al., 2003), cornichão, *Lotus corniculatus* L. (SOSTER et al., 2004), manjeriço, *Ocimum basilicum* L. (BLANK et al., 2004), arroz, *Oryza sativa* L. (CUNHA & PINHEIRO, 2005), cebola, *Allium cepa* L. (BARBIERI et al., 2005), trevo-branco, *Trifolium repens* L. (BORTOLINI et al., 2006) entre outros.

Atualmente, a caracterização é feita considerando-se principalmente as características morfológicas, mas os marcadores moleculares são excelentes ferramentas para promover esta caracterização a nível ao nível molecular (SOUZA, 2001).

### **2.6.2 Marcadores moleculares e diversidade genética**

Os melhoristas de plantas têm tradicionalmente selecionado variabilidade com base no fenótipo (aparência de um indivíduo). Esta estratégia tem sido de sucesso para características de alta herdabilidade (onde o fenótipo reflete a constituição genética do indivíduo), mas nem sempre para características de baixa herdabilidade (onde o fenótipo pode não refletir o genótipo). Pelo fato de a maioria das características selecionadas no melhoramento de plantas ser de natureza quantitativa, estratégias como teste de progênie e seleção em gerações avançadas têm sido utilizadas para minimizar as dificuldades da seleção. Estas, contudo, não diminuem ou evitam os efeitos da interação genótipo x ambiente, que podem mascarar o fenótipo. Este é a expressão do genótipo (constituição genética de um indivíduo) sob condições ambientais específicas e, assim, pode variar. Desta forma, selecionar o fenótipo é como perseguir um alvo móvel mutável sob as influências do ambiente. Uma forma de evitar este problema seria selecionar indivíduos superiores com base no genótipo, pois este independe do ambiente e não varia durante o ciclo de vida de um indivíduo. Acessar e selecionar variabilidade ao nível de DNA é possível através dos marcadores moleculares. Além disso, os marcadores moleculares também possibilitam as distinções entre heterozigotos e homozigotos dominantes (CAVALLI, 2003; LINDSEY & JONES, 1992).

Os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA,

1995). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Os marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção entre indivíduos geneticamente diferentes. Os marcadores moleculares marcam a presença de um gene ou de padrões de seqüências de DNA que caracterizam o indivíduo ou grupo de indivíduos, os quais permitem ao melhorista investigar o genótipo do indivíduo, ao invés do fenótipo (o qual sofre influência do ambiente e sua expressão depende do estágio de desenvolvimento e/ou situação determinada) (SOUZA, 2001).

Os marcadores genéticos utilizados em vegetais podem ser de quatro tipos: morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (BORÉM & MIRANDA, 2005). Os primeiros marcadores usados pelo homem no processo do melhoramento vegetal foram os marcadores morfológicos, marcadores que controlam a morfologia da planta (controlam a coloração, forma, resistência a patógenos, etc.). Tais marcadores, apesar de serem de fácil monitoramento, apresentavam limitações como a variação em função das condições ambientais (BORÉM & MIRANDA, 2005), além de serem limitados à poucas características.

Os marcadores moleculares têm vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais, por que, na grande maioria, são herdados co-dominantemente (para cada loco estudado os alelos são expressos e visualizados) e raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podem ser detectados tanto em tecidos

jovens como adultos e, teoricamente, utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, desde que suficiente DNA possa ser obtido, além de exibirem neutralidade fenotípica. A utilização de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser utilizados mesmo não tendo sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possa ser seguido em gerações subseqüentes, comprovando sua natureza genética (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1995; MILACH, 1998).

Durante as décadas de 60 e 70, marcadores bioquímicos, principalmente as isoenzimas e proteínas de reserva, foram bastante utilizadas em estudos de genética de populações, caracterização de germoplasma e mapeamento genético (BRAMMER & MILACH, 2002). Logo se percebeu que o baixo nível de polimorfismo detectado era uma forte limitação desta técnica. Hoje, de acordo com Borém & Miranda (2005) o uso de isoenzimas para identificação varietal de algumas espécies encontra satisfatoriamente sistematizado.

A técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) surgiu como uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de “primers” específicos ou não. Tais “primers” delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Esta reação criada por Kary Mullis em 1983 envolve três etapas com temperaturas

específicas que permitem a desnaturação do DNA genômico, o anelamento do mesmo com *primers* ou iniciadores (fragmentos sintéticos de DNA que funcionam como iniciadores para a síntese de fragmentos do DNA genômico) e a extensão dos fragmentos do DNA. A repetição deste processo produz um conjunto de produtos de DNA amplificados, ou seja, copiados milhares de vezes, que representa a seqüência flanqueada pelos iniciadores. O produto da amplificação por PCR é visualizado em gel de agarose, sendo que o padrão de bandas dos produtos da PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose também varia, revelando um polimorfismo essencialmente genético (CAVALLI, 2003; KREUTZ, 2001; LENHINGER et al., 2002; ZAHA, 2003).

Um grande avanço da técnica de PCR ocorreu com o uso de pequenos iniciadores aleatórios como um método de geração de marcadores moleculares polimórficos. Em 1990, Williams, Welsh e McClelland propuseram o uso destes marcadores. Esta técnica ficou conhecida como RAPD (DNA polimórfico amplificado randomicamente – *random amplified polymorphic DNA*).

Marcadores RAPD são capazes de detectar extenso polimorfismo em DNA de cópia simples e repetitivo. Diferenças de apenas um par de bases são suficientes para causar a não-complementaridade do iniciador com o sítio de iniciação, o que impede a amplificação do segmento. Outras fontes de polimorfismo podem resultar de grandes inserções entre os sítios de amplificação e inserções menores ou deleções que mudam o tamanho do produto amplificado (CAVALLI, 2003).



Segundo Milach (1998), os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-lo, os obtidos por hibridização do DNA: RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locos de VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”), ou por amplificação do DNA por PCR: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”); STS (“Sequence Tagged Sites”) ou ASA (“Amplified Specific Amplicon”); Microsatélite (ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).

Os marcadores moleculares vêm sendo amplamente utilizados no melhoramento de plantas devido a eles completarem as genéticas quantitativas e mendelianas no entendimento da ação gênica. De acordo com Souza (2001) as três maiores aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal são a análise da diversidade genética entre indivíduos, a construção de mapas genéticos e mapeamento de características de interesse e na seleção assistida por marcadores moleculares.

A similaridade genética obtida por análise de marcadores de DNA vem sendo utilizada para estimar a diversidade genética em coleções de germoplasma (CONTI et al., 2002).

Os marcadores moleculares têm demonstrado ser importantes ferramentas para os melhoristas vegetais em virtude de permitirem avaliar a variabilidade genética disponível para cada espécie, o que contribui para a seleção dos genitores e o direcionamento dos cruzamentos, por permitirem a avaliação em qualquer fase do desenvolvimento da planta. Devido a significativa contribuição que os

marcadores moleculares oferecem para os estudos de variabilidade genética e melhoramento, estes vem sendo aplicados nas mais variadas espécies para os estudos de diversidade genética, entre *Casealpinia echinata* (Pau-Brasil) por Melo et al. (2005), *Copaifera langsdorffii* (Copaíba) por Gonela et al. (2005), no gênero *Eucalyptus* (Alves et al., 2005a; Marcon et al., 2005; Tomaz et al., 2005), *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) por Siqueira et al. (2005), *Phaseolus vulgaris* L. (CAMPOS et al., 2005; FERREIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2005), milho (ZANELLA et al., 2005), *Passiflora* L. (BOLSI et al., 2005), *Petunia* Juss (TOGNI et al., 2005), algodão (ALVES et al., 2005b), arroz (BORBA et al., 2005; MENEZES et al., 2005), em Bromeliaceae, como a *Vriesea gigantea* Goud (PAGGI et al., 2005), *Solanum tuberosum* L. (TORRES et al., 2005; MIZ & SOUZA-CHIES, 2005), *Coffea arabica* L. (SILVESTRINI et al., 2005), *Brachiaria humidicola* (SALGADO et al., 2005), gênero *Eucalyptus* (MARCON et al., 2005), *Stylosanthes capitata* (PATRIARCHA et al., 2005), *Ipomea batata* (CHIESA et al., 2005; DUTRA et al., 2005), *Bactris gasipaes* Keenth (HANZE et al., 2005), *Hemerocallis hybrida* Hort. (MENEZES et al., 2005), espécies aquáticas como *Egeria najas* (LUCIO et al., 2005), *Palicourea coriacea* (CHAM.) K. Schum (BARBOSA et al., 2005), entre outras espécies.

Nos últimos anos o desenvolvimento de marcadores moleculares tem expandido a variedade de DNA polimórfico para o mapeamento genético, melhoramento assistido, "fingerprints" genômicos e para a investigação de similaridade genética em espécies ornamentais. Dentre os diferentes marcadores e metodologias

utilizadas a técnica de RAPD têm se mostrado a metodologia mais simples podendo ser rapidamente aplicadas para identificar polimorfismo sem conhecimento prévio de seqüências de DNA.

A utilização de materiais nativos ou exóticos para programas de melhoramento requer um estudo da variabilidade genética e identificação dos genótipos superiores, para atender esses requisitos tem-se lançado mão dos marcadores moleculares, entre eles o RAPD. Os marcadores RAPD estão sendo amplamente utilizados para determinar e analisar relações filogenéticas e para a especiação do gênero em espécie de mesmo gênero, mas bastante distintas morfologicamente, bem como para a análise da diversidade genética.

Alguns trabalhos também têm sido realizados utilizando diferentes tipos de marcadores e comparando os resultados destes, um exemplo disto, foi o estudo realizado por Hülse-Souza et al.(2005) os quais com o objetivo de comparar a diversidade genética *Zea mays* L., estimada tanto por RAPD quanto por microssatélite, observaram que os marcadores de RAPD foram eficientes para a validação dos dados de pedigree enquanto que os microssatélites foram melhores para reconhecerem diferenças entre caracteres quantitativos.

Em ornamentais, os marcadores de RAPD já foram utilizados para o estudo de variabilidade genética de *Alstroemeria* (ANASTASSOPOULOS & KEIL, 1996), *Chrysanthemum* (WOLF & PETERS-VAN RIJN, 1993), rosa (TORRES et al., 1993), lírio (YAMAGISHI,1995), também para determinar a relação genética de *Alstroemeria* (DUBOUZET et al., 1998), Amor-perfeito (KO et al.,1998) e espécies de rosa (JAN et al., 1999) e para identificar

marcadores moleculares ligados a locus genéticos que controlam o tipo de flor de cravo (SCOVEL et al., 1998).

Benedetti et al. (2001) com o objetivo de caracterizar e discriminar genótipos utilizando RAPD como metodologia para obter “fingerprints” genômicos, confirmaram a identidade genética e identificaram marcadores associados a longevidade pós-colheita de *Limonium*, *Prunus* ornamental e cravo, e também puderam discriminar diferentes cultivares de rosa e Gérbera.

Chung et al. (2001) utilizando a técnica de RAPD caracterizaram 24 cultivares de gérbera utilizando marcadores de RAPD e observaram a formação de 57 bandas polimórficas com o uso de 80 “primers” e constataram uma grande similaridade genética, a qual agruparam em cinco grupos. A média do coeficiente de similaridade foi de 0.72 e variaram de 0.50 a 0.90. O maior coeficiente de similaridade, 0.90, foi encontrado entre cultivar “Sardana” (com flores de cor vermelha/branca e do tipo dobrada) e a cultivar “Tâmara” (com flores laranja e do tipo dobrada).

Apesar de ser possível utilizar tanto caracteres morfológicos quanto moleculares para estudos de caracterização e de análise da variabilidade e divergência, Singh et al. (1991) relatam que a melhor forma de se identificar divergência entre genótipos é o uso combinado de marcadores moleculares e descritores agromorfológicos, promovendo um complemento nos resultados.

De modo geral, estudos moleculares dependem diretamente da qualidade do DNA extraído (ROMANO, 1998) daí a importância de se ter estabelecido uma metodologia eficiente para a extração de um DNA com qualidade.

## 2.7 Extração de DNA

O DNA (ácido desoxirribunucleico) está presente em três organelas das células vegetais, mitocôndria, cloroplasto e núcleo. Quando se extrai o DNA vegetal sem realizar nenhum procedimento para isolar o DNA vindo destas três organelas diz-se que se realizou a extração do DNA total, pois este é formado pelo DNA genômico, mitocondrial e cloroplastidial (BERED, 1998).

A extração do DNA das plantas é o primeiro passo para a posterior utilização do mesmo nas diferentes técnicas moleculares, sendo assim, esta etapa é muito importante visto que o DNA deve estar o mais íntegro possível para que nossos objetivos sejam alcançados com sucesso. O isolamento de DNA de plantas e de material vegetal é uma importante etapa na análise da estrutura e organização do genoma (ROMANO & BRASILEIRO, 2003).

Atualmente existe um grande número de protocolos que descrevem a extração de DNA em diferentes espécies e/ou tecidos vegetais o que se deve a variabilidade da composição bioquímica encontrada nas diferentes plantas e tecidos vegetais. Tal diferença impossibilita o desenvolvimento de um único protocolo ideal que possa ser utilizado para as diferentes espécies vegetais. Apesar de atualmente, o número de protocolos disponíveis aumentarem constantemente, a maioria deles é uma variação de dois protocolos básicos: o descrito por Dellaporta et al. (1983) e o de Doyle & Doyle (1987) que utiliza o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (ROMANO, 1998).

Segundo Romano (1998) as diferenças entre os protocolos visam sanar problemas encontrados nas extrações como a degradação do DNA por DNAses endógenas, co-isolamento de polissacarídeos que podem inibir a ação de enzimas, co-isolamento de substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que podem danificar o DNA ou também inibir a ação de diversas enzimas de restrição ou da Taq polimerase.

### **2.7.1 Teoria subjacente aos procedimentos de extração**

Para a otimização do método, alguns critérios básicos precisam ser atendidos. Dentre eles, as paredes celulares devem ser rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares. Geralmente este processo é realizado pelo congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido e posterior quebra mecânica com o auxílio de um pilão e de um almofariz, no caso de extração em larga escala. Se em pequena escala, utiliza-se um pequeno bastão de vidro e um tubo de microcentrífuga. Nesse caso, as preparações freqüentemente se destinam a reações de PCR e podem ser realizadas somente na presença de tampão de extração, sem a adição de nitrogênio líquido.

Além disso, as membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA. Essa etapa é realizada pela ação de um detergente como SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Nesta etapa deve-se tomar cuidado para evitar a ação de DNAses que podem degradar o DNA. O detergente serve para este propósito e os tampões de extração possuem pH por volta de 8,0,

enquanto o pH ótimo para ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0.

Outro passo empregado é a adição de EDTA (ácido etileno diamono tetracético) no tampão de extração. O EDTA inibe a ação de DNAses que usam magnésio e cálcio como cofatores, pois este trata-se de uma substância quelante de cátions divalentes, como  $Mg^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ .

A extração de DNA de alto peso molecular é, de qualquer maneira, apenas uma parte da tarefa, o extrato inicial de DNA contém grande quantidade de RNA, proteínas, polissacarídeos, taninos e pigmentos que, em alguns casos, são difíceis de separar do DNA. Um tratamento com RNase aquecida remove o RNA do extrato (CLARK, 1997).

Os ácidos nucléicos devem ser separados das proteínas realizando-se de uma a várias extrações com fenol e/ou clorofórmio, que desnaturam as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucléicos. O DNA deve ser protegido da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando este inacessível às enzimas de restrição. A contaminação por compostos fenólicos pode ser evidenciada pela coloração do DNA que tende a ficar marrom. Para evitar o efeito oxidativo dos polifenóis, deve ser adicionado ao tampão de extração, agentes anti-oxidantes, como PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou  $\beta$ -mercaptoetanol.

Além das proteínas, os ácidos nucléicos devem ser separados dos polissacarídeos. Estes inibem a ação de enzimas de restrição e tornam a amostra de DNA excessivamente viscosa, interferindo na

migração do DNA em corridas eletroforéticas. O detergente CTAB é utilizado com essa finalidade, já que polissacarídeos e ácidos nucléicos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente. Polissacarídeos também podem ser removidos pelo emprego de gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) (ROMANO & BRASILEIRO, 2003).

Embora exista um número grande de protocolos na literatura para extração de DNA de plantas, na maior parte das vezes é utilizada a metodologia baseada no protocolo de CTAB 2X (cetyltrimethyl ammonium bromide) de Doyle & Doyle (1987), onde esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação. Porém, outro método de isolamento de DNA, que utiliza SDS (sodium dodecyl sulfate) para promover a lise celular e precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos também é utilizado (ORSTROWSKA et al., 1997).

A extração do DNA de plantas é realizada na maioria das vezes por adaptações dos protocolos de extração descritos por Dellaporta et al. (1983) e por Doyle & Doyle (1987). A diferença principal destes protocolos consiste no detergente utilizado. A metodologia descrita por Doyle & Doyle utiliza o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um detergente catiônico que complexado às paredes celulares, proteínas e polissacarídeos induz sua precipitação. Já a descrita por Dellaporta et al., que utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), apenas promove a lise celular (OSTROWSKA, 1998).



### **2.7.2 Método CTAB 2%**

Este método, modificado de métodos descritos por Murray e Thompson (1980) e Saghai-Marroof et al. (1984), é relativamente simples, e vem sendo usado com sucesso numa gama de espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas. O método pode ser usado com tecido fresco ou desidratado. Apesar do DNA obtido não possuir alto grau de pureza, é geralmente de qualidade suficiente para análises de restrição ou amplificação por PCR. Produtos são tipicamente na ordem de 100-200 µg/g de tecido fresco (CLARK, 1997).

A extração com CTAB é bastante eficiente, produzindo grandes quantidades de DNA para estocagem. Segue as etapas de maceração das amostras, que pode ser realizada manualmente em cadinhos com nitrogênio líquido ou em tubos de microcentrífuga, dependendo quantidade necessária de material vegetal. Após a transferência do material vegetal para um tubo, adiciona-se clorofórmio álcool isoamílico para pós-tuma centrifugação. Após este passo, é possível a visualização de duas fases: a fase aquosa e a fase orgânica. Este passo é repetido por algumas vezes e então adiciona-se isopropanol, centrifuga-se novamente e descarta o sobrenadante, restando os ácidos nucléicos precipitados.

### **2.7.3 Método Dellaporta, Woods e Hicks (1983)**

Este procedimento alternativo também se baseia no uso de um detergente aquecido para uma pré-extração, o denominado SDS (dodecil sulfato de sódio). Acetato de potássio com alta molaridade é

adicionado ao extrato a 0°C e a mistura é centrifugada para remover materiais insolúveis. Isto é utilizado para remover proteínas contaminantes e polissacarídeos (CLARK, 1997).

Outro método utilizado é a extração de DNA por meio de núcleos celulares. Essa estratégia é baseada em uma prévia separação dos núcleos dos outros constituintes celulares. Esse procedimento pode resolver o problema de co-isolamento de constituintes indesejáveis, como os polissacarídeos e polifenóis citoplasmáticos. A principal desvantagem deste método é que a extração de núcleos a partir de material congelado é muito ineficiente. Outra desvantagem é que esse método é mais laborioso do que os previamente mencionados. As preparações de DNA obtidas por qualquer um desses métodos podem sofrer uma posterior purificação por centrifugação em gradiente de densidade de CsCl. Essa purificação, apesar de laboriosa, é eficiente na remoção de RNA, polissacarídeos, proteínas e outros contaminantes da amostra de DNA. Outra estratégia para purificação do DNA isolado é a precipitação com acetato de amônio. Essa estratégia é mais rápida, porém o DNA purificado é de menor qualidade (ROMANO & BRASILEIRO, 2003).

Independentemente da metodologia de extração e purificação, é necessário fazer uma verificação da qualidade da amostra antes do armazenamento, para futura referência. Isto pode ser feito através de visualização em gel de agarose/brometo de etídio com um controle de massa e peso molecular (DNA mass ladder), ou através de uma reação de PCR. Espectrofotometria é possível, mas se recomenda que as amostras passem por um processo de purificação e impurezas, pois as impurezas interferem em demasiado na estimativa.

O nível de pureza e qualidade do DNA isolado varia de aplicação para aplicação. Por um lado, o alto peso molecular e alta pureza são requeridos para a produção de bibliotecas genômicas, que são separadas por seqüências de genes de plantas e por outros marcadores como RFLPs (CLARK, 1997).

Independente do método utilizado, um bom procedimento de extração para isolamento de DNA deve satisfazer alguns critérios principais, este deve produzir DNA de pureza razoável para sua subsequente manipulação. Nas análises que exigem que o DNA seja cortado em fragmentos, às preparações de DNA devem produzir amostras puras o suficiente para não inibir os processos enzimáticos ou causar interferência nos padrões de migração em gel de eletroforese, sendo neste caso, necessário que o DNA esteja suficientemente intacto. Isto é evidenciado em metodologias como Southern Blot ou na utilização de marcadores moleculares como microssatélites e RFLP (ROMANO & BRASILEIRO, 2003). Para análises envolvendo o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), o DNA extraído não deve conter contaminantes que interfiram com as exigências da PCR (CLARK, 1997). Por exemplo, para estudar a segregação de uma gama de marcadores numa população de plantas individuais, isto significa que o produto de PCR de uma única planta deve ser suficiente para talvez cem diferentes análises. Por outro lado, para o *screening* de um amplo número de plantas por um único marcador, o produto de DNA de uma extração em micro-escala deve ser mais relevante.

#### **2.7.4 Quantificação e controle da qualidade**

Esta etapa tem como objetivo a obtenção de parâmetros para o balanceamento químico da etapa posterior, reação de amplificação do DNA.

De modo geral, as metodologias empregadas para a quantificação são baseadas em diluições do material extraído que pode ser evidenciado em géis de agarose com brometo de etídio, por espectrofotometria ou pelo sistema slot blot por quimioluminescência.

A quantificação de DNA em gel de agarose é técnica de menor precisão quando comparada às outras, porém de grande valia por sua simplicidade, sendo ágil instrumento para demonstração de êxito na etapa de extração. Já o método espectrofotométrico de quantificação de DNA é geralmente utilizado para determinar a concentração e pureza de ácidos nucleicos em uma solução.

A quantificação de DNA é uma etapa fundamental para a eficiência da reação de PCR, pois permite ter uma boa estimativa na leitura e concentração do material, calcular o volume final do mesmo na reação em quantidades adequadas.

Entre as técnicas disponíveis para estimar a concentração de DNA obtida na extração tem-se a quantificação por leitura em espectrofotometro e a quantificação comparativa em gel de agarose corado com brometo de etídio, a escolha da técnica mais adequada depende da pureza da amostra, a praticidade e os fatores de segurança, mas o ideal é que se possível se realize as duas (MARTINS, 1998).

Quando a técnica de extração produz amostras de DNA com maior nível de pureza, com quantidades mínimas de contaminantes (tais como as proteínas, fenóis, clorofórmio e RNA) a quantificação

por espectrofotômetro é uma técnica simples e precisa, já se as amostras apresentarem quantidades elevadas de impureza ou se não oferecer quantidade suficiente ( $< 250\text{ng/mg}$ ), a melhor alternativa é a técnica de quantificação comparativa em gel (MARTINS, 1998).

A leitura em espectrofotômetro consiste na passagem da luz UV (ultravioleta) através da solução de DNA (DNA solubilizado com água ou tampão de ressuspensão, TE, com um fator de diluição determinada, onde o volume final da solução dependerá do tamanho da cubeta) e a medida de absorção dessa molécula no comprimento de onda 260 nm. A leitura deve ser feita também para o comprimento de onda de 280 nm para estimar a pureza da amostra, a qual é obtida através da razão das absorbâncias de 260 e 280 nm (OD 260/OD280). Uma amostra é considerada pura se a razão estiver entre os valores de 1,6 e 2,0. A razão acima de 2,0 indica contaminação por clorofórmio ou fenóis enquanto que a abaixo de 1,6 indica contaminação por proteínas ou outras substâncias como polissacarídeos. Nestes casos, é aconselhável a reprecipitação do DNA.

Para a quantificação das amostras também se utiliza a análise comparativa em gel de agarose. Esta técnica baseia-se na comparação das amostras de DNA de concentração desconhecida com um DNA padrão (de concentração conhecida) esta comparação é realizada através da visualização em transiluminador, o qual emite luz ultravioleta. O DNA somente é visualizado se for corado com brometo de etídio, o qual graças a suas propriedades de se intercalar com a molécula de DNA e emitir fluorescência quando em presença de luz UV. Geralmente se utiliza como padrão o DNA de lambda (sem cortes) ou cortado com enzimas de restrição, neste caso, calcula-se a

quantidade de DNA em cada banda a partir das informações dos seus mapas de restrição (MARTINS, 1998).

A vantagem da quantificação por espectrofotômetro é a praticidade, além de evitar o manuseio com o corante brometo de etídio, que é um agente mutagênico) e exposição à luz ultravioleta, porém sua limitação é o alto custo do equipamento. Já a quantificação em gel permite verificar não só a quantidade como também a qualidade do DNA, o gel mostra se há degradação ou não, separa o DNA e RNA durante a eletroforese, o que reduz a imprecisão do processo de quantificação.

A identificação e caracterização da diversidade genética de plantas por meio de técnicas moleculares envolvem a avaliação de vários indivíduos, necessitando-se, portanto, de métodos rápidos e precisos de extração do DNA. O co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA vegetal (MOLINARI & CROCHEMORE, 2001).

## CAPÍTULO I

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE  
GÉRBERA COM BASE EM MARCADORES  
MORFOLÓGICOS FLORAIS****RAQUEL DALLA LANA CARDOSO<sup>1</sup>, SIMONE MEREDITH  
SCHEFFER-BASSO<sup>2</sup> E MAGALI FERRARI GRANDO<sup>3</sup>**

**RESUMO** – Objetivou-se neste trabalho caracterizar e analisar a divergência genética com base em caracteres morfológicos treze acessos de gérbera, sendo seis híbridos comerciais (*G. hybrida*) e sete acessos não comerciais de (*Gerbera* sp.) e propor uma metodologia para classificação comercial dos capítulos de gérbera com base no coeficiente de sobreposição das flores (CS= largura do conjunto das flores do raio interno/  $\Sigma$  da largura do conjunto das flores do raio interno e do externo). Para este último foram utilizados trinta e oito acessos de gérbera. As plantas foram cultivadas em ambiente semi-

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do programa de Pós-Graduação em Agronomia, (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV)/ Universidade de Passo Fundo (UPF), Área de concentração em Produção Vegetal – raqueldlcardoso@bol.com.br

<sup>2</sup> Co-orientadora, Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., professora do PPGAgro e do ICB do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UPF – sbasso@upf.br.

<sup>3</sup> Orientadora, Bióloga, PhD., professora da FAMV/PPGAgro/UPF – magali@upf.br

protegido. A avaliação dos acessos foi mediante caracteres morfológicos, 19 quantitativos e 25 semi-quantitativos. Os dados foram submetidos à análise multivariada. Todos os tipos de capítulos de gérbera apresentam os três tipos de flores: flores do raio, *trans* e do disco. As flores do raio e *trans* são femininas e as do disco hermafroditas. Dos 19 caracteres morfológicos quantitativos avaliados, nove foram os que mais contribuíram para a divergência genética, são eles: comprimento do lábio superior da flor do disco, lábio inferior e superior da flor *trans*, superior da flor *trans*, da corola da flor *trans* e do raio, largura do conjunto das flores *trans* e do lábio superior das flores do raio, e diâmetro do involúcro; e dos 25 semi-quantitativos, apenas dois, pigmentação antociânica na base do escapo e coloração da antera das flores do disco. Há variabilidade no conjunto de acessos de gérbera a qual pode ser explorada em programas de melhoramento. O coeficiente de sobreposição (CS) pode ser utilizado para sistematizar a classificação dos capítulos de gérbera, reduzindo as divergências nas classificações e a subjetividade nas decisões de produtores, floricultores e melhoristas. De acordo com este coeficiente de sobreposição, capítulos com CS de 0,01 a 0,15 seriam classificados como simples, CS de 0,16 a 0,40 como semidobrados, e os capítulos com CS superior a 0,41 seriam classificados como dobrados.

**Palavras-chave:** análise multivariada, classificação de capítulos, descrição morfológica, distância genética, *Gerbera* sp., coeficiente de sobreposição, variabilidade genética



## CHARACTERIZATION AND GENETIC DIVERGENCE OF GÉRBERA BASED ON FLORAL MORPHOLOGIC MARKERS

**ABSTRACT** - The objective of this work was to characterize and analyze the genetic divergence using morphologic characters in thirteen gerbera accesses, six commercial hybrid (*G. hybrida*) and seven non commercial (*Gerbera sp.*) and propose a methodology for commercial classification of the gerbera capitulum based in the flower overlap coefficient ( $CS = \text{width of the inner ray flowers group} / \Sigma \text{ of the width of the inner and outside ray flowers group}$ ). For this last one, thirty eight gerbera accesses were used. The plants were cultivated in semi-protected atmosphere. The evaluation of the accesses was performed by morphologic characters, 19 quantitative and 25 semi-quantitative. The data were submitted to the multivariate and variance analysis. All of the types of gerbera capitulum present the three types of flowers: flowers of the ray, *trans* and of the disk. The ray and trans flowers are feminine and the disk hermaphrodites. The quantitative morphologic characters that most contributed to the genetic divergence were: length of the superior lip of the disk flower, inferior and superior lip of the trans flower, corolla length of the trans and ray flower, trans flower group width, superior lip width of the ray flower, involucre diameter; and the semi-quantitative: peduncle anthocyanin pigmentation at base and anther of disk flowers. . There is variability in the group of gerbera accesses which can be explored in improvement programs. The overlap coefficient can be used to systematize the classification of the gerbera capitulum, reducing the divergences in the classifications and the subjectivity in the decisions

of producers, florists and breeders. In agreement with the overlap coefficient, capitulum with CS from 0,01 to 0,15 would be classified as simple, from 0,16 to 0,40 as semidouble, and the capitulum with CS upper 0,41 would be classified as double.

**Key words:** capitulum classification, genetic distance, genetic variability, *Gerbera* sp., morphologic description, multivariate analysis, overlap coefficient

## 1 INTRODUÇÃO

A gérbera (*Gerbera* sp.) 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).

A espécie apresenta a típica inflorescência da família Asteraceae, o capítulo, de desenvolvimento centrípeto, com aparência de uma flor simples, porém, constituído por muitas flores, denominadas flósculos, as quais estão assentadas sobre um receptáculo comum, cercado por brácteas involucrais, as filárias, dispostas em uma ou mais séries (CABRERA & KLEIN, 1973; BARROSO, 1991; YU et al., 1999; ELOMAA & TEERI, 2001).

O capítulo de gérbera é uma estrutura altamente organizada, sendo formado por diferentes tipos de flores, com órgãos florais especializados. Botanicamente, é classificado como actinomorfo. No entanto, comercialmente, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) classifica os capítulos de gérbera em simples, semidobrados e dobrados com base em critérios subjetivos, através de ilustrações constantes nos descritores de gérbera, do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), o que também tem gerado dualidade entre opiniões.

Os capítulos semidobrados, dobrados e os 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 progênies segregantes (KLOSS et al., 2004).

De acordo com a descrição de Barroso (1991), o capítulo de gérbera é actinomorfo, com flores heteromorfas, flores unissexuadas femininas (sin.: imperfeita, unisexual, pistilada, monospórica feminina), em uma série radial com corola ligulada ou bilabiada-ligulada, e andróginas (sin.: hermafrodita, bispórica, bissexual, perfeita) bilabiadas no disco. Para outros autores, como Elomaa & Teeri (2001), Kloss et al. (2004) e Teeri et al. (2006), o capítulo é actinomorfo-radiado e abriga três tipos de flores: as do raio, pistiladas, localizadas na parte mais externa do capítulo em uma a três séries radiais, as *trans*, pistiladas, que são localizadas entre as flores do raio e do disco, e as do disco, andróginas, localizadas no centro do capítulo. Porém, ainda não está bem esclarecido se todos os tipos de capítulos de gérbera apresentam os três tipos de flores.

Quanto à simetria, o grau de zigomorfia é mais alto nas flores do raio e gradualmente se reduz nas flores do disco. No entanto, as flores do disco são radialmente simétricas e classificadas como actinomorfas (TEERI et al., 2006).

As flores de gérbera apresentam quatro verticilos florais: o cálice, que forma uma estrutura especializada na dispersão do fruto, o *pappus*, a corola, o androceu, com estames fusionados, e o gineceu, com ovário ínfero. Nesta espécie ocorre o processo de feminilização das flores marginais, localizadas na parte mais externa do capítulo. Durante o desenvolvimento floral, as anteras têm seu desenvolvimento paralisado, resultando na formação de estaminódios, ou seja, estames não funcionais (BARROSO, 1991; ELOMAA et al., 1998; YU et al., 1999; TEERI et al. 2006).

Em relação à sexualidade das flores há divergência: para Kloss et al. (2004) e Teeri et al. (2006) a gérbera apresenta flores femininas e flores hermafroditas, ao passo que, para Souza et al. (2005), as flores são femininas e masculinas.

As cultivares de gérbera apresentam grande variabilidade morfológica, em função do intenso melhoramento realizado na espécie, o qual teve início com o cruzamento de duas espécies sul-africanas, *G. jamesonii* e *G. viridifolia*, que originaram o híbrido, conhecido como gérbera híbrida (*Gerbera hybrida* Hort.). Esta última é uma das plantas mais importantes do mercado mundial de ornamentais, ocupando os primeiros lugares nos leilões de flores, tendo um grande sucesso, tanto no mercado nacional, quanto internacional. Segundo Chung (2001), o sucesso da espécie se deve pela diversidade de cores, permitindo que mais de trezentas cultivares sejam lançadas todos os anos.

A produção brasileira de gérbera é inteiramente dependente da importação das mudas de empresas multinacionais holandesas, as quais são detentoras das patentes comerciais de todas as cultivares de gérbera disponível no mercado. No Brasil, 566 cultivares estão registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2007).

Tal dependência poderia ser reduzida com lançamento de novos híbridos competitivos no mercado. Para isso, é necessária a geração de conhecimentos básicos sobre a espécie, como: forma de reprodução, morfologia floral, polinização e, principalmente, a variabilidade genética natural existente, para seleção de parentais a serem utilizados nos cruzamentos genéticos. O entendimento do

“complexo gérbera” carece de informações sobre classificação e caracterização morfológica, imprescindíveis para a diferenciação fenotípica entre acessos, servindo como importante instrumento para a eliminação de duplicidades destes, além de possibilitar a identificação de materiais e cultivares com características superiores e herdáveis.

Os trabalhos de caracterização de germoplasma, baseados em caracteres morfológicos, moleculares e agrônômicos visam avaliar as fontes de variabilidade genética à disposição dos programas de melhoramento. A garantia para que seu uso seja feito de forma eficiente, passa, necessariamente, pelos trabalhos relacionados com a sua caracterização e avaliação, mediante a descrição das variações entre populações ou acessos, com posterior classificação em grupos similares para as características observadas (MOREIRA et al., 1994).

A divergência genética relaciona-se ao grau em que as populações se distanciam uma da outra quanto ao conjunto de caracteres que lhe são peculiares. A importância destes estudos para o melhoramento vegetal deve-se ao fato de que a superioridade dos híbridos é proporcional a distância genética entre os seus respectivos progenitores. Deste modo, nas espécies onde esta relação é verificada, os melhoristas podem contar com um critério rápido e fácil na escolha dos progenitores para os programas de hibridação (MOREIRA et al., 1994).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo caracterizar morfológicamente os diferentes tipos de flores existente no capítulo de gérbera e acessar a variabilidade morfológica em um conjunto de acessos de gérbera, mediante a avaliação da divergência genética entre os mesmos, com a finalidade de subsidiar os programas de

melhoramento na espécie. Além disso, o trabalho também teve por finalidade esclarecer algumas dúvidas como: Quais os tipos de flores encontradas nos capítulos de gérbera? Como se classificam sexualmente estas flores? Os capítulos simples, semidobrados e dobrados apresentam os mesmos tipos de flores? Qual o caractere morfológico que mais contribui para a classificação dos capítulos? Há variabilidade no conjunto de acessos de gérbera?

Complementarmente, o estudo propõe uma metodologia, com base no coeficiente de sobreposição das flores, para ser utilizado como critério de classificação dos capítulos de gérbera em nível comercial.

O trabalho constou de dois experimentos: Experimento 1- Divergência genética em acessos de gérbera com base em caracteres morfológicos e Experimento 2- Proposta para classificação de capítulos de gérbera com base no coeficiente de sobreposição das flores.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **Experimento I - Divergência genética em acessos de gérbera com base em caracteres morfológicos**

O trabalho constituiu da avaliação de treze acessos de gérbera, incluindo seis cultivares com aptidão para corte (Cariba (A1), Amazone (A2), Pink Elegance (A3), Terra Fame (A4), Azteca (A5) e Tennessee (A6)) e sete não comerciais, sendo estes últimos coletados em jardins do Rio Grande do Sul e Espírito Santo. Os acessos não

comerciais, acredita-se, pertencerem à espécie *G. jamesonii*, pela aparência das flores do raio. Junto ao Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF), estão tombadas exsicatas dos acessos não comerciais: A7 (RSPF-11.315), A8 (RSPF-11.316), A9 (RSPF-11.325), A10 (RSPF- 11.326), A11 (RSPF-11.327), A12 (RSPF-11.318) e A13 (RSPF-11.317). A Tabela 1 apresenta a denominação, características e procedência desses materiais. O delineamento experimental foi completamente casualizado, com número variável de repetições, sendo quatro das cultivares e dois dos demais acessos. As plantas foram obtidas através de divisão de touceira, constituindo, portanto, clones da planta-mãe. Para fins de avaliação estatística, foram colhidos oito capítulos de cada acesso, que constituíram as repetições.

As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno com diâmetro de 25 cm e capacidade para cinco litros de substrato, que contou da mistura de Rendimax Floreira (turfa+vermiculita) e casca de arroz carbonizada, em igual proporção. Esse substrato apresentou densidade de 345 g, 70% de porosidade, pH 6,4 e condutividade elétrica de 0,66 mS.

O experimento foi conduzido em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, a 28°15' S, 52°24' W e a 687 metros de altitude, entre outubro de 2005 e abril de 2006. O clima da região é subtropical úmido (Cfa), segundo Köppen (MORENO, 1961). As temperaturas médias ocorridas durante o período experimental e registradas no interior do ambiente de cultivo, bem como as normais regionais, estão na Figura 1.



Tabela 1 - Denominação, procedência e características gerais de acessos de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Acessos	Procedência	Classificação comercial quanto ao tipo de capítulo	Coloração
a) Comerciais ( <i>G. hybrida</i> )			
A1 cv. Cariba	ProClone*	Semi-dobrado	Vermelho
A2 cv. Amazone	ProClone	Simples	Amarelo-alaranjado
A3 cv. Pink Elegance	ProClone	Dobrado	Rosa claro
A4 cv. Terra Fame	ProClone	Simples	Amarelo
A5 cv. Azteca	ProClone	Simples	Vermelho
A6 cv. Tennessee	ProClone	Simples	Salmão
b) Não comerciais ( <i>Gerbera sp.</i> )			
A7	Vila Velha - ES.	Semi-dobrado	Amarelo
A8	Vila Velha - ES	Simples	Rosa
A9	Casca - RS	Simples	Rosa
A10	Passo Fundo - RS	Simples	Rosa
A11	Casca - RS	Dobrado	Salmão-avermelhado
A12	Passo Fundo - RS	Dobrado	Branco
A13	Vila Velha - ES	Simples	Salmão

\* ProClone: Empresa ProClone Comércio de Mudanças e Matrizes - ME. Holambra - SP.

O cultivo das plantas ocorreu em ambiente semi-protégido, apresentando 6m de comprimento, 3m de largura, 2m de pé direito e 2,8m de altura total (pé direito+arco), constituído por uma cobertura impermeável (filme de polietileno de baixa densidade leitoso, de 0,15mm de espessura), com as laterais de malha de sombreamento 50% fixa, com cortinas móveis de plástico transparente (Figura 2), a qual permitia uma média de transmitância de radiação solar global de 30%.

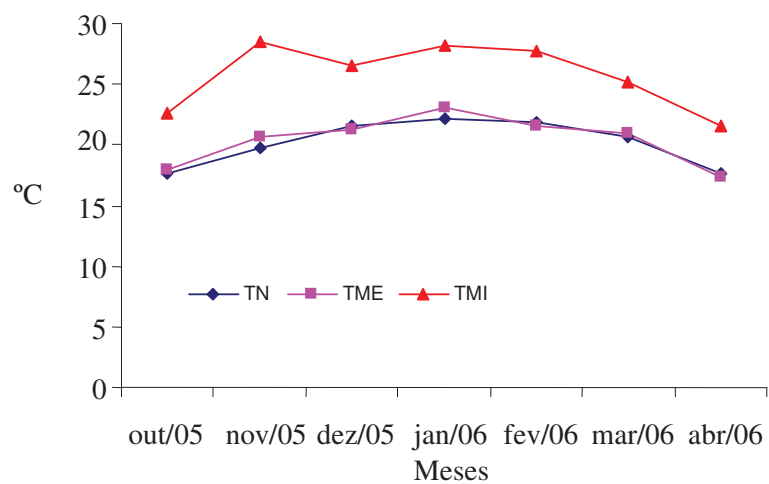


Figura 1 - Temperaturas médias externas (TME), internas (TMI) ocorridas durante o período experimental e as normais regionais (TN). Passo Fundo, RS, 2005.

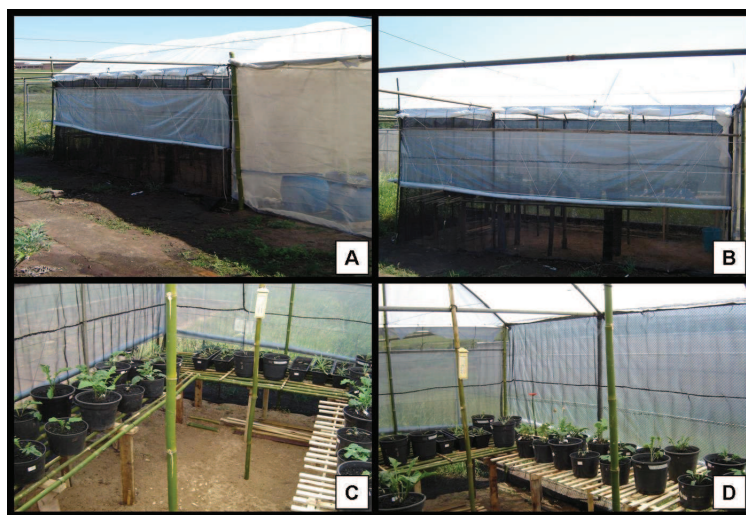


Figura 2 – Aspecto do ambiente semi-protegido onde foram cultivados os acessos de gérbera. Em A e B, aspecto externo, e em C e D, aspecto do interior. Passo Fundo, RS, 2005-2006.

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 (tebuconazole a  $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ ) 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 (parathion methyl a  $0,7 \text{ mL.L}^{-1}$ ) para o controle do pulgão e tripses (*Frankliniella* sp.).

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.

As avaliações iniciaram por ocasião do florescimento, em janeiro de 2006, quando foram retirados oito capítulos de cada acesso, tão logo tivessem atingido o estágio comercial, ou seja, quando as duas fileiras de flores do disco estavam abertas (Figura 3). De cada capítulo foram retiradas e avaliadas cinco flores de cada tipo (raio, *trans* e disco), totalizando quarenta flores de cada tipo avaliadas e, no geral, cento e vinte flores por acesso. A avaliação dos acessos foi feita mediante caracteres morfológicos, sendo 19 quantitativos e 25 semi-quantitativos, totalizando 44 caracteres avaliados. As avaliações quantitativas foram feitas com auxílio de paquímetro digital e microscópio estereoscópico. Para os caracteres semi-quantitativos foram atribuídos códigos seqüenciais numéricos, de acordo com

descritores oficiais de gérbera (MAPA, 2005). Nas Tabelas 3 e 4 estão detalhados os caracteres avaliados, códigos e unidades de medida respectivamente avaliados no capítulo e escapo, e os avaliados nas flores.



Figura 3 - Aspecto do capítulo de gérbera, cultivar Amazone, em estágio comercial, com detalhe para as duas fileiras de flores do disco abertas.

Tabela 3 – Sigla, descrição e unidade de medida dos caracteres morfológicos avaliados nos capítulos e escapos de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Sigla	Caracteres morfológicos	Unidade ou código
<b>A) Quantitativos</b>		
C1	Comprimento do escapo	mm
C2	Diâmetro do escapo	mm
C3	Espessura da parede do escapo	mm
C4	Diâmetro do capítulo floral	mm
C5	Diâmetro do centro da inflorescência	mm
C6	Largura do conjunto das flores do raio	mm
C7	Largura do conjunto das flores <i>trans</i>	mm
C8	Largura do conjunto das flores do disco	mm
C9	Diâmetro do involúcro	mm
C10	Altura do involúcro	mm
C11	Diâmetro do receptáculo	mm
C12	Altura do receptáculo	mm
C13	Média da largura do lábio externo de cinco flores do raio	mm
<b>B) Semi-quantitativos</b>		
C14	Pigmentação antociânica na base do escapo	0-ausente 1-frac 5-média 7-forte
C15	Presença de pilosidade no escapo	0-ausente 1-presente
C16	Base do escapo tomentosa	0-não 1-sim
C17	Coloração principal do capítulo	1-branco 2-branco-amarelado 3-amarelo 4-amarelo-alaranjado 5-alaranjado 6-salmão 7-salmão avermelhado 8-rosa 9-rosa <i>pink</i> 10-vermelho 11-roxo
C18	Classificação do capítulo	1-simples 2-semidobrado 3-dobrado

...continuação

Tabela 3 – Sigla, descrição e unidade de medida dos caracteres morfológicos avaliados nos capítulos e escapos de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Sigla	Caracteres morfológicos	Unidade ou código
<b>B) Semi-quantitativos</b>		
C19	Tipos de flores presentes no capítulo	1-raio 2-trans 3- disco 6- os três tipos
C20	Nível de inserção das flores do raio em relação ao ápice do involúcro	1-baixo 2-ao mesmo nível 3-acima
C21	Curvatura das flores do raio	1-encurvada 2-levemente encurvada 3-reta 4- convexa
C22	Curvatura das flores <i>trans</i>	1-encurvada 2-levemente encurvada 3-reta 4- convexa
C23	Forma do ápice da flor do raio	1-agudo 2- arredondado
C24	Coloração do disco antes da abertura das flores do disco	1-claro 2-escuro
C25	Coloração do <i>pappus</i>	1-branco perolado 2- pérola-amarelado 3-púrpura (roxo)
C26	Nível do <i>pappus</i> em relação às flores fechadas do disco	1-abaixo 2-ao mesmo nível 3-acima
C27	Forma do involúcro	1- campanulado 2- infundibuliforme
C28	Indumento das filarias	1-glabra 2-pilosa 3-tomentosa
C29	Forma do receptáculo	1-plano 2-convexo
C30	Tendência das flores formarem longas pétalas livres	1-ausente 2-presente
C31	Forma das flores do raio	1-elíptica 2 obovada

Tabela 4 - Sigla, descrição e unidade de medida dos caracteres morfológicos avaliados nos diferentes tipos de flores de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Sigla	Caracteres morfológicos	Unidade ou Código
<b>A) Quantitativos</b>		
C32	Comprimento da corola	mm
C33	Altura do tubo da corola	mm
C34	Comprimento do receptáculo floral	mm
C35	Comprimento do lábio externo	mm
C36	Comprimento do lábio interno	mm
C37	Altura do pistilo	mm
<b>B) Semi-quantitativos</b>		
C38	Forma da corola	1-ligulada 2-tubulosa 3-bilabiada
C39	Coloração do lábio	1-branco 2-branco-amarelado 3-amarelo 4-amarelo-alaranjado 5-alaranjado 6-salmão 7-salmão-avermelhado 8-rosa 9-rosa <i>pink</i> 10-vermelho 11-roxo
C40	Sexualidade da flor	1-feminina 2-masculina 3-andrógina
C41	Coloração do pistilo	1-branco 2-amarelo 3-alaranjado 4-rosa 5-vermelho 6-roxo 7-marrom
C42	Coloração do estigma	1-branco 2-amarelo 3-alaranjado 4-rosa 5-vermelho 6-roxo 7-marrom

...continuação

Tabela 4 - Sigla, descrição e unidade de medida dos caracteres morfológicos avaliados nos diferentes tipos de flores de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Sigla	Caracteres morfológicos	Unidade ou Código
<b>B) Semi-quantitativos</b>		
C43	Coloração das anteras da flor	0-sem antera/estaminódio 1-amarelo 2-alaranjado 3-rosa 4-vermelho 5-roxo 6-marrom
C44	Presença de óvulo	0-ausente 1-presente

Nas Figuras 4, 5, 6 e 7 são mostrados detalhes das estruturas florais de como foram tomadas as medidas para sua avaliação.

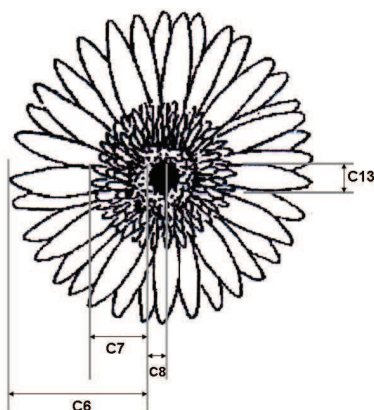


Figura 4 - Aspecto do capítulo em vista frontal, com detalhe para a largura do conjunto das flores do raio (C6), conjunto das flores *trans* (C7), conjunto das flores do disco (C8) e do lábio externo de cinco flores do raio (C13). Figura adaptada dos Descritores de Gérbera (MAPA, 2007).



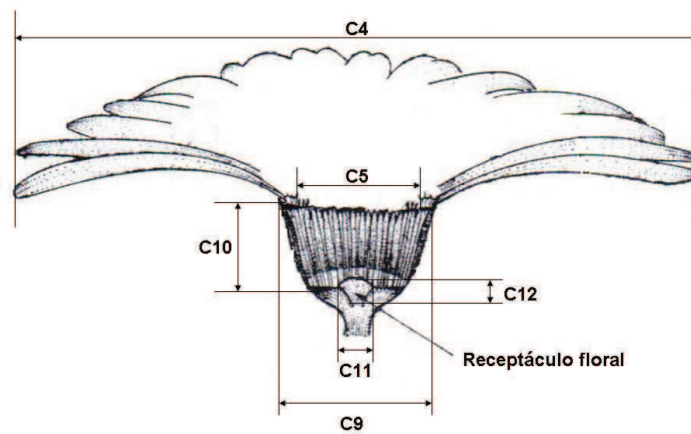


Figura 5 - Aspecto do capítulo em vista dorsal, com detalhe para diâmetro do capítulo floral (C4), centro da inflorescência (C5), involúcro (C9) e receptáculo (C11), altura do involúcro (C10) e do receptáculo (12). Figura adaptada de Drennan et al. (1986).

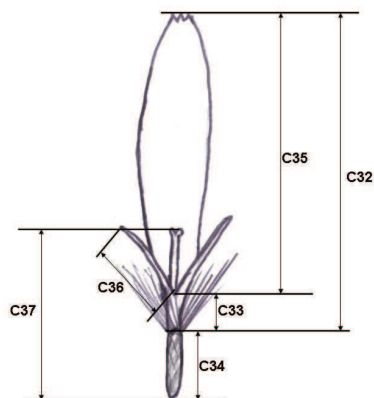


Figura 6 - Aspecto dorsal da flor do capítulo de gérbera, com detalhe para comprimento da corola (C32), receptáculo floral (C34), lábio externo (C35) e lábio interno (C36), altura do pistilo (C37) e do tubo da corola (C33).

Os dados foram submetidos à análise multivariada, através da estimativa da distância de Mahalanobis (dados quantitativos) e da distância euclidiana média (dados semi-quantitativos) e contribuição

relativa dos caracteres para divergência genética (C.R). Através da matriz de distâncias foram obtidos dois dendrogramas, utilizando-se o método de ligação simples. Os dados quantitativos também foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5%. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Genes (Cruz, 2001).

### **Experimento II - Proposta para classificação de capítulos de gébera com base no coeficiente de sobreposição das flores**

O estudo foi realizado entre dezembro de 2005 e março de 2006, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul. Foram avaliados capítulos de vinte e oito híbridos comerciais: Orca, Cosmo Dino, Classic Fábio, Orange, Tonga, Rokie, Miriam, Amazone, Terra Fame, Azteca, Tennessee, Cariba, Cabana, Bianca, Dino, Kozak, Igor, Lady, Gunda, Havanna, Eyecatha, Orange Dino, Onedim, Junk Frau, Solemio, King Alexandre, Lamborghini, Pink Elegance, e de sete acessos não comerciais, coletados em jardins do Rio Grande do Sul e Espírito Santo (A7, A8, A9, A10, A11, A12 e A13). Os capítulos das cultivares foram cedidos pela empresa Proclone (Holambra/SP) e o dos acessos não comerciais foram de plantas cultivadas nas mesmas condições descritas no experimento I.

Três a oito capítulos de cada acesso foram avaliados ao atingirem o estágio comercial, ou seja, quando as duas fileiras de flores do disco raio estavam abertas. Em cada um dos capítulos realizou-se a medição, com auxílio de paquímetro digital, da largura do conjunto das flores do raio interno (largura do conjunto das flores

*trans*) (Figura 7), e a soma da largura do conjunto das flores do raio interno e externo (flores do raio) (Figura 7). Com isso, obteve-se a média de cada um dos acessos e, calculou-se o coeficiente de sobreposição ( $CS = \text{largura do conjunto das flores do raio interno} / \Sigma \text{ da largura do conjunto das flores do raio interno e do externo}$ ). Os coeficientes foram submetidos à análise multivariada, pela: a) estimativa de dissimilaridade entre os acessos, distância euclidiana média (D.E.M) e b) análise de agrupamento, através do método de ligação completa, com a geração de um dendrograma. A análise estatística foi realizada pelo programa Genes (Cruz, 2001). A documentação foi realizada através de fotos.

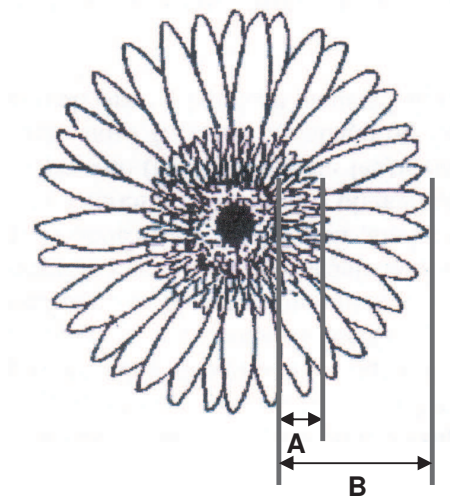


Figura 7 - Capítulo de gérbera: em A largura do conjunto das flores do raio interno e em B soma da largura do conjunto das flores do raio interno e externo. Figura adaptada de MAPA (2007).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Morfologia floral de gérbera

Avaliando os capítulos dos diferentes acessos de gérbera, constatou-se que, independente de serem de capítulos simples, semidobrado ou dobrados, em todos houve a ocorrência dos três tipos de flores: do raio, *trans* e do disco (Figura 8 e 9).



Figura 8 – Aspecto dos acessos dos acessos comerciais de gérbera (A1 cv. Cariba, A2 cv. Amazone, A3 cv. Pink Elegance, A4 cv. Terra Fame, A5 cv. Azteca e A6 cv. Tennessee). A1 acesso de capítulo semidobrados, A3 dobrados e A2, A4, A5 e A6 simples. Em B, diferentes tipos de flores encontrados: flor do raio (1), flor *trans* (2) e flor do disco (3).

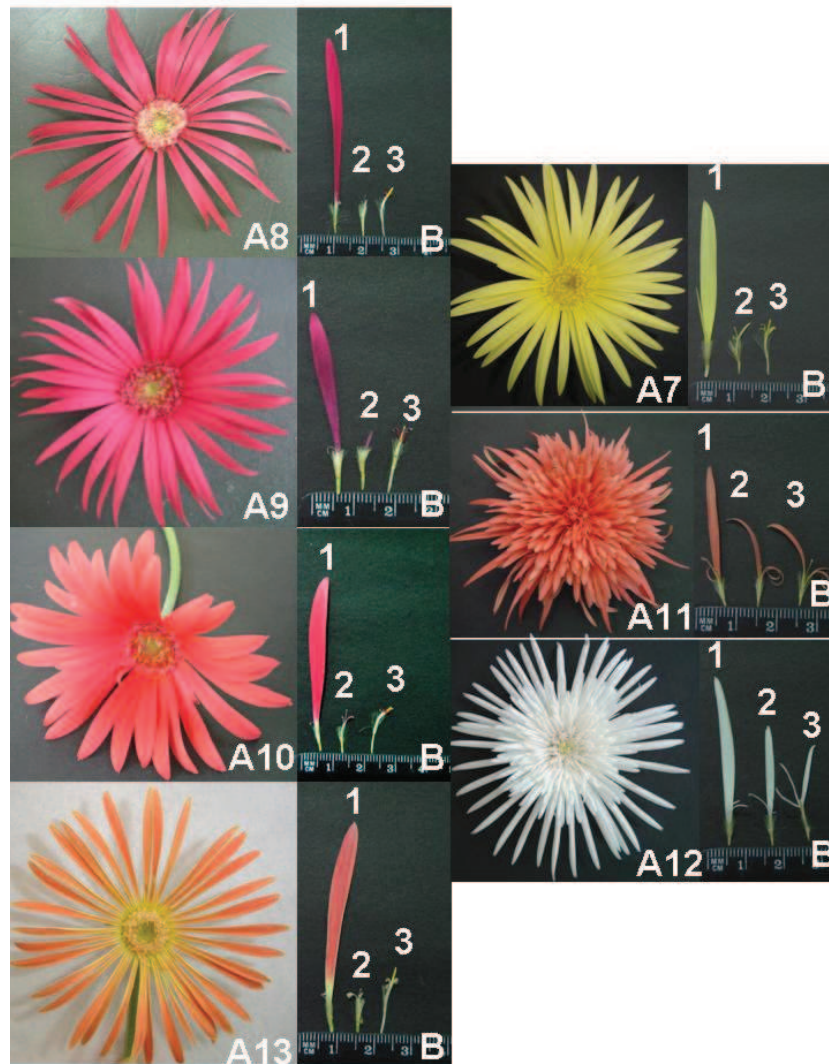


Figura 9 – Aspecto dos acessos não comerciais. A8, A9, A10 e A13 acessos de capítulo simples, A7 semidobrado e A11 e A12 dobrado. Em B, os três diferentes tipos de flores encontrados: flor do raio (1), flor *trans* (2) e flor do disco (3).

A flor do raio apresentou corola bilabiada-ligulada, caracterizada pelo lábio superior tridentado, bem desenvolvido parecendo uma lígula, e o inferior dividido em dois segmentos estreitos, curtos ou longos, que às vezes se apresentavam em espiral (Figuras 8 e 9, observar a flor do raio que esta indicada com o algarismo 1). Mostraram-se tipicamente femininas com pistilo de ovário ínfero contendo um óvulo, encerrado e aderido ao receptáculo floral piloso, anteras ausentes e/ou atrofiadas aderidas à corola (Figura 10), confirmando a descrição de Barroso (1991). A média do comprimento da corola, tomada do ápice do receptáculo floral até o ápice do lábio superior, variou de 37,79 mm (A11) a 67,36 mm (A8), evidenciando grande amplitude.

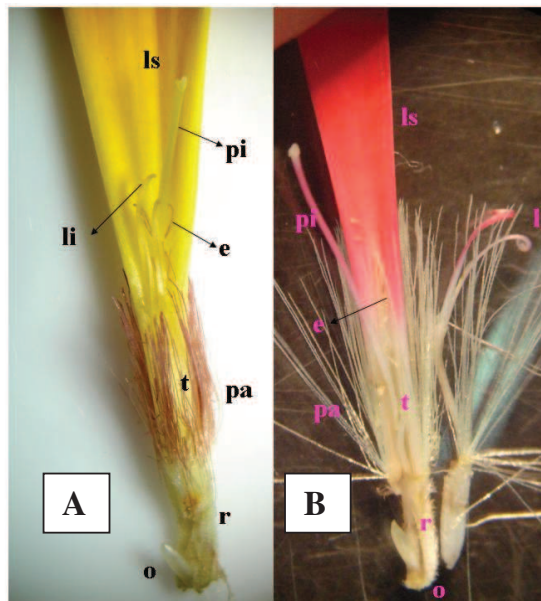


Figura 10 – Aspecto das flores do raio dos acessos comerciais de gérbera (A) e acessos não comerciais (B): óvulo (o), receptáculo floral (r), tubo da corola (t), *pappus* (pa), pistilo (pi), lábio superior (ls), lábio inferior (li) e estaminódios (e). Escala: 5,5:1.



A flor *trans* nos capítulos dobrados e semidobrados seguiu o mesmo padrão de corola das flores do raio, com a diferença de que o comprimento do lábio superior mostrou-se menor. Nos capítulos simples estas flores se apresentaram com tamanho similar às flores do disco (Figura 8 e 9, observar a flor indicada com o algarismo 2). A Figura 11 mostra o aspecto de uma flor *trans*, as quais, assim como as flores do raio, apresentaram-se pistiladas, com ovário contendo um óvulo, receptáculo floral piloso, anteras ausentes e/ou atrofiadas e corola bilabiada-ligulada.

Nos capítulos dobrados e semidobrados, o comprimento do lábio superior variou conforme o tipo de capítulo, sendo que nos capítulos semidobrados e dobrados a variação foi de 11,85 mm (A1) a 23,75 mm (A11), sendo mais longo que o lábio inferior, o qual variou de 6,76 mm (A1) a 14,38 mm (A11). A morfologia das flores *trans* dos capítulos dobrados e semidobrados torna estas semelhantes na forma, às flores do raio, porém em tamanho menor. Nos capítulos simples, o lábio superior das flores *trans* apresentou-se curto (2,69 a 7,73 mm), praticamente do mesmo tamanho do lábio inferior (1,61 a 4,34 mm), assemelhando-se às flores do disco. Nestes capítulos, as flores *trans* passam imperceptíveis por assemelharem-se as flores do disco, não sendo fácil distinguir onde terminam as fileiras de flores do disco e onde iniciam as de flores *trans*. A diferença entre elas é que as *trans* não apresentam anteras, ao contrário das flores do disco, e é este detalhe que auxilia na localização das flores *trans* nos capítulos simples. A média do comprimento da corola variou de 9,94 mm (A2, capítulos simples) a 29,81 mm (A12, dobrado) (Figura 8 e 9, visualizar as flores identificadas com o algarismo 2).

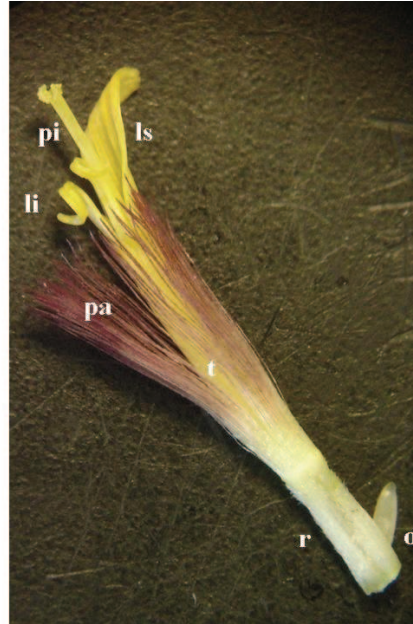


Figura 11 – Aspecto da flor *trans* de um capítulo simples: óvulo (o), receptáculo floral (r), tubo da corola (t), *pappus* (pa), pistilo (pi), lábio superior (ls) e lábio inferior (li). Escala: 4:1.

As flores do disco apresentaram corola bilabiada independente do tipo de capítulo, exceto para os acessos não comerciais A11 e A12, de capítulo dobrado (Figura 9, flores identificadas com o algarismo 3) que apresentaram flores do disco com corola bilabiada-ligulada (lábio superior tridentado e o inferior dividido em dois segmentos estreitos) semelhante a das flores do raio e *trans*. A corola dos acessos A11 e A12 pareciam laciniadas, aspecto que faz com que capítulos com este tipo de flor sejam denominados *spider* (KLOSS et al., 2004).

As flores do disco (Figura 12) apresentaram pistilo e cinco estames férteis, sendo hermafroditas. O pistilo é protegido pelas anteras fusionadas (androceu sinantério), sendo visível somente após a



liberação do pólen. Constatou-se haver uma variação na presença/ausência de óvulo. Os dados encontrados corroboram com Teeri et al.(2006) no que diz respeito à sexualidade das flores do disco, sendo hermafroditas, discordando de Souza et al. (2005) o qual afirma que estas flores são masculinas.



Figura 12 – Aspecto da flor do disco (A): óvulo (o), receptáculo floral (r), tubo da corola (t), *pappus* (pa), lábio superior (ls), lábio inferior (li) e (a) anteras fusionadas. Em B, detalhe das anteras fusionadas retiradas para mostrar o estilete e estigma. Escala: 7:1.

Em relação ao comprimento da corola, os dados obtidos neste trabalho discordam dos de Teeri et al. (2006). Segundo estes autores, as flores do disco possuem somente corolas pequenas. Drennan et al. (1986), em uma população de *G. hybrida* da Califórnia

(EUA), também verificaram que as flores do disco apresentaram-se muito pequenas ( $1,6 \pm 0,2$  cm) com o lábio inferior quase do mesmo tamanho do lábio superior. No presente estudo constatou-se que as flores do disco possuem corolas pequenas, em torno de 9,67 mm nos capítulos simples e semidobrados. Nos capítulos dobrados de acessos não comerciais estas flores não podem ser consideradas pequenas, pois apresentaram até 23,31 mm de comprimento.

Isso evidencia a variabilidade existente na gérbera, decorrente do intenso processo de melhoramento realizado no mundo. Tais esforços comerciais conduzem, muitas vezes, à descaracterização morfológica típica do gênero e tribo e, muitas vezes, da família, como ocorreu com a gérbera híbrida.

Os acessos não comerciais de capítulo simples diferiram dos comerciais por apresentar menor largura do lábio superior da flor do raio e menor número de fileiras radiais de flores do raio, forma do involúcro infundibuliforme e visualmente menor número de flores, assemelhando estes acessos à *G. jamesonii*. Tal fato leva a crer que estes acessos sejam pertencentes a esta espécie, não sendo, portanto, híbridos de *G. jamesonii* e *G. viridifolia*.

### **3.2 Diversidade genética no conjunto de gérbera avaliado**

#### **3.2.1 Diversidade genética com base em caracteres quantitativos**

Foi observada diversidade morfológica nos acessos, sugerindo serem genótipos distintos, pois as plantas foram cultivadas nas mesmas condições ambientais e no mesmo período.

Os resultados da análise estatística descritiva, dos caracteres avaliados, valor máximo e mínimo e a contribuição relativa de cada um dos caracteres quantitativos para a divergência genética estão apresentados na Tabela 5.

Os caracteres morfológicos quantitativos com maior contribuição relativa (CR) foram: comprimento do lábio externo da flor do disco, do lábio interno da flor *trans*, do lábio externo da flor *trans*, da corola da flor *trans* e da corola da flor do raio, largura do conjunto das flores *trans*, do lábio externo das flores do raio e diâmetro do involúcro, que totalizaram 70,5% da variabilidade presente no conjunto de acessos de gérbera (Tabela 5).

Os acessos mais divergentes foram os acessos não comerciais A8, com capítulo simples, e A12, com capítulo dobrado, apresentando a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) de 1048,00, mostrando que existe alta divergências entre os acessos não comerciais, o que pode ser útil ao melhoramento. Para os mais similares, A7 e A9, a  $D^2$  foi de 35,10, sendo ambos acessos não comerciais, respectivamente, de capítulo simples e semidobrado. Para os acessos mais divergentes, o comprimento do lábio externo da flor do disco variou de 2,86 mm (A8) a 14,56 mm (A12), largura do conjunto das flores *trans*, de 2,64 mm (A8) a 21,6 mm (A12), largura do lábio externo das flores do raio de 3,67 mm (A8) a 3,25 mm (A12) e comprimento do lábio interno da flor *trans*, de 1,77 mm (A8) a 11,0 mm (A12).

Tabela 5 - Amplitude e contribuição relativa (CR) dos caracteres quantitativos para diversidade genética estimada pela distância de Malahanobis para 13 acessos de gérbera (média não padronizada)

Caractere quantitativo	Máximo -----mm-----	Mínimo	CR (%)
C1 Comprimento do escapo	590,97	324,42	0,38
C2 Diâmetro do escapo	6,46	3,09	3,01
C3 Espessura da parede do escapo	2,18	0,99	1,44
C4 Diâmetro do capítulo floral	137,9	83,7	1,17
C5 Diâmetro do centro da inflorescência	32,63	14,85	3,51
C6 Largura do conjunto das flores do raio	56,79	21,08	0,95
C7 Largura do conjunto das flores trans	21,60	2,25	11,40
C8 Largura do conjunto das flores do disco	13,95	5,90	0,80
C9 Diâmetro do involúcro	26,9	12,69	6,85
C10 Altura do involúcro	22,77	13,93	1,10
C11 Diâmetro do receptáculo	6,75	2,50	0,34
C12 Altura do receptáculo	4,39	1,40	0,78
C13 Média da largura do lábio superior das flores do raio	10,93	2,89	10,54
C32 Comprimento da corola da flor do raio	67,35	37,26	5,20
C33 Altura do tubo da corola da flor do raio	7,40	4,96	0,13
C34 Comprimento do receptáculo floral da flor do raio	5,22	2,71	1,73
C35 Comprimento do lábio superior da flor do raio	59,23	32,12	0,47
C36 Comprimento do lábio inferior da flor do raio	13,00	2,11	3,11
C37 Altura do pistilo da flor do raio	16,29	11,58	0,12
C32 Comprimento da corola da flor trans	29,81	9,94	9,02
C33 Altura do tubo da corola da flor trans	14,14	5,12	0,46
C34 Comprimento do receptáculo floral da flor trans	5,30	2,84	0,44
C35 Comprimento do lábio externo da flor trans	23,75	2,69	5,48
C36 Comprimento do lábio inferior da flor trans	14,39	1,61	10,54
C37 Altura do pistilo da flor trans	15,69	11,75	0,10
C32 Comprimento da corola da flor do disco	23,31	9,67	2,95
C33 Altura do tubo da corola da flor do disco	8,43	4,93	1,22
C34 Comprimento do receptáculo floral da flor do disco	12,77	3,18	3,12
C35 Comprimento do lábio superior da flor do disco	14,30	2,35	11,5
C36 Comprimento do lábio inferior da flor do disco	10,47	1,62	1,45
C37 Altura do pistilo da flor do disco	16,12	12,50	0,69

No dendrograma (Figura 13), observa-se que os acessos se agruparam em seis grupos distintos: Grupo 1: acessos não comerciais, de capítulos simples (A9, A10 e A13) e semidobrado (A7), Grupo 2: acessos comerciais classificados como simples (A2, A3, A4 e A5), Grupo 3: apenas o A8, que se separou dos demais acessos não comerciais de capítulo simples devido a ter apresentado o escapo com maior comprimento, Grupo 4: A1 e A3, acessos comerciais semidobrado e dobrado, respectivamente; Grupo 5: A11, acesso não comercial de capítulo dobrado; Grupo 6: A12, acesso não comercial de capítulo dobrado.

Os acessos A11 e A12, apesar de possuírem capítulos dobrados e não serem comerciais, ficaram em grupos distintos por terem diferido estatisticamente no comprimento do escapo, corola da flor raio e *trans*, lábio superior da flor do raio e do disco, largura do conjunto das flores do raio e *trans*, diâmetro do capítulo e altura do pistilo da flor *trans* e do tubo da corola da flor do disco.

Na Tabela 6 é mostrada a comparação das médias dos oito caracteres quantitativos, que juntos contribuíram para explicar 70% da variabilidade no conjunto dos acessos avaliados.

Grande variabilidade foi encontrada no comprimento do lábio superior da flor do disco (Tabela 6). Os acessos de capítulo dobrado, A11 e A12 apresentaram as maiores médias em relação a esta variável. O acesso A3, apesar de ser classificado como dobrados por alguns produtores, não diferiu estatisticamente dos acessos de capítulo simples, A2, A4, A8, A9 e A13, e também dos acessos de capítulo semidobrado, A1 e A7. Os acessos A5, A6 e A10, ambos de capítulos simples apresentaram as menores médias, porém não foram

estatisticamente diferentes dos demais acessos simples e semidobrados. Apesar do A11 e A12 serem considerados dobrados, assim como o acesso A3, eles diferiram estatisticamente deste por terem apresentados as maiores médias, respectivamente 14,31 e 12,83mm, enquanto que a do A3 foi de 4,04 mm.

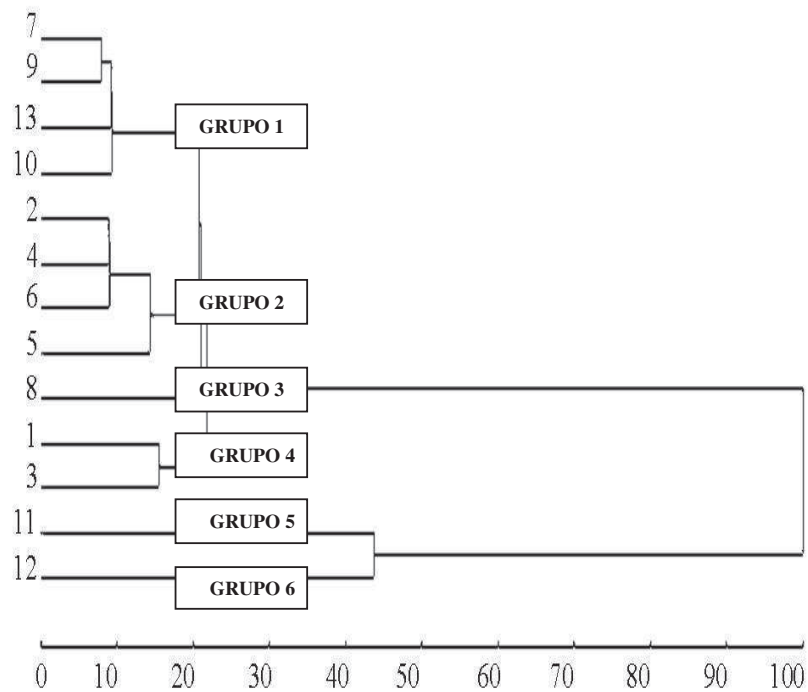


Figura 13 - Dendrograma da similaridade entre 13 acessos de gérbera com base em caracteres quantitativos, obtido pelo método do vizinho mais próximo, baseado na matriz de Distancia de Mahalanobis.

**Tabela 6** – Características morfológicas de acessos de gerbera com maior contribuição relativa para a divergência genética dos acessos avaliados. Passo Fundo, RS, 2006

Acesso	Caracteres morfológicos quantitativos															
	Comprimento do lábio superior da flor do disco	Largura do conjunto das flores <i>trans</i>	Largura do lábio superior das flores do raio	Comprimento do lábio inferior da flor <i>trans</i>	Comprimento do lábio da flor <i>trans</i>	Comprimento do raio da corola	Comprimento do lábio superior da flor <i>trans</i>	Comprimento do raio da corola	Diâmetro do invólucro	Comprimento do raio da corola	Comprimento do lábio superior da flor <i>trans</i>	Comprimento do raio da corola	Comprimento do raio da corola			
A1	3,58	cd	8,97	d	10,03	ab	6,77	cd	18,89	d	22,77	bc	11,85	cd	43,59	cd
A2	2,74	cd	3,24	e	9,25	bc	2,54	e	9,95	e	26,90	a	3,95	e	44,20	cd
A3	4,04	c	16,04	b	10,93	a	9,40	bc	22,36	c	23,94	abc	16,06	bc	48,26	bc
A4	2,89	cd	2,51	e	9,40	bc	3,22	de	10,30	e	21,29	c	4,76	e	48,24	bc
A5	2,56	d	2,93	e	8,95	bc	1,61	e	10,25	e	25,86	ab	2,70	e	41,44	de
A6	2,35	d	3,44	e	8,21	c	2,46	e	12,48	e	25,53	ab	5,92	de	46,15	bcd
A7	3,25	cd	3,05	e	4,00	e	1,95	e	12,02	e	12,78	d	5,12	e	47,22	bcd
A8	2,86	cd	2,77	e	3,67	e	1,77	e	11,19	e	13,25	d	2,84	e	67,36	a
A9	3,47	cd	4,37	e	3,87	e	2,77	e	11,79	e	13,55	d	4,75	e	46,35	bcd
A10	2,53	d	2,25	e	5,96	d	1,99	e	11,01	e	12,69	d	3,44	e	45,98	bcd
A11	14,31	a	12,83	c	2,90	e	14,39	a	25,85	b	14,97	d	20,28	ab	37,27	e
A12	12,83	b	21,61	a	3,25	e	11,00	ab	29,82	a	15,86	d	23,75	a	51,60	b
A13	3,16	cd	2,31	e	4,04	e	4,34	de	10,68	e	12,84	d	7,74	de	50,80	b

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

O maior comprimento do lábio superior da flor do disco dos acessos A11 e A12, juntamente com a forma da corola (bilabiada-ligulada), comprimento praticamente semelhante dos lábios superior e inferior, e algumas vezes com os lábios separados, em forma de lacíneas, assemelha muito estes acessos às gérberras, denominadas por Kloss et al. (2004) tipo “*spider*”, que apresentam lacinação nos lábios das flores.

Quanto à largura do conjunto das flores *trans*, os acessos dobrados e semidobrados apresentaram as maiores médias, diferenciando-se dos capítulos simples que apresentaram as menores médias. O acesso A7, apesar de ter sido classificado como semidobrado, não diferiu dos capítulos simples, o que leva a questionar se realmente este pode ser classificado como semidobrado.

A largura do lábio externo da flor do raio variou de 2,90 a 10,93 mm. Os acessos não comerciais (A7, A8, A9, A10, A11, A12 e A13) apresentaram as menores médias quando comparado com os acessos das cultivares comerciais (A1, A2, A3, A4, A5 e A6) (Tabela 6). O lábio superior mais estreito observado nos acessos não comerciais os assemelha à *G. jamesonii*, espécie que juntamente com a *G. viridifolia* deu origem aos híbridos comerciais, os quais apresentaram lábios mais largos. Tal fato permite afirmar que houve pressão do melhoramento para a seleção de lábios mais largos, visto que os acessos não comerciais, não melhorados, apresentam a largura do lábio superior da flor semelhante ao da *G. jamesonii*.

Quanto ao caractere diâmetro do involúcro, os acessos não comerciais não diferiram entre si e apresentaram as menores médias, enquanto os acessos comerciais apresentaram as maiores médias



(Tabela 6). Isso deve estar relacionado ao fato de que os capítulos dos acessos comerciais serem mais vistosos, os flósculos maiores e visualmente abrigam um maior número de flores devido ao melhoramento direcionado para obtenção de capítulos maiores e com flores mais vistosas.

Em relação ao comprimento da corola da flor do raio observou-se uma grande variação nos acessos, o acesso A8 apresentou a maior média, 67,36 mm, e o A11 a menor, 37,27 mm, diferindo-se estatisticamente dos demais. Os valores extremos para o caractere comprimento da corola da flor do raio foram encontrados em acessos não comerciais, isso indica haver variabilidade para este caractere a qual pode ser utilizadas no melhoramento.

Os acessos A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10 e A13, classificados comercialmente como de capítulos simples, exceto o A7 que foi classificado como semidobrado, não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram as menores médias para os caracteres comprimento do lábio inferior, do lábio superior e o da corola das flores *trans* e largura do conjunto das flores *trans*, enquanto que os capítulos classificados comercialmente como dobrado (A3, A11 e A12) apresentaram as maiores médias, seguidos dos acessos de capítulo semidobrados (A1) (Tabela 6).

Constatou-se que os caracteres relacionados com as flores *trans* (largura do conjunto das flores *trans*, comprimento dos lábios superior, lábio inferior e corola das flores *trans*) foram os que mais contribuíram para a divergência genética, CR= 36,44%, e para a separação dos acessos quanto à classificação comercial dos capítulos. Devido a isso, estes caracteres poderiam ser utilizados como

marcadores morfológicos para a classificação dos capítulos de gérbera e para estabelecer valores da relação entre a largura do conjunto das flores do raio e a das flores *trans*, a fim de estabelecer critérios que auxiliem na classificação dos capítulos de gérbera.

O estudo de diversidade genética exige a avaliação de muitos caracteres o que demanda investimentos e mão de obra, devido a isso sugere-se descartar em estudos futuros os caracteres morfológicos com menor contribuição relativa: comprimento do escapo devido a neste estudo termos utilizados gérberas com aptidão para corte (com escapos longos), lábio superior da flor do raio e receptáculo floral da flor *trans*, diâmetro do receptáculo floral, altura do tubo da corola e pistilo da flor do raio e *trans*.

### **3.2.2 Diversidade genética de gérbera com base em caracteres semi-quantitativos**

Na análise multivariada dos dados semi-quantitativos foram excluídos alguns caracteres, pois, de acordo com Cruz (2001), caracteres invariantes podem ser excluídos da caracterização. Os caracteres invariantes entre os acessos foram: presença de pilosidade no escapo, base do escapo tomentosa, tipos de flores presente nos capítulos, indumento das filárias, forma do receptáculo, forma da corola da flor do raio e *trans*, sexualidade da flor do raio, *trans* e do disco, coloração das anteras da flor do raio e *trans*, presença de óvulo nas flores do raio e *trans*.

A cor da corola, devido a ser um caractere de grande variação e por não se ter um padrão para a escala, foi excluída da análise. Estas

exclusões reduziram o número de caracteres de 39 para 21. A Tabela 7 apresenta os caracteres avaliados, a média, valores máximos e mínimos obtidos, e a contribuição relativa de cada caractere para a divergência genética.

**Tabela 7** – Estatísticas descritivas e contribuição relativa (CR) dos caracteres semi-quantitativos codificados para divergência genética de 13 acessos de gérbera

Caractere semi-quantitativo	Máx.	Mín.	CR (%)
Pigmentação antociânica na base do escapo	7,0	1,0	40,06
Classificação do capítulo	3,0	1,0	4,48
Nível de inserção das flores do raio em relação ao ápice do involúcro	3,0	2,0	1,59
Curvatura das flores do raio	3,0	1,0	3,49
Curvatura das flores trans	4,0	1,0	2,43
Forma do ápice do lábio externo da flor do raio	2,0	1,0	1,37
Coloração do disco antes da abertura das flores do disco	2,0	1,0	1,14
Coloração do papus	3,0	1,0	4,55
Nível do papus em relação às flores do disco fechadas	3,0	1,0	1,97
Forma do involúcro	2,0	1,0	1,52
Tendência das flores formarem longas pétalas livres	2,0	1,0	1,52
Forma das flores do raio	2,0	1,0	0,45
Coloração do pistilo da flor do raio	4,0	1,0	4,78
Coloração do estigma da flor do raio	2,0	1,0	1,52
Coloração do pistilo da flor trans	4,0	1,0	4,78
Coloração do estigma da flor trans	2,0	1,0	1,59
Forma da corola da flor do disco	3,0	2,0	1,02
Coloração do pistilo da flor do disco	2,0	1,0	1,59
Coloração do estigma da flor do disco	2,0	1,0	1,59
Coloração da antera da flor do disco	6,0	1,0	17,15
Presença de óvulo da flor do disco	1,0	0,0	1,41

Entre os caracteres semi-quantitativos, os que mais contribuíram para a divergência genética foram a pigmentação antociânica na base do escapo e coloração da antera das flores do disco (Tabela 7), totalizando 57,21% da variabilidade genética no conjunto.

A Figura 14 apresenta o dendrograma obtido através da matriz de distância euclidiana média pelo agrupamento do vizinho mais próximo. Os acessos mais divergentes, A11 e A12, apresentaram a distância euclidiana média de 1,85, enquanto que para os mais similares, A2 e A6, esta distância foi de 0,42.

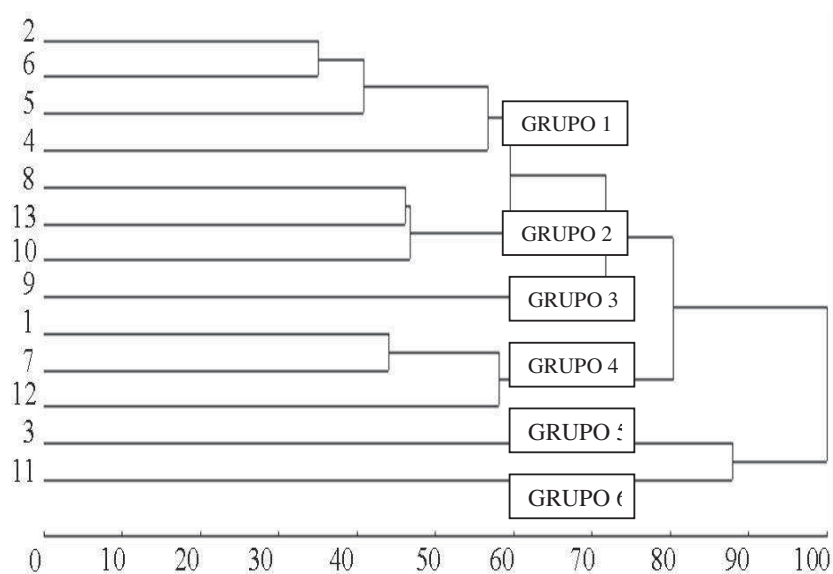


Figura 14 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre 13 genótipos de gérbera com base em caracteres semi-quantitativos, obtido pelo método do vizinho mais próximo, baseado na matriz de Distancia Euclidiana Média.

Os acessos A2 e A6 apresentaram pigmentação antociânica forte, capítulo simples, nível de inserção das flores do raio no mesmo nível do ápice do involúcro, curvatura das flores *trans* reta, coloração do disco escuro, *pappus* ao mesmo nível das flores do disco fechadas, forma do involúcro campanulado, tendência a não formar pétalas livres, forma da flor do raio elíptica, coloração do estigma e estilete

amarela, forma da corola da flor do disco bilabiada e anteras amarelas.

Quanto aos acessos mais divergentes, diferiram na intensidade da pigmentação antociânica na base do escapo, coloração das anteras, estilete e estigma. O A11 apresentou pigmentação antociânica forte, anteras marrons, estilete das flores do raio e *trans* alaranjado e estigma amarelo, já o A12 apresentou pigmentação antociânica fraca, coloração do estilete e estigma das flores do raio e *trans* branca e as anteras amarelas.

A Figura 14 demonstra a formação de seis grupos:

**Grupo 1:** acessos comerciais com pigmentação antociânica forte, anteras amarelas, capítulo simples, involúcro campanulado, corola da flor do raio elíptica, estilete e estigma das flores do raio, *trans* e do disco amarelo;

**Grupo 2:** acessos não comerciais com pigmentação antociânica forte, anteras amarelas, capítulo simples, involúcro infundibuliforme, flores do raio inseridas acima do ápice do involúcro, disco com coloração clara, *pappus* branco perolado e ao mesmo nível das flores do disco fechadas, não formando pétalas livres, corola da flor do raio elíptica, estilete das flores do raio, *trans* e do disco branco e estigma das flores *trans* e do disco branco;

**Grupo 3:** apenas o A9, que se separou dos demais acessos não comerciais devido a coloração de seu pistilo de suas flores do raio e *trans* ser rosa;

**Grupo 4:** acessos com pigmentação antociânica fraca, curvatura das flores *trans* reta, flor do raio com ápice agudo, disco com coloração clara, *pappus* branco perolado e ao mesmo nível das flores do disco fechadas e anteras amarelas;

**Grupo 5:** o A3 diferiu-se dos demais acessos comerciais por ter capítulos dobrados, flor *trans* levemente encurvada, formar pétalas livres, estilete e estigma das flores do disco, *trans* e do raio branco e antera púrpura (roxa);

**Grupo 6:** A11 se diferiu dos demais acessos não comerciais por ter capítulos dobrados, flores do raio ao mesmo nível do ápice do involúcro, pappus abaixo das flores do disco fechadas, involúcro campanulado, formar pétalas livres, estilete das flores do raio e *trans* alaranjado, estigma das flores do raio, *trans* e do disco amarelo e anteras marrons.

Comparando o dendograma dos dados quantitativos e o dos semi-quantitativos é possível observar que os acessos comerciais A2 (Amazone), A4 (Terra Fame), A5 (Azteca) e A6 (Tennessee) ficaram agrupados juntos em ambos os dendrogramas, o que indica haver uma menor variabilidade entre eles, ou seja, apresentam um considerável nível de similaridade.

Apesar dos resultados terem evidenciado haver elevada variabilidade no germoplasma com base em marcadores morfológicos, este estudos poderia ser complementado através do uso de marcadores moleculares. Esta sugestão deve-se ao fato de que os marcadores moleculares permitiriam investigar o genótipo do indivíduo, ao invés do fenótipo. Além disso, a avaliação da variabilidade pode ser realizada em qualquer fase do desenvolvimento da planta, além desta técnica permitir a diferenciação de indivíduos homozigotos e heterozigotos, o que contribuiria ainda mais para o processo de seleção e melhoramento.

### 3.3 Proposta para classificação de capítulos de gérbera com base no coeficiente de sobreposição das flores

A obtenção de um coeficiente é proposta com base nos resultados do experimento II, por se verificar que a largura do conjunto das flores *trans*, o comprimento da corola, lábio superior e inferior das flores *trans* terem sido os caracteres que, juntos, foram os que mais contribuíram para a divergência genética de um conjunto de acessos de gérbera. Com base na sobreposição das flores, obteve-se o coeficiente de sobreposição ( $IS = \text{largura do conjunto das flores do raio interno} / \Sigma \text{ da largura do conjunto das flores do raio interno e do externo}$ ), o qual pode ser útil na classificação comercial dos capítulos de gérbera. O coeficiente de sobreposição obtidos para os trinta e oito acessos avaliados está apresentado na Tabela 8.

Pelo dendrograma baseado no coeficiente de sobreposição (CS) das flores (Figura 15), observa-se a formação de três grupos distintos: Grupo 1: formado somente pelos com capítulos com CS de 0,03 a 0,09; Grupo 2: capítulos com CS de 0,16 a 0,34; Grupo 3: capítulos com IS de 0,41 a 0,60. Os acessos mais divergentes foram Tonga (capítulo simples) e Junk Frau (capítulo dobrado) (D.E.M= 2,95) e os mais similares, Orca e Cosmo Dino (D.E.M= 0,0). Para os mais divergentes, o IS variou de 0,03 cm (Orca) a 0,64 cm (Junk Frau). Assim, poder-se-ia classificar como capítulos simples os com CS= 0,01 a 0,15; capítulos semidobrados, com CS= 0,16 e 0,40 e, capítulos dobrados, os que têm CS igual ou superior a 0,41.

Tabela 8 – Acessos, coeficiente de sobreposição, classificação dos capítulos pelo critério subjetivo e pelo coeficiente de sobreposição. Passo Fundo, RS, 2006

<b>Acessos</b>	<b>Classificação atual dos capítulos (subjetiva)</b>	<b>Classificação dos capítulos através do coeficiente de sobreposição</b>	<b>Coeficiente de sobreposição</b>
Orca	S	S	0,07
Cosmo Dino	S	S	0,07
Classic Fábio	S	S	0,09
Orange	S	SD	0,16
Tonga	S	S	0,03
Rokie	S	S	0,03
Miriam	S	S	0,03
Amazone	S	S	0,07
A8	S	S	0,04
A9	S	S	0,06
A10	S	S	0,05
Terra Fame	S	S	0,05
Azteca	S	S	0,07
Tennessee	S	S	0,07
A13	S	S	0,05
Cariba	SD	SD	0,20
Cabana	SD	SD	0,23
Bianca	SD	SD	0,24
Tenesse	SD	SD	0,34
Dino	SD	SD	0,24
Kozak	SD	D	0,42
Igor	SD	D	0,41
Lady	SD	D	0,54
Gunda	SD	SD	0,28
Havanna	SD	SD	0,20
Eyecatha	SD	D	0,46
A7	SD	S	0,06
Orange Dino	D	D	0,53
Onedim	D	D	0,42
Junk Frau	D	D	0,64
Solemio	D	D	0,60
King Alexandre	D	D	0,60
Lamborghini	D	D	0,48
Pink Elegance	D	SD	0,32
A11	D	D	0,54
A12	D	D	0,52

Classificação comercial dos capítulos de gérbera: S = capítulo simples; SD = capítulo semidobrado e D = capítulo dobrado.



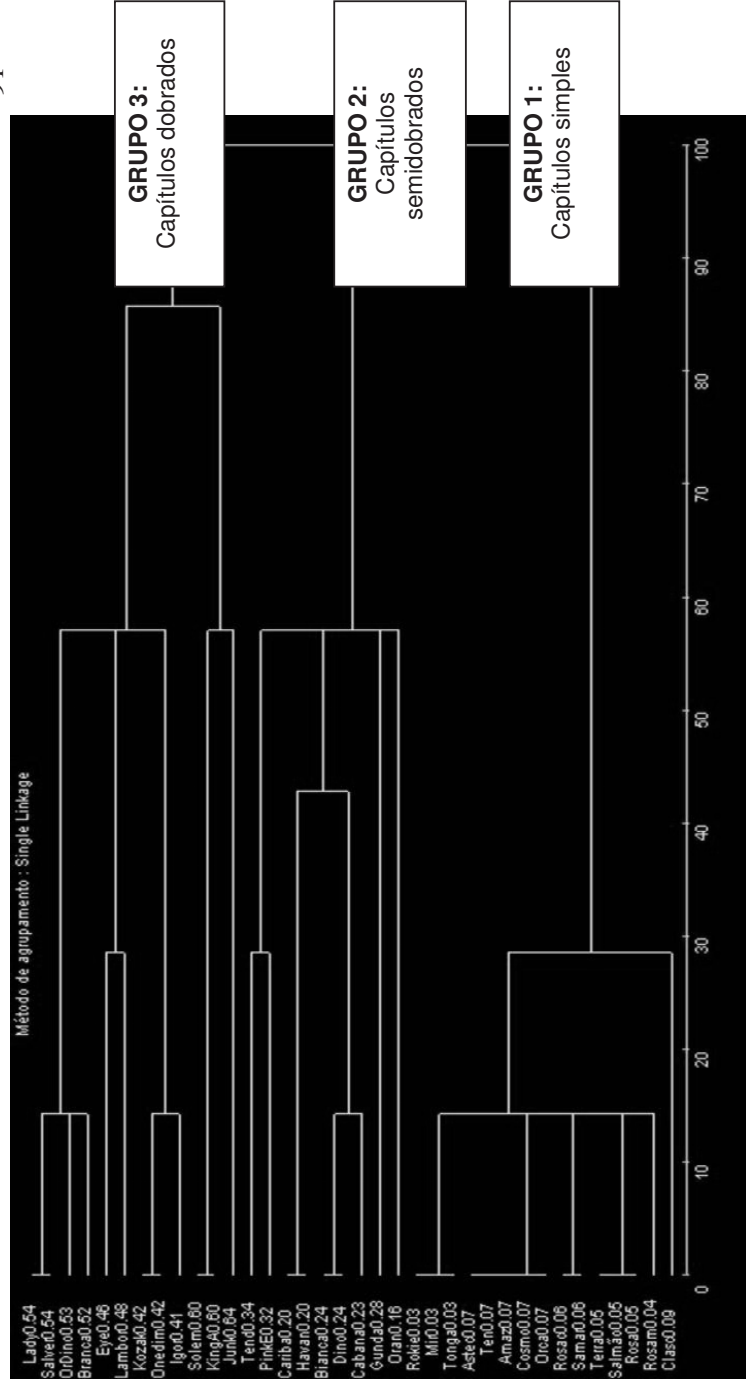


Figura 15 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre 35 acessos de gérbera com base no coeficiente de sobreposição do conjunto das flores *trans*, obtido pelo método do vizinho mais distante, baseado na matriz de distância euclidiana média.

O critério de classificação dos capítulos com base no coeficiente de sobreposição das flores proposto neste trabalho poderia substituir os modos atuais de classificação dos capítulos de gérbera, que são subjetivos e controversos. Alguns autores assumem como capítulos dobrados aqueles que apresentam a fileira de flores *trans* alargada (KLOSS et al., 2004), não diferindo dos capítulos semidobrados e dobrados, uma vez que ambos possuem o conjunto das flores *trans* alargado. Para Rogers & Tija (1990), gérberas com uma fileira de flores de raio são consideradas simples e as com mais de uma fileira são dobradas. Este critério não condiz com a classificação feita pelos produtores de gérbera que classificam as gérberas em simples, semidobradas e dobradas.

Utilizando o critério de Rogers & Tija (1990), praticamente, todas as cultivares comerciais seriam classificadas como dobradas, pois há várias cultivares de gérbera classificadas como simples e que apresentam mais de uma fileira de flores do raio.

Embora o MAPA (2007) seja bastante criterioso, o critério utilizado para a classificação dos capítulos de gérbera é um tanto subjetivo, com base em ilustrações (Figura 16), considerando a largura do conjunto das flores liguladas do raio interno (flores *trans*), comparado à largura do capítulo (Figura 17).

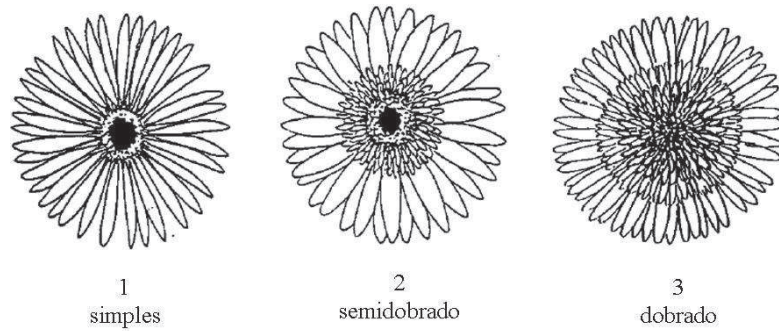


Figura 16 - Tipos de capítulo em gérbera. MAPA, 2007.

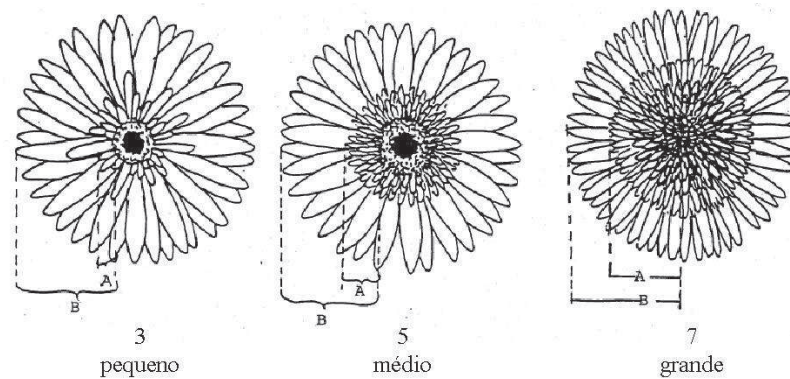


Figura 17 - Apenas cultivares semidobradas ou dobradas: Capítulo: largura do conjunto das flores liguladas do raio interno (A) comparado à largura do capítulo (B). MAPA, 2007.

Com isso, há muita divergência entre o que os técnicos consideram como largura média e grande, e, com isso, a classificações dos capítulos em semidobrados e dobrados fica de ordem pessoal. As Figuras 18, 19 e 20 apresentam a classificação dos acessos com base no critério do MAPA e, também, a classificação pelo CS, proposto neste trabalho.































Critério de classificação atual			Critério de classificação proposto	
Orca				Orca
Cosmo Dino				Cosmo Dino
Classic Fábio				Classic Fábio
Rokie				Rokie
Tonga				Tonga
Miriam				Miriam
Amazona				Amazona
A8				A8
A9		CAPÍTULOS SIMPLES		A9
A10				A10
Terra Fame				Terra Fame
Azteca				Azteca
Tennessee				Tennessee
A13				A13
Orange				A7

Figura 18 – Comparação dos capítulos de gérbera classificados como simples pelo critério atual e pelo coeficiente de sobreposição.

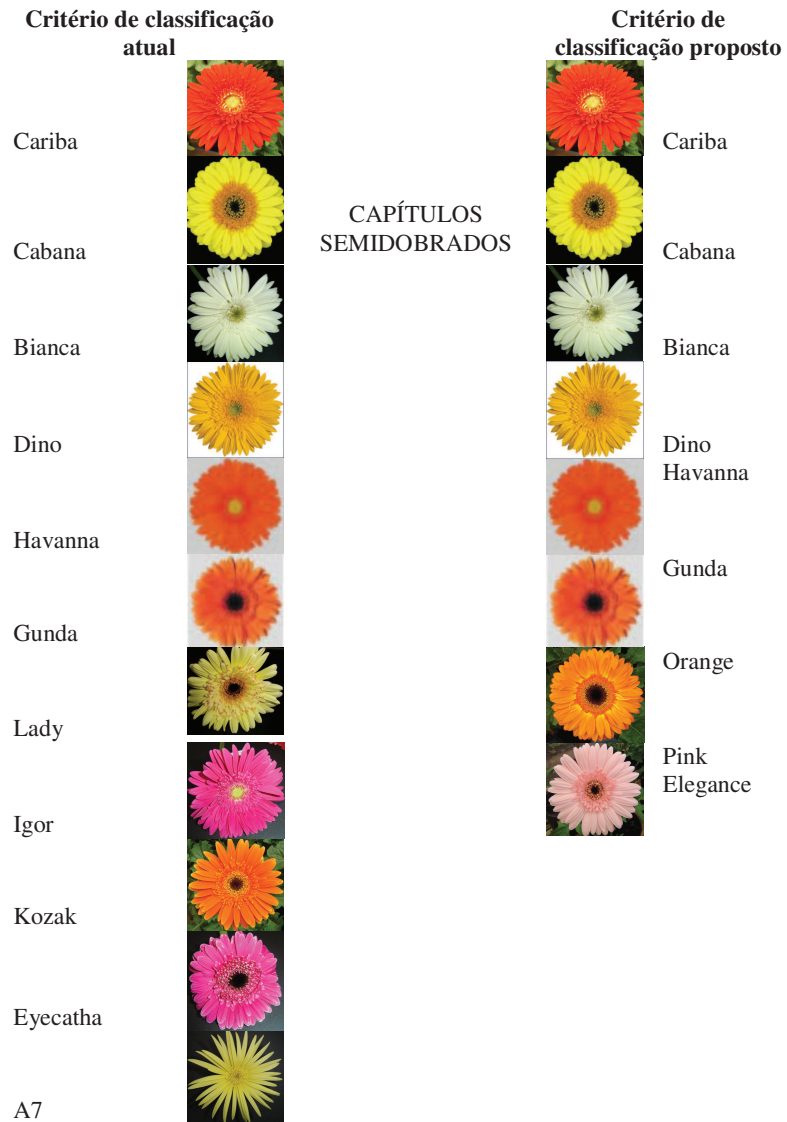


Figura 19 – Comparação dos capítulos de gérbera classificados como semidobrados pelo critério atual, do MAPA, e pelo coeficiente de sobreposição.






















Critério de Classificação Subjetivo			Critério de Classificação Proposto	
Orange Dino				Orange Dino
Onedim				Onedim
Junk Frau				Junk Frau
Solemio				Solemio
King Alexandre				King Alexandre
Lamborghini				Lamborghini
Pink Elegance				Lady
A 11		CAPÍTULOS DOBRADOS		A 11
				A 12
				Eyecatha
				Kozak
A 12				Igor

Figura 20 – Comparação dos capítulos de gérbera classificados como dobrados pelo critério atual, do MAPA, e pelo coeficiente de sobreposição.

Comparando o dendrograma (Figura 15) e as Figuras 18, 19 e 20, percebe-se que muitas cultivares obtiveram a mesma classificação pelos dois critérios. Porém, houve controvérsia na classificação de alguns acessos, principalmente dos capítulos semidobrados (Tabela 9).

Tabela 9 – Controvérsias na classificação dos capítulos de gébera. Passo Fundo, RS, 2006

Acesso (cultivar)	Classificação comercial dos capítulos	
	Critério do MAPA	Critério baseado no CS
cv. Orange	simples	Semidobrada
A7	semidobrado	Simple
cv. Lady	semidobrado	Dobrada
cv. Pink Elegance	dobrada	Semidobrada
cv. Eyecatha	semidobrado	Dobrada
cv. Kozak	semidobrado	Dobrada
cv. Igor	semidobrado	Dobrada

A cv. Orange, classificada, pelo método subjetivo, como simples, e que, pelo CS (0,16) se enquadrava como semidobrada. O acesso não comercial, A7, classificado visualmente como semidobrado, não apresentou IS suficientemente elevado (0,06), sendo classificada como simples. Atualmente, a cv. Pink Elegance apresenta divergência em sua classificação, pois alguns produtores a classificam como dobrada, enquanto, outros, a tem como semidobrada. Pelo CS (0,32), esta cultivar foi classificada como semidobrada. A cv. Eyecatha apresentou CS= 0,46, sendo agrupada junto com as dobradas. As cvs. Kozak e Igor apresentaram CS mínimos para serem consideradas como dobradas, 0,42 e 0,41 respectivamente, porém, visualmente, são mais semelhantes às semidobradas. Por isso, este método, ora proposto, pode ser melhorado, principalmente, quanto aos valores a serem adotados para cada tipo de capítulo.

#### 4 CONCLUSÕES

Todos os acessos de gérbera, independentes de serem capítulos simples, semidobrados ou dobrados apresentam os três tipos de flores: flores do raio, *trans* e do disco.

Quanto à expressão sexual, as flores do raio e *trans* são femininas (pistiladas) e as flores do disco são hermafroditas.

Há variabilidade no conjunto de acessos de gérbera, a qual pode ser explorada em programas de melhoramento.

Os caracteres morfológicos quantitativos que mais contribuem para a divergência genética são: comprimento do lábio externo da flor do disco, do lábio interno da flor *trans*, do lábio externo da flor *trans*, da corola da flor *trans* e da corola da flor do raio, largura do conjunto das flores *trans*, do lábio externo das flores do raio e diâmetro do involúcro, e os semi-quantitativos, pigmentação antociânica na base do escapo e coloração da antera das flores do disco.

O coeficiente de sobreposição pode ser utilizado para sistematizar a classificação dos capítulos de gérbera, reduzindo as divergências nas classificações e a subjetividade nas decisões de produtores, floricultores e melhoristas.



## CAPÍTULO II

### EXPRESSÃO SEXUAL E SISTEMA REPRODUTIVO EM GÉRBERA

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO<sup>1</sup>, MAGALI FERRARI  
GRANDO<sup>2</sup> E SIMONE MEREDITH SCHEFFER-BASSO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a expressão sexual e o sistema reprodutivo de seis híbridos comerciais e sete acessos não comerciais de gérbera. As plantas foram cultivadas em vasos, em ambiente semi-protegido, sendo avaliadas quanto à presença/ausência de órgãos reprodutivos funcionais nas diferentes flores dos capítulos. O sistema reprodutivo foi determinado através da remoção dos diferentes tipos de flores (raio, *trans* ou disco) separadamente e proteção com papel manteiga. Verificou-se que as flores do raio e as *trans* são femininas e as flores do disco são hermafroditas. As flores do disco podem ser de duas categorias: hermafroditas férteis ou hermafroditas funcionalmente masculinas. A

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do programa de Pós-Graduação em Agronomia, (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV)/ Universidade de Passo Fundo (UPF), Área de concentração em Produção Vegetal – raqueldcardoso@bol.com.br

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, PhD., professora da FAMV/PPGAgro/UPF – magali@upf.br

<sup>3</sup> Co-orientadora, Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., professora do PPGAgro e do ICB do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UPF – sbasso@upf.br.

ausência de sementes nos tratamentos de remoção floral, indica que no capítulo de gérbera não ocorreu geitonogamia, devido à protoginia. No entanto, a geitonogamia não está descartada na planta, pois o pólen de um capítulo da planta pode fecundar um outro capítulo da mesma planta. A não formação de sementes no tratamento onde o capítulo permaneceu completo e protegido indica que não é necessário realizar a emasculação das flores hermafroditas para fins de cruzamentos. Para evitar a contaminação por pólen não desejado, os capítulos selecionados para a hibridação devem ser protegidos. Não foi constatado indícios de apomixia nos acessos avaliados, pois não houve formação de sementes nos tratamentos de isolamento, onde foram removidas as flores do disco, hermafroditas e com anteras funcionais e com grãos de pólen viáveis.

**Palavras-chave:** *Gerbera* sp., apomixia, autogamia, geitonogamia, hibridação artificial

## **REPRODUCTIVE SYSTEM AND FLOWER SEXUALITY IN GÉRBERA**

**ABSTRACT** - This work had as objective to determine the sexual expression and the reproductive system in six commercial hybrid and seven accesses non commercial of gerbera. The plants were cultivated in vases, in semi-protected atmosphere, being evaluated the present and absence of functional reproductive organs in the different flowers of the capitulum. The reproductive system was determined through the removal of different types of flowers (ray, *trans* and disc) separately,

followed by protection with paper butter. It was verified that ray and *trans* flowers are feminine and the disc flowers are androgynous (hermaphrodite). The disc flowers can be of two categories: fertile hermaphrodite or hermaphrodite functionally masculine. The non formation of seeds in the treatment where the chapter was kept complete and protected indicates that it is not necessary to emasculate the hermaphrodite flowers for crossings, because in the gerbera capitulum does not occur the geitonogamy due to the protogynous. However, the occurrence of geitonogamy can not be discarded because the pollen of an capitulum the plant can fecundate another capitulum of the same plant . Due to this, chapters selected for the hybridization should be protected to avoid the contamination for pollen no wanted. It was not observed apomixy indications in the evaluated accesses, because there was not the seed formation in the floral removal treatments where the disk flowers were removed.

**Key words:** *Gerbera* sp, apomixy, artificial hybridization, geitonogamia, self-fertilization

## 1 INTRODUÇÃO

A gérbera (*Gerbera* sp.) possui a inflorescência típica das asteráceas, com capítulo actinomorfo-radiado, de desenvolvimento centrípeto, constituído por flores morfologicamente e/ou sexualmente distintas: flores do raio, localizadas na parte mais externa do capítulo, flores *trans* (localizada entre as flores do raio e do disco) e flores do disco, localizadas no centro do capítulo. Biologicamente, o capítulo funciona como uma flor simples e sua principal função é a de ser um chamariz para polinizadores. As filárias, que são brácteas que revestem o eixo da inflorescência, representam o papel das sépalas, as flores do raio, as pétalas, enquanto que as flores do disco lembram os órgãos reprodutores (CABRERA & KLEIN, 1973; BARROSO, 1991; YU et al., 1999; ELOMAA & TEERI, 2001).

Em gérbera há a feminilização das flores do raio, através da paralisação do desenvolvimento das anteras, resultando na formação de estames não funcionais (estaminódios). Já, as flores do disco são sexualmente perfeitas, apresentando cinco estames epipétalos, com filetes curtos ou longos, livres entre si, e anteras sagitadas e concrecidas entre si, formando um tubo através do qual passa o estilete. O gineceu é constituído por um pistilo bicarpelar, gamocarpelar, com ovário ínfero, unilocular, uniovulado, sendo o estigma bífido e provido, no lado interno, de uma área estigmática e, no lado externo, com pêlos coletores (BARROSO, 1991; ELOMAA et al., 1998; YU et al., 1999). A morfologia dos verticilos reprodutores resulta no mecanismo de liberação do pólen denominado “êmbolo”, que foi observado nas asteráceas, pela primeira vez, por Cassini

(1826-1834). Neste mecanismo ocorre a apresentação secundária de pólen no estilete: durante a antese, o pólen é liberado introrsamente e o estilete, ao se alongar, com seus ramos fechados, passa por dentro do tubo formado pelos estames carregando consigo os grãos de pólen. A polinização é preferencialmente entomófila (BARROSO, 1991).

As cultivares de gérbera apresentam grande variabilidade, em decorrência do melhoramento genético, que teve início com a hibridação de duas espécies sul-africanas, *G. jamesonii* e *G. viridifolia*, que originou a *Gerbera hybrida* Hort. Este híbrido é diplóide funcional e carrega cromossomos ou fragmentos de cromossomos de outras espécies de gérbera. Híbridos naturais destas duas espécies não foram encontrados (HANSEN, 1985). É possível também que outras espécies de gérberas tenham sido utilizadas no melhoramento, mas não se tem informação sobre isso (TEERI et al., 2006).

O desenvolvimento de cultivares do gênero tem sido realizado, principalmente, na Holanda, Dinamarca, França, Alemanha, Japão, Israel e Estados Unidos. No Brasil, a implementação de programas de melhoramento é de grande importância, para garantir a independência e autonomia na produção desta espécie ornamental. No entanto, para o desenvolvimento de programas de melhoramento baseados no cruzamento sexual, há a necessidade de maior conhecimento em relação à expressão sexual e sistema reprodutivo em gérbera, especialmente quanto à ocorrência de geitonogamia, que é a polinização por flores vizinhas, porém do mesmo indivíduo. Segundo Souza et al. (2005), em gérbera há a exposição sucessiva de flores femininas, situadas na parte externa da inflorescência, com estigma

receptivo, e, por último, as flores masculinas, com a liberação do pólen, o que caracteriza dicogamia do tipo protogínica. No entanto, alguns estigmas poderiam, ainda, estar receptivos durante a liberação do pólen, acarretando a autogamia do tipo geitonogamia. Se isto realmente ocorre, há a necessidade de se realizar a emasculação das flores bispóricas para se ter certeza da origem dos parentais dos híbridos. Segundo Frankel & Galun (1977), a dicogamia em plantas protogínicas pode ser superada, na ausência de pólen de fora, através da autopolinização por emergência tardia da antera. A *Gerbera viridifolia* é um exemplo de espécie em que pode ocorrer este fenômeno. Além disso, há que ser investigada a ocorrência de apomixia em gérbera, pois em estudos de Werpachowski et al. (2004) este gênero é referido como tal, embora outros autores não façam menção a tal tipo de sistema reprodutivo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão sexual das flores componentes dos capítulos de gérbera e do sistema reprodutivo preponderante, com a finalidade de auxiliar nos programas de melhoramento de gérbera no Brasil.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

A sexualidade das flores foi verificada em treze acessos de gérbera, sendo seis cultivares com aptidão para corte (Cariba (A1), Amazone (A2), Pink Elegance (A3), Terra Fame (A4), Azteca (A5) e Tennessee (A6)) e sete não comerciais coletados em jardins do Rio Grande do Sul (A9, A10, A11 e A12) e Espírito Santo (A7, A8 e A13). Junto ao Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF)

estão tombadas exsicatas dos acessos A7 (RSPF-11.315), A8 (RSPF-11.316), A9 (RSPF-11.325), A10 (RSPF-11.326), A11 (RSPF-11.327), A12 (RSPF-11.318) e A13 (RSPF-11.317).

A Tabela 1 apresenta a denominação, características e procedência desses materiais. As plantas foram obtidas através de divisão de touceira, constituindo, portanto, clones da planta-mãe. As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno com diâmetro de 25 cm e capacidade para cinco litros de substrato, sendo este composto por uma mistura de Rendimax Floreira (composto de turfa e vermiculita) e casca de arroz carbonizada, em igual proporção. Esse substrato apresentou densidade de 345g, 70% de porosidade, pH 6,4 e condutividade elétrica de 0,66 mS.

Tabela 1 - Denominação, procedência e características gerais de acessos de gerbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Acessos	Procedência	Classificação comercial quanto ao tipo de capítulo	Coloração
a) Comerciais ( <i>G. hybrida</i> )			
A1 cv. Cariba	ProClone*	Semi-dobrado	Vermelho
A2 cv. Amazone	ProClone	Simples	Amarelo-alaranjado
A3 cv. Pink Elegance	ProClone	Dobrado	Rosa claro
A4 cv. Terra Fame	ProClone	Simples	Amarelo
A5 cv. Azteca	ProClone	Simples	Vermelho
A6 cv. Tennessee	ProClone	Simples	Salmão
b) Não comerciais ( <i>Gerbera</i> sp.)			
A7	Vila Velha - ES,	Semi-dobrado	Amarelo
A8	Vila Velha - ES	Simples	Rosa
A9	Casca - RS	Simples	Rosa
A10	Passo Fundo - RS	Simples	Rosa
A11	Casca - RS	Dobrado	Salmão-avermelhado
A12	Passo Fundo - RS	Dobrado	Branco
A13	Vila Velha - ES	Simples	Salmão

\* ProClone: Empresa ProClone Comércio de Mudas e Matrizes - ME, Holambra - SP.

O experimento foi conduzido em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, a 28°15' S, 52°24' W e a 687 metros de altitude, entre outubro de 2005 e abril de 2006. O clima da região é subtropical úmido (Cfa), segundo Köppen (MORENO, 1961). Na Figuras 1 estão apresentada as temperaturas médias registradas no interior do ambiente de cultivo e normais regionais ocorridas durante o período experimental.

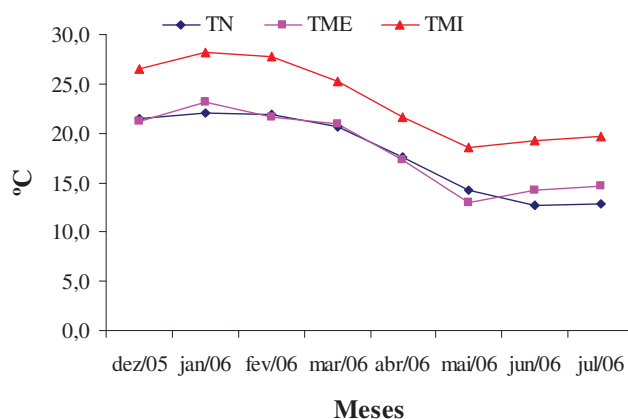


Figura 1 - Temperaturas médias externa (TME), interna (TMI) e normais regionais (TN) durante o período experimental.

As plantas foram cultivadas no mesmo local e receberam os mesmos tratamentos culturais (irrigação manual, aplicação de fertilizantes líquidos e tratamentos fitossanitários) descritos anteriormente, no Capítulo I.

As avaliações iniciaram por ocasião do florescimento das plantas, em janeiro de 2006, quando foram retirados oito capítulos de cada acesso, tão logo tivessem atingido o estágio comercial, ou seja, quando as duas fileiras de flores do disco estavam abertas. De cada



capítulo foram retiradas e avaliadas cinco flores de cada tipo (raio, *trans* e disco), totalizando quarenta flores de cada tipo avaliadas e, no geral, cento e vinte flores por acesso. As flores foram examinadas individualmente, sob microscópio estereoscópico, mediante a verificação dos verticilos de reprodução. A funcionalidade do gineceu nas flores do disco foi realizada através da visualização da existência ou não de óvulo. A documentação das estruturas observadas foi realizada através de fotos, sendo avaliado a presença e ausência de órgãos reprodutores femininos (pistilo, ovário, óvulo) e masculinos (estames) e a porcentagem de flores com óvulo.

Para investigação do sistema de reprodução, ocorrência de geitonogamia e apomixia, foram utilizadas três cultivares comerciais Cariba (A1) de capítulo semidobrado, Pink Elegance (A3) de capítulo dobrado e Terra Fame (A4) de capítulo simples. Cinco tipos de isolamento floral foram realizados através da remoção de cada tipos de flores (raio, *trans* e disco): tratamento 1, não foram retiradas flores, o capítulo foi deixado completo; tratamento 2, foram removidas do capítulo as flores *trans* e do disco; tratamento 3, foram retiradas as flores do raio e *trans*; tratamento 4 foram deixadas no capítulo somente as flores *trans*, e no tratamento 5, foram removidas apenas as flores do disco. O tratamento 1 foi realizado para investigar a ocorrência de geitonogamia no capítulo, os tratamentos 2, 4 e 5 para avaliar a ocorrência de apomixia e o tratamento 3 para excluir a possibilidade de geitonogamia e autofecundação das flores do disco. A Figura 2 apresenta os cinco tratamentos realizados. Para cada tratamento de isolamento foram realizadas três repetições, sendo a unidade experimental, um capítulo.

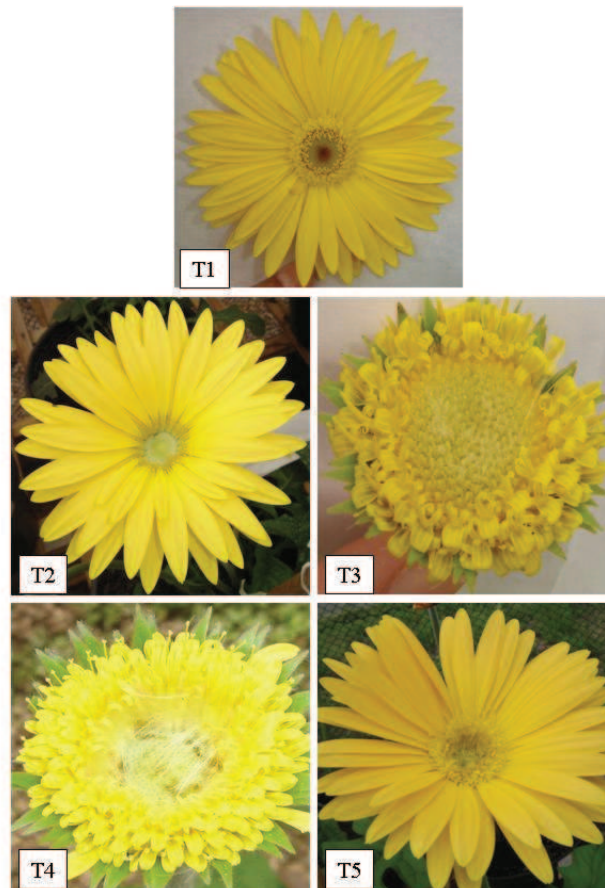


Figura 2- Tratamentos de isolamento de flores: T1 capítulo inteiro; T2 capítulo somente com as flores do raio; T3 capítulos somente com as flores do disco; T4 capítulos somente com as flores *trans* e T5 capítulos com somente as flores do raio e flores *trans*.

Após a manipulação, os capítulos foram protegidos com papel manteiga, sendo debulhados após 30 dias para avaliação dos aquênios.

Foi avaliada a ocorrência de formação de sementes através da germinação dos aquênios, em caixas gerbox, sob papel filtro

umedecidos com solução de 0,2% de nistatina e 0,02% de estreptomicina, e mantidos em câmara BDO, a 24°C e ausência de luz. Sementes comerciais da empresa ISLA foram utilizadas como testemunha. A avaliação da germinação foi realizada aos 14 dias, mediante a verificação da emissão da radícula.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão sexual da planta individual de gérbera, com base nos critérios de Frank & Galun (1977) é ginomonóica, pois apresenta ambas as flores, hermafroditas e femininas.

Em relação à expressão sexual das flores individuais, as flores do raio e *trans* apresentaram-se pistiladas férteis (sin: feminina, monospórica feminina) e as flores do disco hermafroditas (sin: bispóricas) (Figura 3).

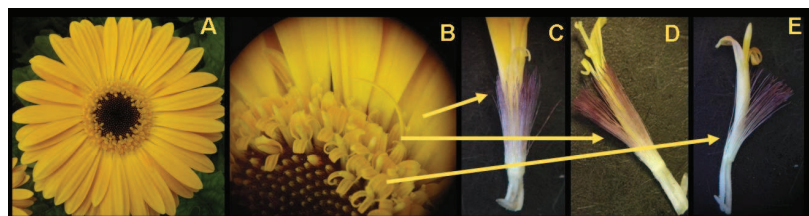


Figura 3 - Tipos de flores encontradas no capítulo de gérbera: A) vista geral do capítulo; B) localização dos três diferentes tipos morfológicos de flores (raio, *trans* e disco); C) flor do raio feminina, fértil (com óvulo) e corola bilabiada-ligulada com lábio externo tridentado e interno bífido; D) flor *trans*, feminina, com óvulo e corola bilabiado-ligulada com lábio externo tridentado e interno bífido e E) flor do disco, andróginas, férteis ou estéreis, com corola bilabiada.

Nas flores do raio e *trans* constatou-se a ocorrência do processo de feminilização, no qual as anteras param num estágio

intermediário de desenvolvimento resultando na formação de estaminódios não funcionais (antras atrofiadas não funcionais) (YU et al., 1999). Segundo Teeri et al. (2006) as flores do raio são pistiladas e abrigam as sementes após a polinização.

Já as flores do disco podem ser consideradas hermafroditas, havendo variação quanto à presença de óvulos no ovário. O ovário em gérbera é do tipo aderente. As flores do disco podem ser agrupadas em duas categorias: hermafroditas funcionalmente masculinas e hermafroditas férteis.

Nos acessos Cariba, Terra Fame, Tennessee, A11 e A12 as flores do disco não produziram óvulos, sendo, funcionalmente, masculinas. Nestes acessos, devido a não haver óvulo, as partes superiores do pistilo, estilete e estigma, exerceriam apenas a função de levar os grãos de pólen para fora do tubo das antras, no mecanismo de liberação de pólen denominado “embolo”.

Em Amazone, Pink Elegance, A7, A8, A9 e A13 todas as flores do disco formaram óvulos, sendo consideradas hermafroditas férteis. No entanto, dois acessos variaram quanto à percentagem de flores funcionalmente hermafroditas: o Azteca apresentou 30% das flores do disco com óvulo e o acesso A10, somente 6%.

Os dados obtidos discordam de Souza et al. (2005), que relataram à existência de somente dois tipos de flores em gérbera: femininas e masculinas. Nossas observações indicam que, na gérbera, não há flores masculinas. O que ocorre é que as flores hermafroditas (flores do disco) expõem primeiramente os estames, e, posteriormente, os estigmas. Essas observações corroboram com os relatos de Kotilainen et al. (1999) e Teeri et al. (2006), de que na gérbera as

flores do raio e as *trans* são femininas e as flores do disco são hermafroditas.

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

Quanto à determinação do sistema reprodutivo, os aquênios coletados nos diferentes tratamentos de remoção de flores se diferiram das “sementes” comerciais, pelo seu tamanho. Morfologicamente, os aquênios comercialmente disponíveis, que são frutos que contém uma única semente, são maiores, indicando que houve a fecundação e o desenvolvimento do fruto e da semente, enquanto que nos aquênios coletados nos tratamentos de remoção floral isso não foi observado (Figura 4).

Com a colocação dos aquênios em condições ótimas de temperatura e umidade, para fins de obtenção das plântulas, observou-se que aqueles oriundos de flores isoladas não germinaram, indicando a ausência de semente. Alguns aquênios coletados e também “sementes” comerciais foram dissecados e observados em microscópio estereoscópico. Nos aquênios coletados observou-se apenas o óvulo desidratado, necrosado, enquanto que nas “sementes” comerciais estes se apresentavam desenvolvidos e com coloração

branca. As “sementes” obtidas no comércio local germinaram, numa taxa de 84%.



Figura 4 – Aspecto dos aquênios de gérbera: em “A” aspecto dos aquênios coletados nos diferentes tratamentos de remoção de flores; em B, sementes comerciais de gérbera híbrida.

Apesar de Souza et al. (2005) sugerirem a realização da emasculação das flores hermafroditas, em decorrência de terem observado a liberação dos grãos de pólen por estas enquanto ainda havia flores femininas com estigmas receptivos, constatou-se neste trabalho que ela não é necessária.

A não formação de sementes no tratamento onde o capítulo permaneceu completo e protegido indica que não é necessário realizar a emasculação das flores hermafroditas para fins de cruzamentos, pois no capítulo de gérbera não ocorre a geitonogamia devido à protoginia. No entanto, a geitonogamia não está descartada na planta, pois o pólen de um capítulo da planta pode fecundar um outro capítulo da mesma planta, devido a isso, os capítulos selecionados para a hibridação

devem ser protegidos para evitar a contaminação por pólen não desejado. Em um estudo realizado paralelamente, com o acesso não comercial A8, no qual capítulos completos foram protegidos, também não foi observada a formação de sementes.

A não formação de sementes nos capítulos completos e protegidos, juntamente com a constatação de alta viabilidade do pólen em gérbera, verificada no Capítulo III, indica ser necessário a presença de polinizadores ou a hibridação artificial para obter-se formação de sementes. Souza et al. (2005) também constataram a não formação de sementes em flores das variedades híbridas sem a polinização manual.

Em relação à ocorrência de apomixia, uma vez que há citação deste tipo de reprodução para o gênero *Gerbera* (Nygren apud WERPACHOWSKI et al., 2004), não foi constatado indícios deste processo nos acessos avaliados, pois não houve formação de sementes nos tratamentos de isolamento, onde foram removidas as flores do disco, hermafroditas e com anteras funcionais e com grãos de pólen viáveis.

#### **4 CONCLUSÕES**

As flores do raio e *trans* em gérbera são femininas férteis e as flores do disco são hermafroditas, podendo estas últimas serem hermafroditas férteis ou hermafroditas funcionalmente masculinas.

Há variação na fertilidade das flores hermafroditas em função do acesso.

Não há indícios de ocorrência de apomixia nos acessos de gérbera avaliados.

Não há ocorrência de geitonogamia do capítulo de gérbera, porém a ocorrência desta na planta não está descartada.

Para realizar a hibridação em gérbera não é necessário realizar a emasculação das flores do disco (hermafrodita), mas para não haver contaminação de pólen não desejável é necessário proteger o capítulo.



### CAPÍTULO III

#### CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, VIABILIDADE DE PÓLEN E HIBRIDAÇÃO ARTIFICIAL EM GÉRBERA

RAQUEL DALLA LANA CARDOSO<sup>1</sup>, MAGALI FERRARI  
GRANDO<sup>2</sup> E SIMONE MEREDITH SCHEFFER-BASSO<sup>3</sup>

**RESUMO** – Este trabalho foi conduzido com o objetivo de confirmar o número de cromossomos em cultivares de *Gerbera hybrida* Hort., determinar o número de cromossomos em acessos não comerciais de *Gerbera* sp., avaliar a viabilidade de pólen e a possibilidade de cruzamentos entre cultivares e acessos não comerciais. Foram coletados ápices de raiz e pólen de cultivares (Amazone, Cariba, Terra Fame, Pink Elegance, Azteca e Tennessee) e sete acessos não comerciais coletados em jardins do Rio Grande do Sul e Espírito Santo. O material foi corado com carmim acético 45%. A contagem dos cromossomos foi realizada em células metafásicas intactas e a estimativa de viabilidade de pólen realizada através da contagem do

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do programa de Pós-Graduação em Agronomia, (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV)/ Universidade de Passo Fundo (UPF), Área de concentração em Produção Vegetal – raqueldcardoso@bol.com.br

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, PhD., professora da FAMV/PPGAgro/UPF – magali@upf.br

<sup>3</sup> Co-orientadora, Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., professora do PPGAgro e do ICB do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UPF – sbasso@upf.br.

número de grãos de pólen viáveis e não viáveis. A possibilidade de cruzamento entre as cultivares e entre as cultivares e acessos não comerciais foi avaliada através da hibridação entre os genitores femininos, cv. Terra Fame e acesso A8, e masculinos, cvs. Cariba e Azteca. Todos os acessos apresentaram cinquenta cromossomos, independente dos acessos serem híbridos comerciais ou não comerciais, de apresentarem capítulos simples, semidobrados ou dobrados. A viabilidade do pólen variou de 87,67% a 99,27%. A formação de sementes foi de 4,46% nos cruzamentos entre cultivares e de 50% entre o A8 e as cultivares.

**Palavras-chave:** *Gerbera hybrida*, cromossomos, cruzamentos, melhoramento de ornamentais, semente

#### **CHROMOSOMES NUMBER, POLLEN VIABILITY AND HYBRIDIZATION IN GERBERA**

**ABSTRACT** – This work was conducted with the objective of to confirm the chromosomes number of *Gerbera hybrida* Hort. cultivars, to determine the chromosomes number in the non commercial accesses of *Gerbera* sp., and to estimate the pollen viability and the possibility of crossings among different accesses. Root apexes and pollen cultivars (Amazone, Cariba, Terra Fame, Pink Elegance, Azteca and Tennessee) and seven non-commercial accesses collected from gardens of Rio Grande do Sul and Espírito Santo states. The collected material was stained with acetic carmim 45%. The chromosome counting was performed in metafasic intact cells and the

pollen viability estimated by counting the number of viable and non viable pollen grains. The crossing possibility among the cultivar and among cultivars and non commercial accesses was evaluated through the hybridization between the feminine genitors cv. Terra Fame and A8 and masculine, cvs. Cariba and Azteca. All of the accesses presented 50 chromosomes, independent to be commercial hybrid or non commercial accesses, and present simple, semidouble or double capitulum. The evaluated accesses presented high pollen viability, varying from 87,67% to 99,27. The seed formation was 4,46% in the crossings among cultivars, and 50% among cultivar and non commercial access of gerbera.

**Key words:** *Gerbera hybrida*, *Gerbera* sp., chromosomes, crossing, ornamental breeding, seed

## 1 INTRODUÇÃO

A gérbera (*Gerbera* spp.) é uma planta perene, herbácea, da Família Asteraceae. O gênero compreende cerca de 30 espécies distribuídas pela África, Madagascar, Ásia tropical e uma espécie originada nos Andes do Peru, América do Sul (BARROSO, 1991). As cultivares modernas da gérbera híbrida (*Gerbera hybrida* Hort), são, na sua maioria, originadas do cruzamento entre *G. jamesonii* H. Bolus ex Hook e *G. viridifolia* Schultz Bip. Híbridos naturais destas duas espécies não foram encontrados (KLOSS et al., 2005a; SANE & GOWDA, 2005).

A maioria dos programas de melhoramento e desenvolvimento de cultivares vem sendo realizada na Holanda, Dinamarca, França, Alemanha, Japão e Israel (KLOSS et al., 2005a), 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 diplóides ( $2n=50$ ) (REYNOIRD et al., 1993; SANE & GOWDA, 2005).

A gérbera híbrida apresenta grande variabilidade morfológica dos capítulos, que são classificados comercialmente em simples, semidobrados e dobrados. Além dos híbridos comerciais, são encontrados, em jardins residenciais, gérbera de origem desconhecida, das quais não se sabe sobre o número de cromossomos. Esta informação é importante para viabilizar os cruzamentos com as cultivares, pois estes materiais podem consistir fontes de variabilidade, principalmente, para a obtenção de plantas mais adaptadas às condições climáticas regionais. Além disso, para se ter sucesso nos cruzamentos é

necessário acessar a viabilidade do pólen e verificar a compatibilidade do genoma em nível cromossômico.

O número de cromossomos é um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização de uma espécie e para a determinação de estratégias a serem empregadas no melhoramento genético. Já, o estudo da viabilidade de pólen permite evidenciar a potencialidade reprodutora masculina contribuindo para o planejamento do melhoramento. Em gérbera não foram encontrados trabalhos relacionados à viabilidade de pólen, mas há estudos relacionados à taxonomia (WODEHOUSE, 1929), morfologia (LIN et al., 2005) e desenvolvimento da exina em *G. jamesonii* (SOUTHWORTH, 1983).

Objetivou-se neste trabalho confirmar o número de cromossomos em gérbera híbrida, determinar o número de cromossomos em acessos não comerciais, avaliar a taxa de viabilidade do pólen e a possibilidade de cruzamentos entre cultivares e acessos não comerciais mediante a hibridação artificial.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Para análise cromossômica e da viabilidade do pólen foram utilizados treze acessos de gérbera incluindo seis cultivares para corte (Cariba (A1), Amazone (A2), Pink Elegance (A3), Terra Fame (A4), Azteca (A5) e Tennessee (A6)) e sete acessos não comerciais coletados em jardins do Rio Grande do Sul (A9, A10, A11 e A12) e Espírito Santo (A7, A8 e A13). Junto ao Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF) estão tombadas as exsicatas dos acessos A7 (RSPF-11.315), A8 (RSPF-11.316), A9 (RSPF-11.325), A10 (RSPF-

11.326), A11 (RSPF-11.327), A12 (RSPF-11.318) e A13 (RSPF-11.317).

A Tabela 1 apresenta a denominação, características e procedência desses materiais. As plantas foram obtidas através de divisão de touceira, constituindo, portanto, clones da planta-mãe. As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno com diâmetro de 25 cm e capacidade para cinco litros de substrato, sendo este composto por uma mistura de Rendimax Floreira (composto de turfa e vermiculita) e casca de arroz carbonizada, em igual proporção, Esse substrato apresentou densidade de 345g, 70% de porosidade, pH 6,4 e condutividade elétrica de 0,66 mS.

Tabela 1 - Denominação, procedência e características gerais de acessos de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

<b>Acessos</b>	<b>Procedência</b>	<b>Classificação comercial quanto ao tipo de capítulo</b>	<b>Coloração</b>
<b>a) Comerciais (<i>G. hybrida</i>)</b>			
A1 cv. Cariba	ProClone*	Semi-dobrado	Vermelho
A2 cv. Amazone	ProClone	Simples	Amarelo-alaranjado
A3 cv. Pink Elegance	ProClone	Dobrado	Rosa claro
A4 cv. Terra Fame	ProClone	Simples	Amarelo
A5 cv. Azteca	ProClone	Simples	Vermelho
A6 cv. Tennessee	ProClone	Simples	Salmão
<b>b) Não comerciais (<i>Gerbera</i> sp.)</b>			
A7	Vila Velha – ES	Semi-dobrado	Amarelo
A8	Vila Velha – ES	Simples	Rosa
A9	Casca – RS	Simples	Rosa
A10	Passo Fundo - RS	Simples	Rosa
A11	Casca – RS	Dobrado	Salmão-avermelhado
A12	Passo Fundo - RS	Dobrado	Branco
A13	Vila Velha – ES	Simples	Salmão

\* ProClone: Empresa ProClone Comércio de Mudas e Matrizes – ME, Holambra – SP.

O experimento foi conduzido em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, a 28°15' S, 52°24' W e a 687 metros de altitude, entre outubro de 2005 e abril de 2006. O clima da região é subtropical úmido (Cfa), segundo Köppen (MORENO, 1961). As temperaturas médias ocorridas durante o período experimental e registradas no interior do ambiente de cultivo, bem como as normais regionais, estão na Figura 1. O cultivo das plantas ocorreu em ambiente semi-protegido, constituído por uma cobertura impermeável (filme de polietileno de baixa densidade leitoso, de 0,15mm de espessura) e nas laterais malha de sombreamento 50% fixa, com cortinas móveis de plástico transparente, a qual permitia uma média de transmitância de radiação solar global de 30%.

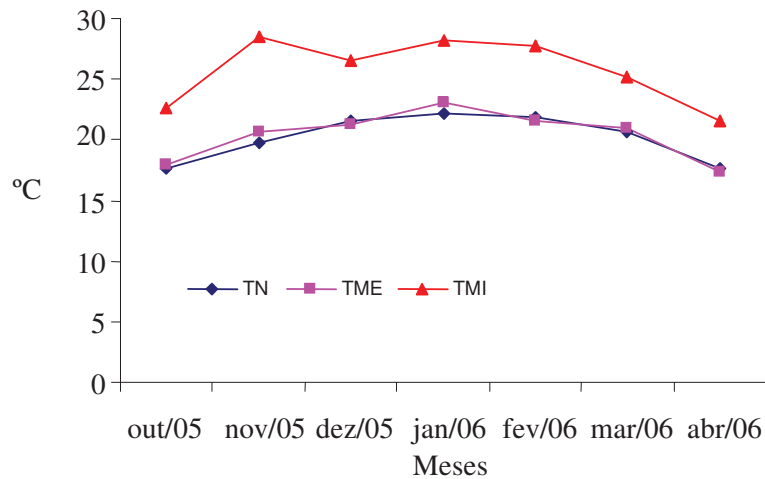


Figura 1 - Temperaturas médias externa (TME), interna (TMI) e normais regionais (TN) durante o período experimental. Passo Fundo, RS, 2005-2006.

Durante o período experimental, 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).

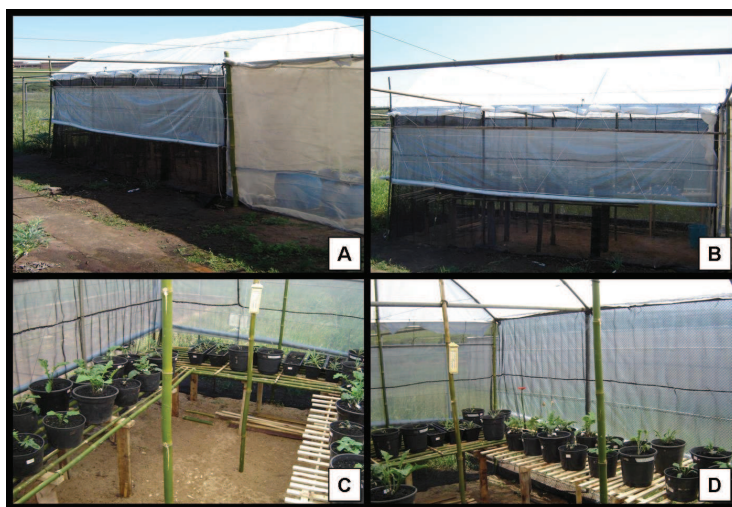


Figura 2 – Aspecto do ambiente semi-protegido onde foram cultivados os acessos de gérbera. Em A e B, aspecto externo, e em C e D, aspecto do interior. Passo Fundo, RS, 2005-2006.

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

Solução A		Solução B	
Nitrato de cálcio	0,8 g.L <sup>-1</sup>	Nitrato de potássio	0,7 g.L <sup>-1</sup>
Nitrato de amônia	0,4 g.L <sup>-1</sup>	Sulfato de magnésio	0,6 g.L <sup>-1</sup>
Tenso Ferro	0,01 g.L <sup>-1</sup>	MAP	0,15 g.L <sup>-1</sup>
Bórax	0,001 g.L <sup>-1</sup>	Tenso Cocktail	0,01 g.L <sup>-1</sup>

Fonte: Guiselini, 2002.

Durante o experimento foram aplicadas soluções de fungicida (tebuconazole a 0,5 mL.L<sup>-1</sup>) 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 (parathion methyl a  $0,7 \text{ mL.L}^{-1}$ ) para controle do pulgão e tripes (*Frankliniella* sp.).

As análises de viabilidade de pólen e caracterização citogenética (contagem do número de cromossomos) foram realizadas no Setor de Citogenética do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo.

Para determinar o número de cromossomos foram utilizadas três repetições para cada acesso comercial e duas para os acessos não comerciais. Cada repetição constitui-se de um vaso, com um clone da planta-mãe. Ápices de raiz foram coletados de cada uma das repetições e pré-tratados com gelo por 24 horas, fixados em uma mistura de álcool etanol e ácido acético (3:1 v/v) por 24 horas, seguindo da hidrólise com HCl 1N a  $60^{\circ}\text{C}$  por 13 minutos e coloração com carmim acético 45%. Foram preparadas três lâminas para cada acesso, sendo avaliadas dez células metafásicas com núcleo intacto por lâmina, totalizando trinta células avaliadas por acesso. As análises foram realizadas em microscópio ótico com aumento de 1000X, as metáfases avaliadas registradas no computador, por programa PixelView, com aumento de 1000X.

Para a estimativa de frequência da viabilidade de pólen foi coletado pólen de quatro capítulos por acesso durante a antese. A coloração dos grãos de pólen foi realizada com carmim acético 45% com posterior observação em microscópio ótico. Foram preparadas quatro lâminas por acesso, avaliando-se 1000 grãos de pólen por lâmina, totalizando 4000 grãos de pólen por acesso. Considerou-se pólen viável àqueles com tamanho visivelmente normal, protoplasma

corado e com a exina intacta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo Teste Tukey a 5%.

Após a obtenção dos dados referentes ao número de cromossomos, viabilidade de pólen, foram realizados cruzamentos, entre maio e junho de 2007. As temperaturas médias obtidas nestes meses no interior do ambiente semi-protegido foram respectivamente de 17,5° C e 18,8° C. Foram utilizados como genitores femininos dois acessos de capítulo simples (cv. Terra Fame e o A8), e como genitores masculinos duas cultivares, cv. Cariba (A1) e cv. Azteca (A5) (Figura 3). Foram polinizados quatro capítulos de cada um dos genitores femininos.

A escolha dos progenitores masculinos foi feita em função de, visualmente, serem os de maior produção de pólen, comparado com os demais acessos, e por terem apresentado alta viabilidade do mesmo. Já os genitores femininos, ambos com capítulos simples, foram selecionados em virtude da facilidade de manuseio e observação da receptividade do estigma, o que é dificultado em capítulos semidobrados e dobrados devido à sobreposição dos lábios das flores que encobrem os estigmas. Em estudo anterior, capítulo dois desta dissertação, os acessos A4 e A8, foram examinados quanto à ocorrência de geitonogamia e apomixia e não apresentando indícios deste, sendo desnecessária a emasculação.

Previamente, antes de realizar os cruzamentos, quatro capítulos selecionados do acesso A4 e do A8 foram protegidos com papel manteiga, para evitar polinizações indesejadas. A hibridação foi realizada na ocasião em que os estigmas estavam receptivos, sinalizada pelos seus ramos abertos (Figura 3).

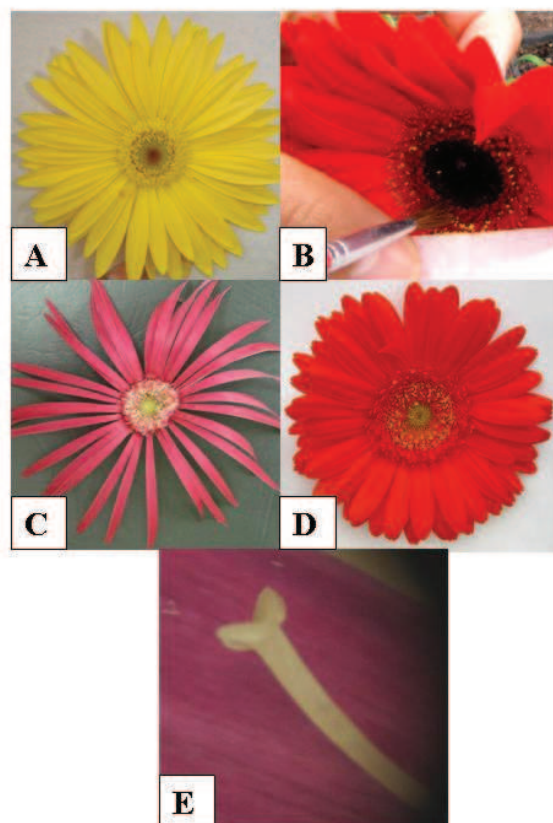


Figura 3 – Acessos utilizados nos cruzamentos: A) Terra Fame (A4); B) Azteca (A5); C) Acesso não comercial (A8); D) Cariba (A1) e E) Detalhe do estigma receptivo.

O pólen foi levado ao estigma do progenitor feminino com auxílio de pincel. 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 visa maximizar a produção de sementes devido ao desenvolvimento centrípeto dos capítulos de gérbera. A polinização foi realizada somente nas flores da periferia do

capítulo em virtude das flores do disco serem hermafroditas não funcionais na cv. Terra Fame conforme constatado no estudo de expressão sexual e sistema reprodutivo em gérbera, capítulo dois desta dissertação, e pelo fato destas flores apresentarem desenvolvimento mais tardio.

Após a polinização, os capítulos permaneceram protegidos com papel manteiga, sendo colhidos após trinta dias, para avaliação da formação e número de sementes.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os acessos apresentaram cinquenta cromossomos, ou seja, tanto os acessos comerciais quanto os não comerciais apresentaram o mesmo número de cromossomos, o que indica a possibilidade de sucesso no cruzamento entre eles.

Assim, a variação que se observa no tipo de capítulo (capítulos simples, semidobrado e dobrado) não é devido a mutações cromossômicas numéricas ou poliploidia, pois independente do tipo de capítulo todos os acessos apresentaram exatamente o mesmo número de cromossomos (Figura 4).

Kloss et al. (2004), ao estudarem o modo de herança dos genes que determinam o tipo de capítulo em gérbera, constataram que existe uma dominância incompleta e que gérberas homozigotas dominantes para este gene apresentaram capítulos dobrados, as heterozigotas, capítulos semidobrados e as homozigotas recessivas, capítulos simples.

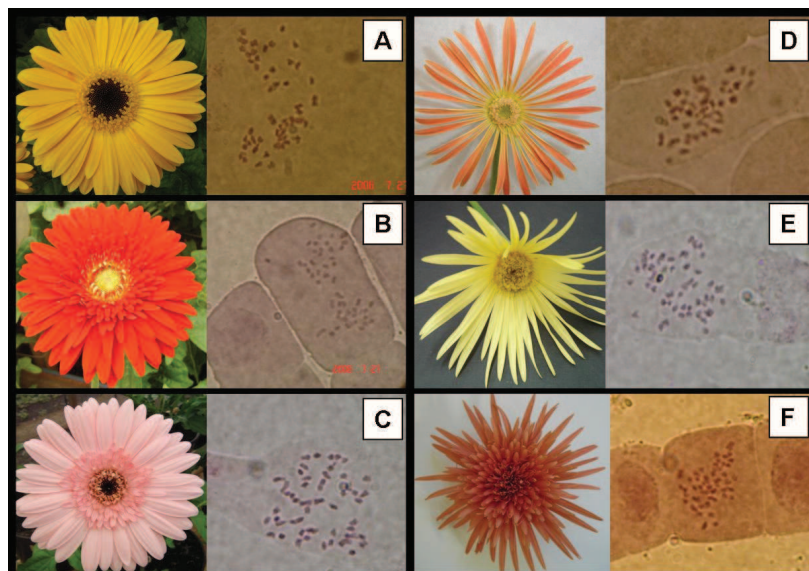


Figura 4 – Aspecto dos capítulos e das lâminas para contagem de cromossomos: A, B e C acessos comerciais, sendo A) simples; B) semidobrado e C) dobrado, e D, E e F acessos não comerciais, sendo D) simples; E) semidobrado e em F) dobrado.

A porcentagem média de viabilidade do pólen foi de 89,6%, apresentando variação entre os acessos ( $P < 0,05$ ). O acesso A11 apresentou a menor frequência de pólen viável (Tabela 3). A figura 5 mostra aspectos dos grãos de pólen observados neste estudo. A produção de pólen foi menor nos capítulos dobrados, sendo necessário macerar as anteras e corar para poder avaliar a viabilidade, o que não foi necessário nos capítulos simples e semidobrados. Nestes tipos de capítulo, os grãos de pólen foram liberados pelo processo de “êmbolo” descrito por Cassini (1826-1834), facilitando a coleta com pincel. De acordo com Kloss et al. (2004), as flores do disco de capítulos simples normalmente produzem mais pólen que as flores do disco de capítulos semidobrados e dobrados.

Tabela 3 – Frequência de pólen viável em acessos comerciais e não comerciais de gérbera

Acessos	Viabilidade do pólen	
A1 Cariba	98,775	a
A2 Amazone	96,825	a
A3 Pink Elegance	98,200	a
A4 Terra Fame	98,350	a
A5 Asteca	97,175	a
A6 Tennessee	99,275	a
A7	98,450	a
A8	96,050	a
A9	97,925	a
A10	96,875	a
A11	87,675	b
A12	97,725	a
A13	98,825	a

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste Tukey 5%.

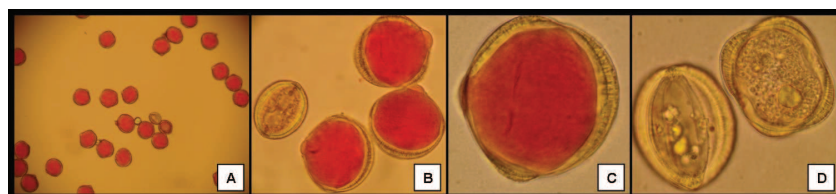


Figura 5- Aspecto das lâminas com grãos de pólen. A) Pólen viáveis (aumento 100x), B) Pólen viáveis corados e pólen não viável (aumento de 400x), C) Pólen viável e D) Pólen não viável (aumento de 1000x).

Os acessos A3 e A11, ambos dobrados, apresentaram antera com coloração rosa e marrom claro na antese. Segundo Kloss et al. (2004) a coloração marrom e cinza observada em anteras de capítulos dobrados, indica deterioração das mesmas, o que é ocasionada pelo acondicionamento apertado das flores do disco neste tipo de capítulo, o que resulta na esterilidade, ausência ou baixa

produção de grãos de pólen. Já, para os capítulos simples e semidobrados, as anteras apresentaram coloração amarela, que esta dentro da variação observada por Kloss et al. (2004) para anteras de gérberras com capítulo simples a qual variou de amarelo a alaranjado. O acesso A12 (capítulo dobrado) apresentou anteras amarelas.

Após a polinização os estigmas ficaram escuros (Figura 6) e no decorrer de alguns dias a corola murchou, se desprendendo do receptáculo floral. Isso, geralmente, é indício de que houve a fertilização e que pode haver sucesso nos cruzamentos. De acordo com Floss (2004) quando os processos de polinização e fertilização ocorrem com sucesso numa flor, a formação da semente estimula o crescimento do ovário, bem como de algumas partes da flor, tais com estame e pistilo, que degeneram e caem.



Figura 6 – Aspecto do estigma das flores polinizadas: A) aspecto do estigma sendo polinizado; B) estigma após polinização; C) aspecto do capítulo após polinização, mostrando os estigmas escuros, sinal de fertilização.

Em ambos os cruzamentos a formação de sementes foi observada nas flores da periferia, ou seja, flores *trans* e do raio, o que era esperado visto que não foi realizada a polinização nas flores do disco devido a outros autores, Souza et al. (2005) e Teeri et al.(2006), relatarem também a ocorrência de formação de sementes somente nas flores da periferia do capítulo, ou seja, nas flores do raio e *trans*. Outro fator contribui para a decisão de não polinizar as flores do disco, foi à constatação em estudo anterior, no estudo de expressão sexual (capítulo II desta dissertação), de que há variação na presença de óvulo nestas flores, sendo que as flores do disco do acesso A4 não apresentavam óvulos. Em decorrência disto, as flores do disco não foram contabilizadas na análise de formação de sementes.

A frequência e o número de sementes formadas estão apresentados na Tabela 4. A ausência de sementes em duas repetições dos cruzamentos entre acessos comerciais e duas repetições de acessos comerciais e não comerciais, foi devido à ocorrência de fungos saprofitos (*Botrytis* sp.), que surgiram durante a senescência dos capítulos. Em decorrência disto, estas quatro repetições foram excluídas para evitar o mascaramento dos resultados.

No cruzamento do acesso A4 com Cariba e Asteca, a formação de sementes foi de 4,46% e no cruzamento do acesso A8 x Cariba e A8 x Asteca, a frequência foi de 50% (Tabela 4). A produção de sementes nos cruzamentos indica que as flores femininas eram férteis e que os acessos eram compatíveis, demonstrando a possibilidade de cruzar híbridos comerciais e acessos não comerciais.



Tabela 4 – Cruzamento, número de flores e número de sementes obtidas dos cruzamentos entre os progenitores femininos, cv. Terra Fame e A8 (acesso não comercial), e masculinos cv. Cariba e cv. Azteca. Passo Fundo, RS, 2007

<b>Cruzamento</b>	<b>NF</b>	<b>NS</b>	<b>F</b>
	<b>(Flor do raio + trans)</b>		<b>(NS/NF). 100</b>
Terra Fame x Azteca	92 + 48 = 140	1	
Terra Fame x Azteca	101 + 50 = 151	12	
<b>Total</b>	<b>291</b>	<b>13</b>	<b>4,46%</b>
A8 x Cariba	63 + 37 = 100	62	
A8 x Azteca	62 + 34 = 96	36	
<b>Total</b>	<b>196</b>	<b>98</b>	<b>50%</b>

NF = Número de flores; NS = Número de sementes e F = frequência de sementes formadas.

A baixa frequência de formação de sementes no cruzamento entre as cultivares comerciais sugere a existência de algum tipo de incompatibilidade ou depressão endogâmica devido, provavelmente, ao alto grau de parentesco dos parentais, visto que quando o acesso não comercial (A8) foi cruzado com as cultivares houve uma maior formação de sementes. No estudo de divergência genética entre cultivares de gérbera (Capítulo I desta dissertação) verificou-se alto grau de similaridade entre as cultivares Terra Fame, Cariba e Azteca. A dificuldade na obtenção de sementes de gérbera, poderia, em parte, explicar o elevado custo das sementes de gérbera híbrida no mercado.

A auto-incompatibilidade 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 auto-incompatibilidade varia de completa a ausente. Em gérbera são relatados problemas com endogamia em gérbera híbrida, pois a autofecundação reduz seu rendimento (HUANG et al., 1995), ocasiona degeneração da progênie, malformações e esterilidade (MIYOSHI & ASAKURA, 1996).

Outro fator observado, que pode ter contribuído para a baixa formação de sementes nos acessos comerciais, e que merece futuros estudos, foi a condição do escape floral. Esse caule apresentou coloração amarelo-escuro e textura seca, sugerindo problemas na translocação de água e nutrientes, o que pode ter comprometido a formação das sementes, pois nos cruzamentos entre os acessos não comerciais e comerciais, onde houve formação de sementes, o escape permaneceu verde (Figura 7).

Desta forma, outros cruzamentos em maior escala devem ser realizados para verificar a percentagem de sementes e a variabilidade para este caractere. Além disso, é importante avaliar a possibilidade de formação de sementes nas flores do disco naqueles acessos que possuem essas flores hermafroditas férteis (com óvulos), utilizando os acessos não comerciais como genitores femininos.

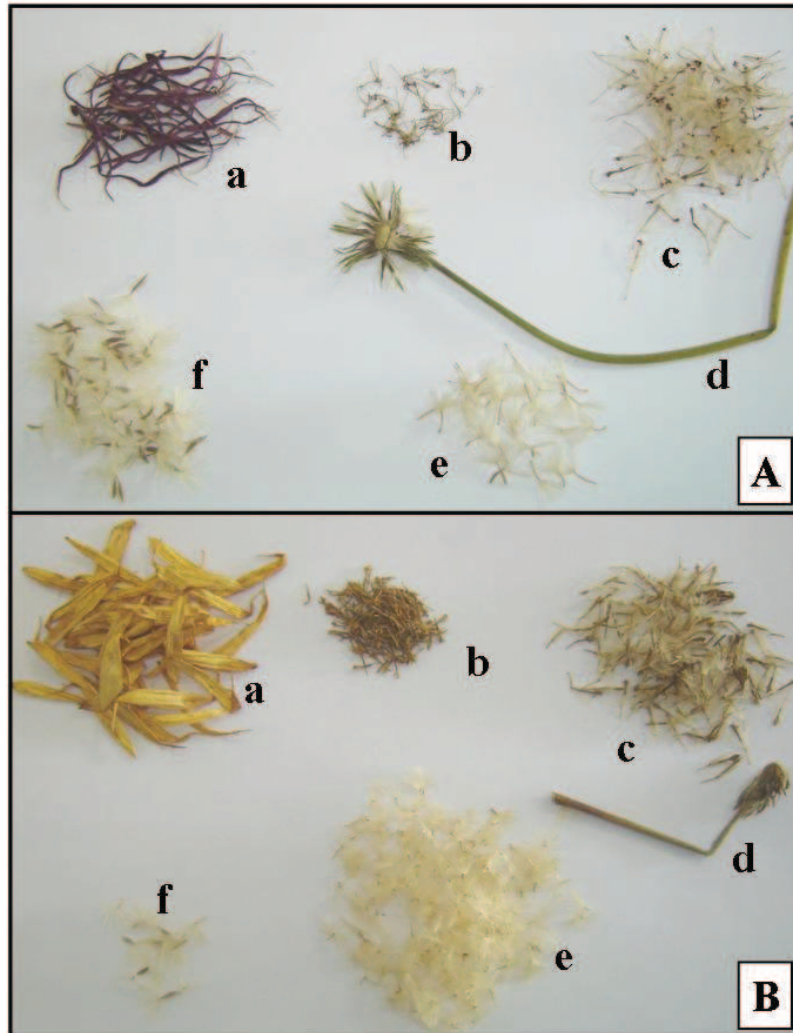


Figura 7 – Aspecto das estruturas obtidas na debulhas dos acessos não comerciais (A) e comerciais (B): corola das flores do raio (a), corola das flores trans (b), flores do disco (c), escapo (d), aquênios que não desenvolveram em semente (e) e sementes (f).

A compatibilidade genômica entre os acessos ( $2n=50$ ), a alta fertilidade do pólen e o sucesso na obtenção de sementes entre as cultivares e acessos não comerciais, e também entre as cultivares, sugere a possibilidade de produção de híbridos com novas combinações e transferência de caracteres desejáveis dos acessos não comerciais para as comerciais.

### **CONCLUSÕES**

O número de cromossomos em gérbera híbrida e em acessos não comerciais é de  $2n = 50$ .

A viabilidade de pólen nos acessos avaliados é alta chegando a 99,27%.

É possível realizar a hibridação entre os acessos comerciais e não comerciais, visando à produção de novos híbridos.

## CAPÍTULO IV

### **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE GÉRBERA VISANDO O EMPREGO DE MARCADORES MOLECULARES**

**RAQUEL DALLA LANA CARDOSO<sup>1</sup>, PAULA ASTOLFI<sup>2</sup> E  
MAGALI FERRARI GRANDO<sup>3</sup>**

**RESUMO** - A gérbera está entre as dez flores de maior importância econômica e a otimização de protocolos de extração de DNA é necessária visto que, este deve apresentar quantidade e pureza adequadas para manipulação molecular, principalmente no que diz respeito às amplificações via PCR para geração de marcadores moleculares. Este trabalho objetivou avaliar a quantidade e qualidade de DNA extraído de quatro genótipos de gérbera, três comerciais (Amazone, Cariba e Terra Fame) e uma não comercial, utilizando quatro diferentes metodologias baseadas no método CTAB 2% (T1 e T2) e DellaPorta (SDS) (T3 e T4). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade determinada pela razão das

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do programa de Pós-Graduação em Agronomia, (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV)/ Universidade de Passo Fundo (UPF), Área de concentração em Produção Vegetal – [raqueldcardoso@bol.com.br](mailto:raqueldcardoso@bol.com.br)

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do ICB.

<sup>3</sup> Orientadora, Bióloga, PhD., professora da FAMV/PPGAgro/UPF – [magali@upf.br](mailto:magali@upf.br)

absorbâncias 260/280 nm. Os dados foram avaliados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Para avaliar a integridade do DNA realizou-se eletroforese (~150V) em gel de agarose 0,8%, sendo o mesmo visualizado e fotografado em Ultravioleta (UV). A qualidade do DNA extraído foi ainda avaliada por restrição enzimática com a endonuclease *Hinf I* e pela amplificação por PCR com primers de actina de arroz e maçã. O método CTAB tradicional produziu 398 ng de DNA por mg de tecido fresco, sendo superior aos demais tratamentos. Este método produziu DNA de alta qualidade (razões de absorbância de 1,86), sendo superior aos tratamentos cujo detergente de extração era o SDS (1,60). O perfil eletroforético do DNA extraído com o detergente CTAB também foi superior ao extraído com SDS, pois este último apresentou DNA altamente degradado. Embora a restrição do DNA pela enzima *Hinf I* tenha sido observada em todos os tratamentos, somente DNA extraído pelo método CTAB (T1 e T2), foi amplificado com ambos os primers. Conclui-se que o método CTAB é um método eficiente para extração de DNA genômico de *gerbera* para uso em técnicas ou marcadores moleculares que empregam a amplificação do DNA como PCR, RAPD e microssatélites.

**Palavras-chave:** *Gerbera* sp, ácidos nucleicos, CTAB, enzima de restrição, PCR, plantas ornamentais, SDS

**EVALUATION OF DIFFERENT METHODS OF GENOMIC  
DNA EXTRACTION FROM GERBERA FOR MOLECULAR  
MARKER PORPOSE**

**ABSTRACT** - Gerbera is between the ten flowers of bigger economic importance and the establishment of DNA extraction protocols is necessary since the DNA must present adjusted amount and pureness for molecular manipulation, mainly in respect to PCR amplification for generation of molecular markers. This work aimed to evaluate the amount and quality of extracted DNA from four genotypes of gerbera, three commercial (Amazone, Cariba and Terra Fame) and one non commercial genotype, being used four different methodologies based on CTAB 2% and DellaPorta (SDS) methods. The DNA was quantified in spectrophotometer and the quality determined by the 260/280nm ratio absorbances. The data was evaluated by the ANOVA and the averages compared by Duncan test at 5% of probability. Eletrophoresis (~150V) in 0.8% agarose gel was performed to evaluated the DNA integrity, being visualized and photographed in Ultraviolet (UV). The quality was also evaluated by enzymatic restriction with *Hinf I* and by amplification using PCR with primers of rice and apple actin. Traditional method CTAB produced 398 ng of DNA, being superior to the other treatments. This method produced DNA of high quality (ratio absorbances of 1.86), being superior to the treatments whose detergent of extraction was the SDS (1.60). The eletrophoretic profile of the DNA extracted with CTAB was also superior to the extracted one with SDS, because this last one presented DNA highly degraded. Although the restriction of the DNA by *Hinf I*

enzyme was observed in all the treatments, only DNA extracted by CTAB method (T1 and T2) was amplified with both primers. It was concluded that CTAB method is efficient for genomic extraction of gerbera DNA for use in molecular techniques as PCR, RAPD and microsatellites.

**Key words:** *Gerbera* sp., CTAB, nucleic acid, ornamentals, PCR, restriction enzyme, SDS



## 1 INTRODUÇÃO

A gébera está entre as dez flores de corte mais procuradas no mercado de plantas ornamentais (TYAGI & KOTHARI, 2003). Além disso, a gébera vem sendo utilizada como uma planta modelo para estudos genéticos, assim como os que foram realizados com a *Arabidopsis thaliana*, devido a ser uma planta com inflorescência composta, apresentar vários padrões de cores e tipos de flores em uma mesma inflorescência (TEERI et al., 2006).

As cultivares de gébera apresentam grande variabilidade morfológica, em função do intenso melhoramento realizado na espécie, o qual teve início com o cruzamento de duas espécies sul-africanas, *Gerbera jamesonii* e *G. viridifolia*, que originaram o híbrido, conhecido como gébera híbrida (*G. hybrida* Hort.). Esta última é uma das plantas mais importantes do mercado mundial de ornamentais, ocupando os primeiros lugares nos leilões de flores, tendo um grande sucesso, tanto no mercado nacional, quanto internacional. Segundo Chung (2001), o sucesso desta espécie se deve pela diversidade de cores, permitindo que mais de trezentas cultivares híbridas sejam lançadas anualmente.

Neste contexto, a utilização de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética facilita a escolha dos pais a serem utilizados em cruzamentos, permitindo calcular a distância genética entre as variedades disponíveis para o melhoramento genético, além de possibilitar a identificação de híbridos. A importância da distância genética entre os pais para o melhoramento vegetal deve-se ao fato de que a superioridade dos híbridos é proporcional à distância genética

entre os seus respectivos progenitores. Deste modo, nas espécies onde esta relação é verificada, os melhoristas podem contar com um critério rápido e fácil na escolha dos progenitores para os programas de hibridação (MOREIRA et al., 1994).

Em ornamentais, os marcadores moleculares vêm sendo utilizados principalmente em estudos de variabilidade genética, entre eles o mais utilizado é RAPD. Entre as espécies em que já se utilizaram os marcadores de RAPD para acessar a variabilidade genética existente temos a *Alstroemeria* (ANASTASSOPOULOS & KEIL, 1996; DUBOUZET et al., 1998), amor-perfeito (KO et al. 1998), *Chrysanthemum* (WOLFF & PETERS-VAN RIJN, 1993), rosa (TORRES et al., 1993; JAN et al., 1999), lírio (YAMAGISHI, 1995), *Limonium* e *Prunus* ornamental (BENEDETTI et al., 2001) e para identificar marcadores moleculares ligados a locus genéticos que controlam o tipo de flor de cravo (SCOVEL et al., 1998). Em gérbera há três trabalhos utilizando marcadores RAPD, o de Chung et al. (2001) que utilizou 80 *primers* para caracterizar 24 cultivares de gérbera e o de Rezende et al. (2006) avaliando a divergência genética entre seis cultivares de gérbera utilizando 21 *primers*. Colombo (dados não publicados) avaliou 42 acessos de gérbera utilizando marcadores RAPD.

De modo geral, estudos moleculares dependem diretamente da qualidade do DNA extraído (ROMANO, 1998). Nas células vegetais a presença de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários se tornam um obstáculo na extração de um DNA de qualidade (ROMANO & BRASILEIRO, 2003). Além disso, os protocolos de rotina nem sempre são reproduzíveis em todas as espécies vegetais.

A maioria dos protocolos de extração é uma variação dos descritos por Doyle & Doyle (1987) e por Dellaporta et al. (1983). A principal diferença destes protocolos consiste no detergente utilizado. A metodologia baseada em Doyle & Doyle utiliza o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Protocolos baseados em Dellaporta et al. (1983) que utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS).

As metodologias de extração de DNA também visam sanar problemas que incluem a degradação do DNA por DNAses endógenas, o co-isolamento de polissacarídeos que possam inibir a ação de enzimas e o co-isolamento de substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que podem danificar o DNA ou também inibir a ação de diversas enzimas de restrição ou da Taq polimerase.

Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de métodos de extração de DNA de gérbera, para futura utilização de marcadores moleculares. Para tal o DNA extraído por diferentes métodos foi quantificado pela espectrofotometria e a qualidade avaliada por eletroforese do DNA genômico, pela restrição enzimática e amplificação do DNA por PCR.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

As plantas utilizadas neste experimento começaram a ser cultivadas em telado em outubro de 2005, na Universidade de Passo Fundo, RS. A Tabela 1 apresenta a denominação, características e procedência desses materiais.

Tabela 1 - Denominação, procedência e características gerais de acessos de gérbera. Passo Fundo, RS, 2005-2006

Acessos	Procedência	Classificação comercial quanto ao tipo de capítulo	Coloração
a) Comerciais ( <i>G. hybrida</i> )			
A1 cv. Cariba	ProClone*	Semi-dobrado	Vermelho
A2 cv. Amazone	ProClone	Simples	Amarelo-alaranjado
A4 cv. Terra Fame	ProClone	Simples	Amarelo
b) Não comerciais ( <i>G. jamesonii</i> )			
A8	Vila Velha – ES	Simples	Rosa

\* ProClone: Empresa ProClone Comércio de Mudas e Matrizes – ME, Holambra – SP.

Os experimentos foram realizados no período de janeiro a março de 2006. A extração do DNA genômico foi realizada no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo (UPF) e a quantificação e análise qualitativa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia – área de genética molecular - do Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de inverno da Embrapa Trigo (Passo Fundo – RS).

As folhas jovens foram coletadas e acondicionadas em gelo para serem transportadas até o laboratório a onde foi realizada a extração do DNA genômico.

Inicialmente, o tecido foliar jovem foi triturado com nitrogênio líquido, sendo utilizados 250-300 mg de tecido por tubo de reação. As análises foram realizadas com seis repetições para cada tratamento. O delineamento utilizado foi o completamente casualizado, sendo que o tratamento consistiu na combinação dos quatro acessos de gérbera e quatro protocolos de extração de DNA, (1-Método CTAB 2%; 2-Método CTAB 2% modificado; 3-Método Dellaporta e 4-Método Dellaporta modificado) como descritos a seguir:

T1 - Método CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987), descrito por Romano e Brasileiro (2003)

O método utiliza duas etapas de clorofórmio/álcool isoamílico como segue: adicionou-se ao tecido foliar 700 µl de tampão de extração CTAB (CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM) e incubou-se por 30 min a 65°C. Adicionou-se 450 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturou-se por 10 min. Centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente (TA) para a separação das fases. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e repetiu-se a extração com clorofórmio/álcool isoamílico. O sobrenadante foi transferido para novo tubo adicionando-se 500 µl de isopropanol, invertendo o mesmo para induzir a precipitação do DNA. Incubou-se à -20°C overnight. O tubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos e o pellet foi lavado com 600 µl de etanol 70% e posteriormente com etanol 96%. Após a secagem do pellet pela inversão dos tubos em papel toalha em TA, o DNA foi ressuspendido em 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM; pH 8,0; EDTA 1mM). O material foi tratado com 2 µl de RNase (10mg/ml) por 30 min a 37°C e estocado a -20°C.

T2 - Método CTAB modificado de Romano (1998)

Neste método é realizada uma extração adicional com acetato de amônio: Adicionou-se ao tecido foliar 700 µl de tampão de extração CTAB (CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4M; Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM), incubando-se por 30 min a 65°C. Adicionou-se 450 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) sendo gentilmente misturados por 10 min. A reação foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min em TA para a separação das fases. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e repetiu-se a extração com clorofórmio/álcool isoamílico. O sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi adicionado 500 µl de isopropanol. O tubo foi invertido gentilmente para induzir a precipitação do DNA, sendo posteriormente incubado à -20°C overnight. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos e o pellet foi lavado com 600 µl de etanol 70% e posteriormente com etanol 96%. Após a secagem do pellet pela inversão dos tubos em papel toalha, o DNA foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE. Foi adicionado 2 µl de RNase (10mg/ml) e incubado por 30 min a 37°C. Após, foi adicionado 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M, seguido pela incubação em gelo por 15 min. Os tubos foram centrifugados por 30 min (14000 rpm a 4°C), e o precipitado lavado com etanol 70% seguido de nova centrifugação. Após seco, o precipitado foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE e mantido a -20°C.

T3 - Método Dellaporta et al. (1983)

Adicionou-se ao tecido foliar 450 µl de tampão de extração Dellaporta (SDS 20% (p/v); NaCl 5M; Tris HCl 1M pH 8,0; EDTA 2Na 0,5 M; Mercaptoetanol 0,2%) pré-aquecidos a 65°C. Foi adicionado 30 µL de SDS 20% invertendo os tubos gentilmente e mantendo-os por 15 minutos a 65°C. Adicionou-se 125 µl/tubo de acetato de potássio (5M), sendo a mistura homogeneizada e incubada no gelo por 20 min, seguida por centrifugação a 14 000 rpm por 5 min para separação das fases. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionado 350 µl de isopropanol gelado/tubo. Após, homogeneizou-se gentilmente e incubou-se a -20°C overnight. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante descartado e o pellet lavado com 50µl de etanol 75% gelado. A reação foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 min e o etanol descartado. O DNA foi secado à TA e ressuspendido em 50 µl de tampão TE e centrifugado a 14.000 rpm durante 1 min, transferindo o sobrenadante para novos tubos e adicionando 3 µl de RNase (10mg/mL). As amostras foram misturadas e incubadas por 30 min a 37°C e logo após, foram adicionados 3,5 µl de acetato de sódio e 165 µl/tubo de etanol 95% gelado, precipitando por uma noite a -20°C. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 min, descartando o sobrenadante e lavando o pellet com 50 µl de etanol 70% gelado. Centrifugou-se por 3 min a 14500 rpm e descartou-se o sobrenadante. Após seco em TA, o pellet foi ressuspendido em 50 µl de tampão TE.

T4 - Método Dellaporta et al. (1983) modificado

O método utiliza dupla extração com clorofórmio/álcool isoamílico. Adicionou-se ao tecido foliar 450 µl de tampão de extração Dellaporta (SDS 20% (p/v); NaCl 5M; Tris HCl 1M pH 8,0; EDTA 2Na 0,5 M; Mercaptoetanol 0,2%) pré-aquecidos a 65°C. Foi adicionado 30 µL de SDS 20%, os tubos foram invertidos e a mistura homogeneizada e mantida por 15 minutos a 65°C. Adicionou-se 125 µl/tubo de acetato de potássio (5M), homogeneizando e incubando no gelo por 20 min. Centrifugou-se a 14 000 rpm por 5 min para separação das fases. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionaram-se 350 µl de isopropanol gelado/tubo. Após, homogeneizou-se gentilmente e incubou-se a -20°C overnight. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 min, descartando o sobrenadante e lavando com 50 µl de etanol 75% gelado. A reação foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 min e o etanol descartado. Os tubos secaram em TA. O DNA foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE e centrifugado a 14.000 rpm durante 1 min, transferindo o sobrenadante para novos tubos e adicionando 3 µl de RNase (10mg/mL). As amostras foram misturadas e incubadas por 30 min a 37°C. Após, adicionou-se 700 µl de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Centrifugou-se por 5 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a extração com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida. Adicionou-se 3,5 µl de acetato de sódio e 165 µl/tubo de etanol 95% gelado, precipitando por uma noite a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min, descartando o sobrenadante e lavando o pellet com 50 µl de etanol 70% gelado. Centrifugou-se por 3 min a 14500



rpm e descartou-se o sobrenadante. Após seco em TA, o pellet foi ressuspendido em 50 µl de tampão TE.

O DNA obtido foi quantificado em ng/µl em espectrofotômetro (*Gene Quant pro RNA/DNA calculator* -Amsham Pharmacia Biotech) com fator de diluição 1/50. Os valores foram transformados para ng/mg de tecido (massa fresca). Para determinar a qualidade das amostras, as mesmas foram analisadas pela razão das absorvâncias 260/280 nm. Os dados foram avaliados pela Análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Para avaliar a integridade do DNA realizou-se eletroforese (~150V) em gel de agarose 0,8% (5µg de DNA por tratamento) visualizado em Ultravioleta (UV) e fotografado pelo Sistema *Instant Camara Polaroid MP4<sup>+</sup>*.

Para avaliar a qualidade das extrações, o DNA extraído do acesso A4 (Terra Fame) nos diferentes tratamentos, foi submetido a uma digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Hinf I* (Gibco INC.) e amplificação por PCR utilizando primer de actina de arroz e maçã. Para a digestão, 10 µg de DNA foi incubado com 2U da enzima *Hinf I* a 37°C por 2h. Para amplificação por PCR, os primers homólogos à seqüência conservada do gene de actina de arroz (Actin forward – 5’GATCTGGCATCACACCTTCTAC3’; Actin reverse – 5’AGGAAGCTCGTAGCTCTTCTC3’) e de maçã (Actin forward – 5’CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT3’; Actin reverse – 5’TGGGATGACATGGAGAAGATT3’) foram utilizados separadamente sendo amplificados nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 5 min. A

reação de PCR se estendeu por 35 ciclos. Para tal, foi utilizado o DNA extraído do acesso A4, sendo adicionado à reação de PCR 150 e 300 ng de DNA para cada primer.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas de quantidade e qualidade de DNA extraído nos diferentes tratamentos, sendo observada a interação entre os acesso e métodos de extração (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias de quantidade de DNA em ng/mg de tecido obtidos nos diferentes tratamentos (T1= CTAB 1, T2 = CTAB2, T3= SDS 1 e T4 = SDS 2) e em diferentes acessos (A1= Cariba, A2 = Amazone, A4= Terra Fame E A8= Não comercial)

ACESSOS	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4
A1	A 479,88 a	B 59,55 b	B 90,41 b	B 50,41 b
A2	A 438,57 a	C 95,86 a	B 149,49 a	C 85,71 a
A4	A 441,75 a	B 89,31 a	B 111,19 b	B 71,48 a
A8	A 231,66 b	C 39,70 c	B 105,44 b	BC 77,26 a
Média	397,97	71,11	114,13	71,22

Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula, não diferem na linha e coluna, respectivamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O tratamento T1-Método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987) descrito por Romano & Brasileiro (2003), resultou em quantidade de DNA significativamente superior aos demais tratamentos, produzindo em média 398ng de DNA por mg de massa fresca. Os tratamentos T2 e T4 produziram em média 71ng/mg, provavelmente devido ao maior número de precipitações de DNA inerente ao método (Tabela 2).

Em relação à qualidade do DNA, diferenças significativas podem ser observadas para as razões de absorvância entre os tratamentos (Tabela 3). O T1 foi o método mais eficiente, pois proporcionou a obtenção de DNA com alta qualidade, o qual apresentou razões de absorvância de 1,86. Este valor está dentro dos limites que indicam grau de pureza entre a presença de ácidos nucléicos ( $A_{260}$ ) e de polissacarídeos na amostra ( $A_{280}$ ), onde um DNA puro deve ter uma razão entre 1,8 e 2,0. Razão inferior significa contaminação por proteínas e razão superior indica contaminação por clorofórmio ou fenol.

Tabela 3 - Médias da qualidade do DNA genômico( $OD_{260}/OD_{280}$ ) obtidos nos diferentes tratamentos (T1= CTAB 1, T2 = CTAB2, T3 = SDS 1 e T4 = SDS 2) para os genótipos (A1= Cariba, A2= Amazone, A4= Terra Fame e A8= Não comercial)

GENÓTIPOS	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4
A1	A 1,935 a	B 1,814 a	C 1,698 a	C 1,639 b
A2	A 1,809 c	A 1,786 a	C 1,587 b	B 1,645 b
A4	A 1,865 b	B 1,789 a	C 1,731 a	C 1,725 a
A8	A 1,844 b	B 1,753 b	C 1,391 c	C 1,411 c
Média	1,860	1,780	1,602	1,605

Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula, não diferem na linha e coluna, respectivamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos T3 e T4, os quais utilizaram SDS como detergente de extração, a razão de absorvância ficou inferior a 1,8 para todos os acessos, a média da razão nestes tratamentos foi de 1,6, o que indica baixa pureza do DNA devido à contaminação por proteína.

No tratamento T2, a adição de acetato de amônio, não resultou no aumento da qualidade do DNA, baseado na razão das

absorbâncias, indicando que a presença de polissacarídeos não é problemática na extração de ácidos nucléicos de gérbera.

O padrão eletroforético de DNA extraído com o detergente CTAB foi superior ao extraído com SDS, pois este último apresentou DNA altamente degradado para todos os acessos (Figura 1).

A superior qualidade dos DNAs obtido através dos tratamentos T1 e T2, nos quais foram utilizados o detergente catiônico CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), deve-se ao modo de ação deste, o qual complexado às paredes celulares, proteínas e polissacarídeos, faz com que estas precipitem da solução, visto que o DNA obtido nos tratamentos T3 e T4, os quais utilizaram o SDS, que promove apenas a lise celular (OSTROWSKA, 1998), não encontravam-se dentro dos padrões de pureza (ROMANO, 1998).

Benedetti et al. (2001) e Chung et al. (2001) isolaram DNA de folhas de gérbera pela metodologia CTAB. A digestão do DNA com a endonuclease *Hinf I* foi observada em todos os tratamentos, indicando que os sítios de restrição do DNA podem ser reconhecidos pela enzima, independente do método de extração (Figura 2).

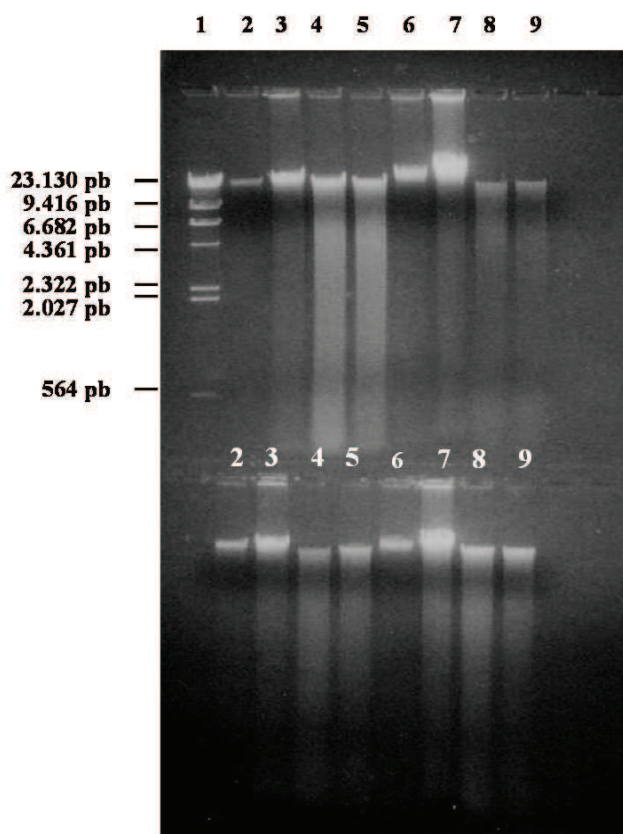


Figura 1 - Perfil eletroforético de DNA (5  $\mu$ g) extraído de folhas jovens de quatro acessos de *Gerbera* (A1= Cariba, A2= Amazone, A4= Terra Fame e A8=Selvagem) submetidos a quatro métodos de extração de DNA (T1= CTAB 1, T2= CTAB2, T3 = SDS 1 e T4 = SDS 2). Canaleta 1 (parte superior do gel), marcador lambda cortado com a enzima de restrição *Hind III*; canaletas 2, 3, 4 e 5 respectivamente o genótipo A4 submetido aos tratamentos T1, T2, T3 e T4; canaletas 6, 7, 8 e 9 respectivamente A8 submetido aos tratamentos T1, T2, T3 e T4; canaletas (parte inferior do gel) 2, 3, 4, 5, genótipo A2 submetido aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 e canaletas 6, 7, 8 e 9, genótipo A1 submetido aos protocolos de extração T1, T2, T3 e T4.

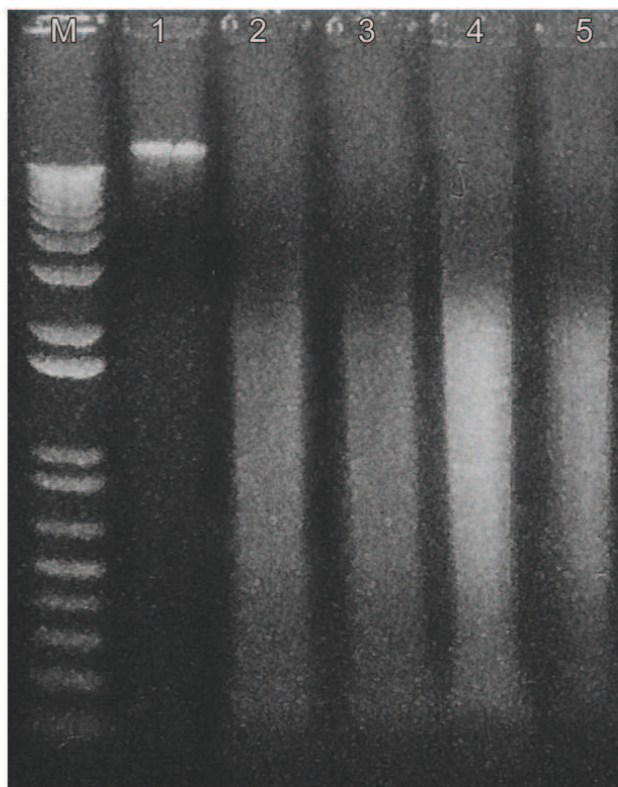


Figura 2 - Digestão com enzima de restrição HinfI (Gibco). M, DNA ladder (Gibco 1Kb). Canaleta 1, DNA íntegro do acesso A4 (Terra Fame), extraído pelo tratamento T1. Canaleta 2, 3, 4, 5, DNA digerido pela enzima de restrição HinfI (Gibco), extraído pelos tratamentos T1, T2, T3, T4, respectivamente.

A Figura 3 apresenta o produto da amplificação do DNA pela técnica de PCR, utilizando *primers* de actina de arroz e maçã. Apesar do DNA obtido em todos os tratamentos ter sido cortado com enzima de restrição, somente o DNA obtido com os protocolos de extração T1 e T2 puderam ser amplificados por PCR (Figura 3).

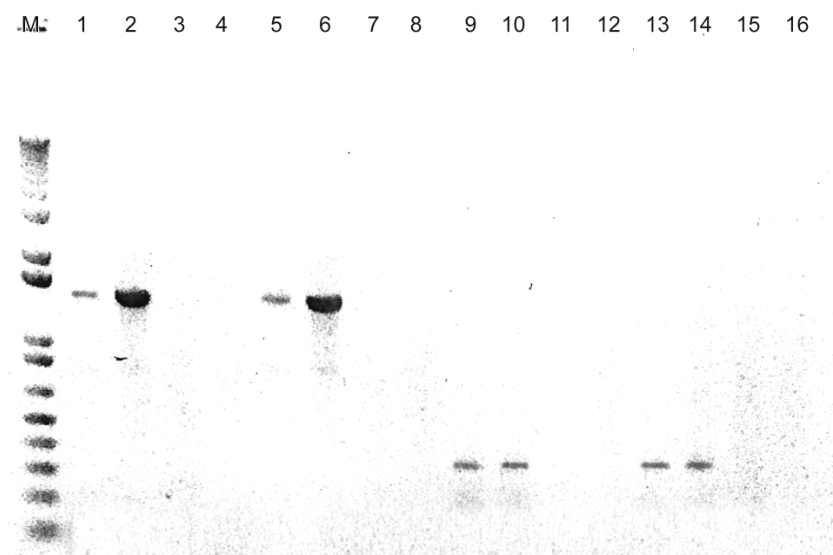


Figura 3. Perfil eletroforético de PCR de DNA extraído do acesso A4 (Terra Fame). Canaleta M, DNA ladder (Gibco 1Kb); canaletas 1, 2, 3, 4 correspondem aos tratamentos T1, T2, T3, T4, respectivamente, amplificados com primers de actina de arroz e [DNA]=300ng; canaletas 5, 6, 7, 8, correspondem aos tratamentos T1, T2, T3, T4, respectivamente, amplificados com *primers* de actina de arroz e [DNA]=150ng. Canaletas 9, 10, 11, 12 correspondem aos tratamentos T1, T2, T3, T4, respectivamente, amplificados com primers de actina de maçã e [DNA]=300ng; canaletas 13, 14, 15, 16 correspondem aos tratamentos T1, T2, T3, T4, respectivamente, amplificados com *primers* de actina de maçã e [DNA]=150ng.

A análise da qualidade do DNA extraído, tanto através das leituras de absorvância no espectrofotômetro quanto as do gel de agarose permitiu constatar que o método de extração CTAB proporcionou a obtenção de DNA com bom padrão de qualidade, o que não foi possível utilizando a metodologia de extração que utiliza o

SDS no isolamento de DNA. Isso indica que o método CTAB é o mais eficiente para extração de DNA destinado ao emprego de marcadores moleculares baseados nas técnicas de PCR, ou seja, para RAPD e microssatélite.

#### **4 CONCLUSÕES**

O método de extração CTAB 2% comparado com os demais testados foi o que produziu maior quantidade de DNA por massa fresca e proporcionou o DNA com melhor padrão de qualidade.

O método de extração CTAB 2% é eficiente para extração de DNA genômico de gérbera com qualidade requerida para emprego em técnicas de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os caracteres morfológicos são eficientes para a caracterização dos acessos gérbera tanto que é a metodologia adotada pelo MAPA para registrar e proteger cultivares.

A análise de divergência genética baseada em marcadores morfológicos é útil para o planejamento de cruzamento para produção de novos híbridos. Porém sugere-se que estudos de divergência genética baseados em marcadores moleculares sejam realizados a fim de buscar uma relação entre marcadores agromorfológicos e moleculares promovendo uma complementação nos resultados.

A constatação de flores do disco hermafroditas férteis em alguns acessos, teoricamente aptas para a produção de sementes, necessita ser testada a fim de se otimizar o processo de produção de sementes ou até transferir esta característica para as plantas utilizadas como genitores femininos.

Para melhor se estabelecer a metodologia de cruzamento em gérbera, sugere-se a realização de estudos testando a fertilidade do estigma e a ocorrência de processos de auto-incompatibilidade, visto que se observou uma baixa formação de sementes nos cruzamentos entre acessos comerciais.

Visto que há compatibilidade genômica entre acessos não comerciais e comerciais, sendo possível o cruzamento entre eles

sugere-se a realização de cruzamentos dialélicos a fim de selecionar os melhores genitores, para posteriormente realizar cruzamentos em ampla escala para o desenvolvimento de germoplasma e variedades.

Outras técnicas de melhoramento como a poliploidia poderiam ser testadas nos acessos de gérbera tanto para produção direta de novas variedades quanto para a indução de fertilidade em híbridos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALVES, C.S.; MARINO, C.L.; CAMPOS, H.L.V.; SANTOS, A.P.; CHAVES, R. Aplicação de marcadores moleculares na identificação de clones de eucalipto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005a. p. 530.

ALVES, M.F.; ANDRADE, A.M.; PEREIRA, F.R.A.; MENEZES, I.P.P.; HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. Polimorfismo de marcadores RAPD e microssatélites em variedades de algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005b. p. 499.

ANASTASSOPOULOS, E.; KEIL, M. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, v.90, p.235-244, 1996.

ARUNACHALAM, V. Genetic distance in plant breeding. *The Indian Journal of Genetics & Plant Breeding*, Netherlands, v.41, n.2, p. 226-236, 1981.

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

BARBIERI, R.L. Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n.2, p. 303-308, mar.-abr. 2005.

BARBOSA, T.C.S.; CARNEIRO, F.A.; ARAÚJO, B.S.; SIBOV, S. T. Seleção de “primers” RAPD para a caracterização genética de populações de *Palicourea coriacea* (CHAM.) K. Schum. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 566.

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

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.

BENEDETTI, L.; MERCURI, A.; BRUNA, S.; BURCHI, G.; SCHIVA, T. Genotype identification of ornamental species by RAPD analysis. *Acta Horticulture*, v. 546, p. 391-394, 2001.

BENIN, G. et al. Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, p.657-662, 2003.

BERED, F. Extração de DNA... In: MILACH, S.C.K (ed.). *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre, 1998. 91-98.

BLANK, A.F.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SANTOS NETO, A.L.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p. 113-116, jan-mar., 2004.

BOLSI, J.Z.; LORENZ-LENKE, A.P.; BETTIM-BANDINELLI, J.; MEGA, N.O.; BONATTO, S.L.; SAZANO, F.M.; FREITAS, L.B. Caracterização populacional em espécies do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 469.

BORBA, T.C.O.; BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N. Análise dos grupos de genótipos melhorados e introduzidos da coleção nuclear brasileira do arroz por marcadores SSRs. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 458.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. *Melhoramento de Plantas*. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005. 525p.

BORTOLINI, F. et al. Caracterização morfológica e agrônômica e divergência genética em germoplasma de trevo-branco. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n. 4, p. 1601-1610, 2006.

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.

BRAMMER, S.P.; MILACH, S.C.K. Marcadores Moleculares em Plantas. In: BRAMMER, S.P; IORCZESKI, E.J.(Org.) *Atualização em Técnicas Celulares e Moleculares aplicadas ao Melhoramento Genético Vegetal*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 167-182.

BREMER, K. *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press: Portland, Oregon. 1994.

BURT, R.L.; WILLIAMS, R.J.; WILLIAMS, W.T. Observation, description and classification of plant collections. In: CLEMENTS, R. J.; CAMERON, D.G., ed. *Collecting and testing tropical forage plants*. Melbourne: CSIRO, 1980. p. 40-51.

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

CAMPOS, T.; BENCHIMOL, L.L.; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; CHIORATTO, A.F.; RISTERUCCI, A.M.; SOUZA, A.P. de; Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 438.

CARDOSO, R.D.L., AUGUSTIN, L., SUZIN, M., GRANDO, M.F. Cultivo *in vitro* de gerbera através de capítulos florais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3, 2005, Gramado. *Anais...* (CD-ROM), Passo Fundo: SBM, 2005.

CASTIGLIONI, V.B.R.; OLIVEIRA, M.F. Hibridação em girassol. In: BORÉM, A. (ed.) *Hibridação artificial em plantas*. Viçosa : UFV, 1999. p. 295-306.

CAVALLI, C. Marcadores genéticos. In: BRANDÃO, L.F. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

CHIESA, V.B.; OLIVEIRA, D.P.; SOUZA, R.C.; DUTRA, D.L.; GOULART, L.R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, W.P. Uso do RAPD PCR no estudo da variabilidade genética de acessos de *Ipomea batatas* (batata-doce) do banco de germoplasma da UFT/Palmas-TO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 685.

CHIORATO, A.F. Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo – IAC. 2004. Dissertação (Mestrado em melhoramento Vegetal). Instituto Agrônomo–IAC, Campinas: São Paulo, 2004.

CHUNG, Y.; KIM, H.; KIM, K.; PARK, S.; YI, 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.

CONTI, J.H., MINAMI, K., GOMES, L.H., TAVARES, F.C.A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares de morangueiro por análise RAPD. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 145-152, 2002.

CRUZ, C.D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. 1990. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz-ESALQ, Piracicaba, 1990.

CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV.1994.

CRUZ, C.D. *Programa Genes–Versão Windows*. Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa, 2001. 642 p.

CRUZ, C.D. & CARNEIRO, P.C.C. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v. 1, 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480p.

CUI, Z. et al. Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. *Crop Science*, Saint Paul, v.41, p.1954-1967, 2001.

CUNHA, C.P.; PINHEIRO, J.B. Caracterização morfo-agronômica de acessos filipinos de arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 542.

DAROS, M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, T.N.S.; LEAL, N.R.; FREITAS, S.P.; SEDIYAMA, T. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 1, p. 43-47, março 2002.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Report.*, v.1, p. 19-20, 1983.

DOMINGUES, E.T.; SOUZA, V.C.; SAKURAGUI, C.M.; POMPEU, J.J.; PIO, R.M.; SOBRINHO, J.T.; SOUZA, J.P. Caracterização morfológica de tangerinas do banco ativo de germoplasma de citros do cento de citricultura Sylvio Moreira/IAC. *Sci. Agric.* Piracicaba, v. 56, n.1, 1999.

DOYLE, J. J. e DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, v.19, p. 11-15, 1987.

DRENNAN, D.; HARDING, J.; BYRNE, T. Heritability of consumer preference in *Gerbera*. *Euphytica*, Netherlands, v.32, p. 465-474, 1983.

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

DUBUOZET, J.G., MURATA, N., SHINODA, K. Relationships among some species and varieties of *Alstroemeria* L. Based on RAPD analysis. *Sci. Hortic.* v.73, p. 37-44, 1998.

DUTRA, D.L.; COSTA, A.S.V.; SOUZA, R.C.; CHIESA, V.B.; GOULART, L.R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, W.P. Caracterização da divergência genética entre acessos de *Ipomea batatas* (batata-doce) do banco de germoplasma da UFT por RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 675.

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.; MEHTO, M.; KOTILAINEN, M.; HELARIUTTA, Y.; NEVALAINEN, L.; TEERI, T.H. A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonol-4-reductase (dfr) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *The Plant Journal*, v. 16, n. 1, p. 39-99, 1998.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, G. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília : EMBRAPA CENARGEN, 1995.

FERREIRA, L.G.; TELES, F.L.; NUNES, R.C.; KOZLOWSKI, A. L.; BASSINELO, P.Z.; BRONDANI, R.V.; BUSO, G.S.C.; MELO, L.C.; PELOSO, M.J.; SIBOV, S.T.; CARNEIRO, M.S. Seleção de



marcadores microssatélites para construção de mapa genético em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 646.

FLORTEC. *Produção de flores de corte*. Holambra: Flortec Cursos. SDI. 71p. il.

FLOSS, E.L. Frutificação. In: \_\_\_\_\_ *Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê*. Passo Fundo: UPF, 2004. 261-313.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; TSAI, S.M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 2, p. 381-385, 2001.

FRANKEL, R.; GALUN, E. *Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1977. 281p.

GLOBO RURAL. *Um negócio florido*. Disponível em: <<http://globoruraltv.globo.com/GRURAL/0,27062,LTO0-4370-136090,00.html>>. Acesso em: 10 abr. 2005.

GONELA, A.; SORIANI, H.H.; MESTRINER, M.A.; SILVA, A.J.; ALZATEMARIN, A.L. Uso de marcadores moleculares SSR para estudos de variabilidade genética em populações de Copafba (*Copaifera langsdorffii*) da região de Ribeirão Preto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 513.

GUIMARÃES, W.N.R.; GABRIELA, M.G.F.; MARTINS, L.S.S.; CASTRO, A.C.R. Marcadores RAPD na caracterização genética de genótipos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 703.

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

HAN, T.; LEE, J. Prospecto f 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 Bot.*, v.78, p.1-36, 1985.

HANZE, A.A.L.; KALIL FILHO, A.N.; BERTÃO, M.R.; SANTOS, A.F.; NEVES, E.J.M.; SOUSA, V.A. Caracterização da variabilidade genética de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) mediante o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 577.

HARDING, J.; BYRNE, T.G.; NELSON, R.L. Estimation of heritability and response to selection for cut-flower yield in *Gerbera Euphytica*, Netherlands, v.30, p. 313-322, 1981.

HELARIUTTA, Y.; ELOMAA, P.; KOTILAINEN; GRIESBACH, R.J.; SCHRÖDER, J.; TEERI, T.H. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.*, v. 22, p. 183-193, 1995.

HUANG, M. C.; CHU, C. A scheme for commercial multiplication of *Gerbera* (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture. s.n.t., 1985.

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..

HÜLSE-SOUZA, S.G.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; RUAS, C.F.; GERAGE, A.C.; RUAS, P.M. Análise comparativa da diversidade genética entre linhagens de milho (*Zea mays* L.) obtida por marcadores RAPD e microssatélites. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 560.

INFOAGRO. *El cultivo de la gerbera*. Disponível em: <[www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)>. Acesso em: 18 jun. 2005.

JAN, C.H., BYRNE, D.H., MANHART, J., WILSON, H. Rose germplasm analysis with RAPD markers. *HortScience*. v.34, n. 2, p.341-345, 1999.

JERZY, M.; LUBOMSKI, M. Adventitious shoot formation on ex vitro derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. *Scientia Horticulturae*, s.l., v. 47, p. 115-124, 1991.

JOHNSON, Isabel. *Gerbera jamesonii* Adlam., 2002. Disponível em: <<http://www.plantzafrica.com/plantefg/gerberajames.htm>>. Acesso em: 02 out. 2005.

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

KLOSS, W.E.; GEORGE, C.G.; SORGE, L.K. Inheritance of the flowers types of *Gerbera hybrida*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v. 129, p. 802-810, 2004.

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, 2005a.

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, 2005b.

KO, M.K., YANG, Y.H., LEE, C.H., OH, B.J. Genetic relationship of *Viola* species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v.73, n.5, p.601-605, 1998.

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.

KREUTZ, H. *Engenharia genética e biotecnologia*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

LALIBERTÉ, S.; CHE'RTIEN, L.; VIETH, J. In vitro plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *HortScience*, Quebec/ Canadá, v. 20, n. 1, p.137-139, feb. 1985.

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.

LINDSEY, K.; JONES, M.G.K. *Biotecnologia Vegetal Agrícola*. Zaragoza: Acribia, 1992.

LUCIO, L.C.; PRIOLI, A.J.; THOMAZ, S.M.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, L.M.; GOMES, V.N. Análise genética, com RAPD e SPAR, de populações de *Egeria najas* Planchon (Hydrocharitaceae) do reservatório da Itaipu-Binacional, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 568.

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. 2007.

MARCON, H.S.; SIQUEIRA, L.; SILVA, J.F.; MELLO, E.J.; ODA, S.; MARINO, C.L. Uso de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores de famílias conhecidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 466.

MARTINS, M. Quantificação e controle da qualidade de DNA genômico. In: MILACH, S.C.K (ed.). *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre, 1998. p. 99-106.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; FILHO, J.A.; MARTINS, A.L.M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v.25, n.2, 2003.

MELO, S.C.O.; LEAL, J.B.; COSTA, I.C.S.; GAIOTTO, F.A.; CORRÊA, R.X. Análise de paternidade e estrutura genética de uma população natural de *C. echinata* Lam. por meio de marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 589.

MENEZES, I. P. P.; MORELLO, C. L.; HOFFMANN, L.V.; VIDAL, M.S.; ALVES, M.F.; SUASSUNA, N.D.; BARROSO, P.A.V.; COUTINHO, T.C. Distância genética entre linhagens de algodão medida por marcadores SSR e RAPD e resistência a mancha ramulária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 476.

MENEZES, S.P.; JUNGHANS, D.T.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, A.C. Seleção de oligonucleotídeos iniciadores e ensaio RAPD para análise genética em *Hemerocallis hybrida* Hort. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 499.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: \_\_\_\_\_. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, 1998.p.17-28.

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.

MIZ, R.B.; SOUZA-CHIES, T.T. Estudo filogenético das espécies da seção Torva do gênero *Solanum* (Solanaceae) utilizando três

marcadores de cpDNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo:SBG, 2005. p. 564.

MOLINARI, H.B.; CROCHEMORE, M.L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises de PCR-RAPD. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal*, vol. 23, n. 2, p. 447-450, ago. 2001.

MOREIRA, J.A.N.; SANTOS, J.W.; OLIVEIRA, S.R.M. 1994. *Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma*. Brasília: Embrapa, 1994. 115p.

MORENO, J.A. *Clima do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961.

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.

OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN,M.; CHANDLER, S.; VOLKER, P.; HETHERINGTON, S.; DUNSHEA, F. Optimizing conditions for DNA isolation from *Pinus Radiata*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, v.34, p. 108-111, 1998.

PAGGI, G.M.; PALMA-SILVA,C.; SILVEIRA,L.C.T.; FELICETTI, R.A.; FERRAZ, R.S.; KALTCHUK-SANTOS, E. BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Variabilidade genética, biologia reprodutiva e fertilidade de *Vriesia gigantea* Gaud. (Bromeliaceae). . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 493.

PATRIARCHA, S.R.; CHIARI, L.; JUNGSMANN, L.; RESENDE, R. M.S.; LAURA, A.L.C.; LEGUIZAMÓN, G.O.C. Análise da variabilidade genética em *Stylosanthes capitata* por meio de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 649.

PENNINGSFELD, F.; FORCHTHAMMER, L. *Gerbera*. Stuttgart: Ulmer Fachbuch, 1980. 342p.

PEREIRA, M.R.; MAFRA, V.S.; QUEIROZ, V.T. de; BARROS, E. G.; MOREIRA, M.A. Desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites para o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 714.

PEREIRA, P.A.A. & SOUZA, C.R.B. Tipos de faseolina em raças “crioulas” de feijão no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 27, n. 8, p. 1219-1221, 1992.

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

PIERIK, R.L.M.; STEGMANS, M.H.; MARELIS, J.J. Gerbera plantlets from in vitro cultivated capitulum explants. *Science Horticulture*, s.l., v. 1, p. 117-119, 1973.

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

PREIL, W.; HUNKE, W.; ENGELHARDT, M.; HOFFMANN, M. Haploide bei Gerbera jamesonii aus in vitro-Kulturen von Blütenköpfchen. *Z. Pflanzenzüchtg*, s.l., v. 79, p. 167-171, 1977.

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

REYNOIRD, J.; CHRQUI, 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.

REZENDE, R.K.S.; PAIVA, L.V.; PAIVA, R.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; TORGA, P.P. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 57, ENCONTRO ESTADUAL DE BOTÂNICOS, 13, ENCONTRO ESTADUAL DE HERBÁRIOS, 5. *Resumos...* Gramado: SBB, 2007 (CD-ROM). Disponível em:

<http://www.57cnbot.com.br/trabalhos.asp?COD=1826>>. Acesso em: 20 nov. 2006.

RIBEIRO, F.E. Divergência genética entre populações de coqueiro gigante (*Cocos nucifera* L.) do Brasil. 1993. Dissertação Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 1993.

RODRIGUES, L.S.; ANTUNES, I.F.; TEIXEIRA, M.G.; SILVA, J.B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 2, p. 1285-1294, 2002.

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

ROMANO, E; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 5, n. 29, p. 40-43, 2003.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p.163-177.

SALGADO, L.R.; CHIARI, L.; VALLE, C.B.; LEGUIZAMON, G. O.C.; VALLE, J.V.R. Diversidade genética de acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando a técnica de RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 664.

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.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; WEBER, F.; DALL´AGNOL, M.; LUBENOW, R. Variabilidade morfológica em populações de *Adesmia latifolia*. *Agrociencia*, v.7, n.1, p. 30-34, 2003.



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

SCOVEL, G.; BEM-MEIR, H.; OVADIS, M.; ITZHAKI, H.; VAINSTEIN, A. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor. Appl. Genet.*, v. 96, p. 117-122, 1998.

SCOVEL, G.; BEM-MEIR, H.; OVADIS, M.; ITZHAKI, H.; VAINSTEIN, A. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor. Appl. Genet.*, v. 96, p. 117-122, 1998.

SEVERIN, C.; GONZALEZ, M.; MURRAY, R. Micropropagación de Gerbera spp. A partir de diferentes explantes. *Revista FAVE*, Argentina, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2000.

SILVESTRINI, M.; JUNQUEIRA, M.G.; FAVARIN, A.C.; GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M.P.; SILVAROLLA, M.B.; COLOMBO, C. Diversidade genética da espécie Coffea arábica L. avaliada por marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 547.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, New York, v.45, n.3, p. 379-396, 1991c.

SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common beans: II. Markers based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Science*, Madison, v. 31, p. 23-29, 1991.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; SILVA, J.R.Q.; BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores microssatélites (SSR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 533.

SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S.; BOWEN, S.L.; TENBORG, R.A.; WALL, S.L. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 80, n. 6, p. 833-840, 1990.

SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL. Caracterização morfofisiológica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.). *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 33, n.6, nov.-dez. 2004.

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

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, J. S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (eds.). *Recursos genéticos e melhoramento – Plantas*. Rondonópolis : Fundação MT, 2001. p. 939-965.

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 Hort*, Netherlands, v. 63, p. 27-36, 1976.

TATINENI, V.; CANTRELL, R.G.; DAVIS, D.D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD. *Crop Science*, Madison, v.36, p.186-192, 1996.

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.

TOGNI, P.D.; KULCHESKI, F.R.; LORENZ-LEMKE, A.P.; MUSCHNER, V.C.; STEHMANN, J.R.; BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M., FREITAS, L.B. Relacionamento filogenético entre as espécies do gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...*São Paulo: SBG, 2005. p. 657.

TOMAZ, R.S.; ROCHA, R.B.; CÂNCIO, O.N.; ROSADO, A.M.; ARAÚJO, E.F. Avaliação da variabilidade genética de clones elite de *Eucalyptus* spp e recomendação de cruzamentos utilizando marcadores moleculares microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 584.

TORRES, A.M.; MILLAN, T.; CUBERO, J.I. Identifying rose cultivars using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *HortScience*, v. 28, n.4, p. 333-334, 1993.

TORRES, G.A.M.; GARCIA, A.F.; DEGRANDI, T.H.; AMARAL, J. P.C.; SOUZA, A.P. de. Caracterização de genótipos de batata através de marcadores AFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 542.

TOSCA, A., ARCARA, L.; FRANGI, P. Effects of genotype and season on gynogenesis efficiency in *Gerbera*. *Plant Cell, Tissue and Organ*, Italy, v. 59, n.1, p. 77-80, 1999.

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

TYAGI, P.; KOTHARI, S.L. Rapid *in vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* (H. Bolus ex Hook. f.) from different explants. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 23, out. 2004.

VAN TUYL, J.M.; LIM, K. 2003. Interspecific Hybridisation and Polyploidisation as Tools in Ornamental Plant Breeding. *Acta Horticulturae*, v. 612, p. 13-22, 2003.

WADT, L. H.O. Avaliação de divergência genética em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) usando marcadores RAPD em amostras de plantas individuais ou compostas. 1997. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – área de concentração Melhoramento Genético Vegetal)-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Goytacazes-RJ, 1997.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary “primers”. *Nucleic Acids Researches*, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WERPACHOWSKI, J.; VARASSIN, I.G.; GOLDENBERG, R. Ocorrência de apomixia e parternocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. *Revista Brasil. Bot.*, v. 27, n. 3, p. 607-613, jul-set, 2004.

WILCHES, O.M. Evaluacion de treinta y cuatro variedades de mani mediante tecnicas multivariadas. *Revista ICA*, v. 18, n. 1, p. 67-76, 1983.

WILLIAMS, J.G.K.; KULELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A.; TIGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. Oxford. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.

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.

WOLFF, K.; PETERS-VAN RIJN, J. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random “primers”. *Heredity*, v. 71, p. 335-341, 1993.

WRICKE, G.; WEBER, W.E.; OTTLEVEN, R. Die analyse der genetischen varianz bei quantitative vererbten merkmalen von *Gerbera jamesonii*. *Z. Pflanzenzüchtg*, Berlin, v. 89, p.329-336, 1982.

YAMAGISHI, M. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl. Genet.*, v. 91, p. 830-835, 1995.

YU, Y.; BYRNE, T.; HARDING, J. Quantitative genetic analysis of flowering time in the Davis Population of gerbera. I. Componentes 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.

ZANELLA, C. M.; TACUATIÁ, L. O.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BERED, F. Caracterização genética de germoplasma de milho através de marcadores moleculares do tipo microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. *Anais...* São Paulo: SBG, 2005. p. 671.