

**IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE GLADIÓLO POR  
MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E  
MOLECULARES**

**CLARISSA ALVES FERREIRA**

**2008**

**CLARISSA ALVES FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE GLADIÓLO  
POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E  
MOLECULARES**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do programa  
de pós-graduação em Agronomia, área de  
concentração Fitotecnia, para a obtenção do título  
de “Mestre”.**

**Orientadora**

**Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Ferreira, Clarissa Alves.

Identificação de cultivares de gladiolo por meio de marcadores  
morfológicos e moleculares / Clarissa Alves Ferreira. – Lavras : UFLA,  
2008.

113 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Certificação de pureza genética. 2. DNA. 3. Enzima. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.93424

**CLARISSA ALVES FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE GLADIÓLO POR MEIO DE  
MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do programa de pós-  
graduação em Agronomia, área de concentração  
Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 04 de julho de 2008

Prof. Dr. João Almir Oliveira UFLA

Prof. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva UFLA

Prof. Dra. Luciane Vilela Resende UFRPE

**Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**

*Sempre é tempo de lançar sementes...*

“A vida é fruto da decisão de cada momento. Talvez seja por isso que a idéia de plantio seja tão reveladora sobre a arte de viver. Viver é plantar. É atitude de constante semeadura, de deixar cair na terra de nossa existência as mais diversas formas de sementes. Cada escolha, por menor que seja, é uma forma de semente que lançamos sobre o canteiro que somos. Um dia, tudo o que agora silenciosamente plantamos, ou deixamos plantar em nós, será plantação que poderá ser vista de longe...” (Fábio de Melo)

A Deus,  
pela graça e discernimento  
**OFEREÇO**

Aos meus pais, Victor Ferreira e Rose Myrian  
Alves Ferreira, pela força incondicional em  
todos os momentos e por sempre acreditarem  
em mim, e às minhas irmãs, Lala e Vivi, pelo  
amor, carinho e pela admiração.  
**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, sempre.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Agricultura e ao Setor de Sementes e ao Setor de Floricultura, pelo suporte e apoio na realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Terra Viva pela doação dos bulbos para a realização da pesquisa.

À professora Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela orientação segura, eficiente e constante; pela confiança demonstrada, incentivo e, sobretudo, pela amizade.

À professora Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, pela co-orientação, participação na banca, colaboração e apreço.

À pesquisadora Luciane Vilela Resende pela participação na banca e pelas valiosas sugestões.

Ao professor João Almir Oliveira, pela participação na banca, pelas valiosas sugestões e consideração.

À Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado pela co-orientação, pelos ensinamentos, pelas sugestões e, sobretudo, pela amizade.

Aos professores Maria Laene e Renato Guimarães, pelos ensinamentos, pela contribuição.

Aos funcionários do setor de sementes, Dona Elza, Dona Dalva, Elenir, Andréa e Seu Zé, pelo apoio, paciência e colaboração.

Aos funcionários do Setor de Floricultura, por toda a ajuda e auxílio.

Aos meus avós Vô Nelson (*in memoriam*), Vô Vera (*in memoriam*), Vô Tão e Vô Diva (*in memoriam*) e a toda minha família, pelo amor, carinho e amizade.

Ao meu “irmão” Kitu pela amizade, pelo apoio e pelo convívio.

Aos amigos do curso de pós-graduação, em especial, Adriano, Rondon, Leidiane, Kalinka e Solange, pela força, pelo convívio e pelo incentivo.

Aos estudantes de graduação, em especial, Gabi, Rafa, Thaís e Iara, pelo compromisso e dedicação.

Às minhas amigas Cris, Tathi, Paty, Pri e Inês pelo apoio incondicional, companheirismo, incentivo, mas, sobretudo, pela amizade, mesmo estando bem longe.

Ao meu amigo, professor Geraldo Andrade de Carvalho, pelas dicas, experiências passadas e pela força.

À minha amiga Dri, pela paciência, amizade e pelo carinho.

E a todos que contribuíram, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	i
ABSTRACT .....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	5
2.1 Aspectos botânicos, culturais e econômicos da cultura do <i>Gladiolus</i> sp. ....	5
2.2 Pureza genética.....	6
2.3 Técnicas para avaliação da pureza genética.....	7
2.3.1 Marcadores morfológicos .....	7
2.3.2 Marcadores moleculares de enzimas.....	10
2.3.3 Marcadores moleculares de DNA.....	12
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES E CERTIFICAÇÃO DA PUREZA GENÉTICA DE GLADIÓLO POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS.....	21
1 RESUMO .....	22
2 ABSTRACT .....	23
3 INTRODUÇÃO .....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1 Materiais Genéticos.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1 Caracterização das cultivares por meio de marcadores morfológicos....	33
5.2 Certificação da pureza genética em cultivares de gladiolo por meio de marcadores morfológicos.....	43
6 CONCLUSÕES.....	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE <i>Gladiolus</i> sp. POR MEIO DE MARCADORES DE ENZIMAS E DE DNA.....	50
1 RESUMO .....	51
2 ABSTRACT .....	53
3 INTRODUÇÃO .....	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	57



4.1 Avaliações da pureza genética por meio de marcadores moleculares de enzimas .....	57
4.1.1 Obtenção das similaridades genéticas.....	58
4.2 Avaliações da pureza genética por meio de marcadores moleculares de DNA .....	58
4.2.1 Extração de DNA.....	59
4.2.2 Reações de PCR.....	60
4.2.3 Revelação dos géis.....	61
4.2.4 Obtenção das similaridades genéticas.....	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
5.1 Marcadores moleculares de enzimas.....	62
5.2 Marcadores moleculares de DNA .....	73
6 CONCLUSÕES.....	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## FIGURAS

FIGURA 1 – Plantio dos cormos de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2006. ...	27
FIGURA 2 – Tutoramento das plantas de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	28
FIGURA 3 – Descritores utilizados na caracterização morfológica. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	29
FIGURA 4 – Instalação do experimento para certificação da pureza genética. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	31
FIGURA 5 – Presença de antocianina na primeira folha acima do nível solo. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	35
FIGURA 9 – Padrões eletroforéticos da izoenzima peroxidase observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	62
FIGURA 10 – Padrões eletroforéticos da izoenzima malato desidrogenase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	63
FIGURA 11 – Padrões eletroforéticos da izoenzima malato desidrogenase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	64
FIGURA 12 – Padrões eletroforéticos da izoenzima álcool desidrogenase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	65
FIGURA 13 – Padrões eletroforéticos da izoenzima álcool desidrogenase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	65
FIGURA 14 – Padrões eletroforéticos da izoenzima $\alpha$ -amilase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	66
FIGURA 15 – Padrões eletroforéticos da izoenzima $\alpha$ -amilase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	67

FIGURA 16 – Padrões eletroforéticos da isoenzima catalase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	68
FIGURA 17 – Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	70
FIGURA 18 – Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, observados em tecidos cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006. ....	70
FIGURA 19 – Dendrograma das onze cultivares de gladiolo estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores isoenzimáticos. UFLA, Lavras, MG, 2008. ....	72
FIGURA 20 – Padrões de marcadores de RAPD das onze variedades de gladiolo, extraídos do tecido dos cormos, utilizando o <i>primer</i> OPD 11. UFLA, Lavras, MG, 2007. ....	73
FIGURA 21 – Padrões de marcadores de RAPD das onze variedades de gladiolo, extraídos do tecido dos cormos, utilizando o <i>primer</i> OPQ 15. UFLA, Lavras, MG, 2007. ....	74
FIGURA 22 – Dendrograma de onze cultivares de gladiolo estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores RAPD. UFLA, Lavras, MG, 2008. ....	76

## TABELAS

TABELA 1 – Descrição de diferentes cultivares de gladiolo utilizadas na pesquisa. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	26
TABELA 2 – Cultivares de gladiolo em análise e as contaminantes utilizadas na certificação da pureza genética das diferentes cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	30
TABELA 3 – Caracterização morfológica de onze cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	34
TABELA 4 – Características morfológicas quantitativas de onze cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	40
TABELA 5 – Resultados de identificação (% de acerto e % de erro) de cormos e plantas provenientes de diferentes cultivares de gladiolo em várias épocas de avaliação. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	43
TABELA 6 – Resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), aplicados aos dados de identificação de cormos e plantas provenientes de cultivares de gladiolo diferentes em várias épocas de avaliação, obtidos por três avaliadores. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	46
TABELA 7 – Relação dos <i>primers</i> utilizados na caracterização das cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	59

## RESUMO GERAL

FERREIRA, Clarissa Alves. **Identificação de cultivares de gladiolo por meio de marcadores morfológicos e moleculares.** 2008. 113p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

A certificação da pureza genética de cultivares de flores é fundamental nos processos de registro e proteção. Para isso há a necessidade de identificação de cultivares por meio de marcadores estáveis. Nesse trabalho foram realizadas a caracterização e a certificação da pureza genética de onze cultivares de *Gladiolus sp.* por meio de marcadores morfológicos e moleculares de proteínas e de DNA. O trabalho foi realizado na área experimental do Setor de Floricultura e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras. Para a caracterização morfológica das cultivares, as parcelas foram constituídas de 25 plantas, avaliando-se características dos bulbos, folhas e flores. Para a certificação da pureza genética, nessa etapa, foram instaladas parcelas de 24 plantas e 24 bulbos, contendo contaminações varietais em diferentes proporções. O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados, com quatro repetições. No segundo experimento foram utilizadas três cultivares para compor os tratamentos e as avaliações foram conduzidas por três avaliadores que desconheciam a porcentagem existente de contaminação. Para a extração de enzimas e de DNA, foi coletada a terceira folha definitiva, de dezesseis plantas escolhidas ao acaso e de cinco bulbos de cada variedade. Os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos  $\alpha$ -amilase, álcool desidrogenase, esterase, peroxidase, malato desidrogenase e catalase. A avaliação do DNA foi realizada por meio da técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Por meio de características do bulbo foi possível diferenciar quatro cultivares das onze avaliadas. A característica da cor das flores é o descritor morfológico mais seguro para a diferenciação das cultivares de gladiolos. Dependendo das características das cultivares contaminantes e das cultivares em análises é possível utilizar descritores morfológicos para a certificação de pureza genética em cultivares de gladiolos. Dentre os sistemas enzimáticos testados, foi detectada baixa atividade para a enzima peroxidase, nos bulbos, sem ocorrência de polimorfismo entre as cultivares testadas. Em folhas, para a enzima peroxidase, seis padrões eletroforéticos diferentes foram gerados. Quanto ao sistema enzimático malato desidrogenase nos tecidos dos bulbos e nas folhas, foram obtidos cinco padrões eletroforéticos diferentes. Para a álcool desidrogenase, nos tecidos dos bulbos,

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Orientador), Prof<sup>a</sup> Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-orientadora), Dra. Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado (Co-orientadora).

todos os padrões obtidos foram monomórficos, exceto para uma variedade. Para a catalase, em folhas, não foi observado polimorfismo nos padrões das cultivares analisadas. Por meio da enzima  $\alpha$ -amilase, nos bulbos e da esterase, em folhas, foi possível diferenciar todas as cultivares. Com relação ao uso de RAPD para a caracterização das cultivares de gladiolos foi observado polimorfismo em nove dos primers testados. Por meio da técnica de RAPD foi possível diferenciar oito cultivares das onze avaliadas nesse estudo. A similaridade das cultivares avaliadas por meio dos marcadores de enzima variou de 0,32 a 0,69 e a observada por meio dos marcadores de RAPD de 0,38 a 0,64.

## ABSTRACT

FERREIRA, Clarissa Alves. **Identification of gladiolus cultivars by means of morphologic and molecular markers** 2008. 113p. (Dissertation – Master in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>2</sup>

The certification of genetic purity of flower cultivars is fundamental in the registration and protection processes. For there is the need for identifying the cultivars by means of stable markers. In this work, both the characterization and certification of genetic purity of twelve cultivars of *Gladiolus sp.* by means of morphologic and molecular markers of proteins and DNA was performed. The work was conducted in the experimental area of the Floriculture Sector and in the Central Seed Laboratory of the Agriculture Department at the Federal University of Lavras. For the morphological characterization of the cultivars, the plots were made up of 25 plants, the characteristics of corms, leaves and flowers being evaluated. For the certification of genetic purity, in that step, plots of 24 plants and 24 bulbs were established containing varietal contaminations at different proportions. The experimental design adopted was that of randomized blocks with four replicates. In the second experiment were utilized three cultivars to make up the treatments and the evaluations were conducted by three evaluators who were unaware of the existing percentage of contamination. For enzyme and DNA extraction, the third definitive leaf of sixteen plants at random and of five bulbs of each variety was collected. The gels were revealed for the enzyme systems  $\alpha$ -amylase, alcohol desidrogenase, esterase, peroxidase, malate dehydrogenase and catalase. DNA evaluation was carried out by means of RAPD technique (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and the products were separated by eletrophoresis in 0.8% agarose gel. By means of corm characteristics, it was possible to distinguish four cultivars out of the eleven evaluated. The characteristics of flower color is the safest morphologic descriptor for distinguishing gladiolus cultivars. Depending on the characteristics of the contaminant cultivars and of the cultivars under analysis, it is possible to utilize morphologic descriptors for genetic purity certification in gladiolus cultivars. Out of the tested enzyme systems, low activity was detected for enzyme peroxidase, in the corms, without any occurrence of polymorphism among the tested cultivars. In leaves, for enzyme peroxidase, six electrophoresis patterns were generated. As regards enzyme system malate dehydrogenase in the corm tissues and in leaves, five different electrophoresis patterns were obtained. For alcohol dehydrogenase, in the bulbs'tissues, all the patterns obtained were monomorphic, except for one variety. For catalase, in leaves, no polimorphism

---

<sup>2</sup> Guidance committee: Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser), Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado (Co-adviser).

in the patterns of the studied cultivars was found. By means of enzyme  $\alpha$ -amylase, in corms and of esterase, in leaves, it was possible to distinguish all the cultivars. With relation to RAPD use for characterizing the gladiolus cultivars, polymorphism was found in nine of the tested primers. By means of RAPD technique, it was possible to distinguish eight cultivars out of the eleven evaluated in that study. The similarity of the cultivars evaluated by means of the enzyme markers ranged from 0.32 to 0.69 and that observed by means of RAPD markers did from 0.38 to 0.64.



## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente a floricultura brasileira representa um setor altamente competitivo e exigente em tecnologias novas e avançadas. Trata-se da segunda atividade que mais cresceu no país e abrange desde o cultivo de plantas ornamentais, flores de corte, plantas envasadas, folhagem ou floríferas, até a produção de sementes, cormos e mudas de várias espécies.

O gladiolo, também conhecido como palma-de-Santa-Rita ou simplesmente palma, tem grande importância como flor de corte, sendo bastante utilizado em arranjos florais de formaturas, casamentos, além de também ser tradicionalmente utilizado na ornamentação de túmulos no dia de finados.

A produção brasileira de hastes de gladiolo é de 6 milhões por ano e, aproximadamente, 65 milhões de cormos e a maior parte da produção de cormos é direcionada para a exportação (Vilela, 2005). No mercado externo, a Holanda é considerada um mercado importante, já que no ano de 2007, 57,3% das exportações dos produtos da floricultura brasileira foram destinadas para esse país, com possibilidades de aumento desse número (Hortica Consultoria e Treinamento, 2007). Para isso, tornam-se necessárias a redução dos custos de produção e o aumento da oferta de produto com alta qualidade, objetivando atender às exigências do mercado externo.

Para manter nesse mercado, as empresas produtoras de cormos procuram monitorar todo o processo produtivo visando a um produto com alta pureza genética e física e qualidades fisiológica e sanitária. A pureza genética das cultivares deve ser mantida desde a instalação da cultura até a comercialização. Devem ser evitadas contaminações varietais, ou seja, a mistura de cultivares diferentes de uma mesma espécie para a obtenção de uma cultura pura em

relação, por exemplo, à cor da flor, característica importante para a comercialização de gladiolo.

Os marcadores morfológicos são tradicionalmente usados na caracterização de cultivares e têm sua importância reconhecida. Apresentam, porém, algumas limitações principalmente pelo efeito do ambiente, fazendo com que não sejam marcadores estáveis, além de muitos serem avaliados somente nas plantas adultas, o que requer tempo e espaço (Vieira, 2004).

Os marcadores moleculares de proteínas, também, são produtos de expressão gênica e podem ser utilizados como descritores para a caracterização de cultivares (Vieira, 2004). Esses marcadores apresentam, na maioria dos casos, polimorfismo os quais permitem distinguir, em várias espécies, um grande número de cultivares, sendo rápido e de fácil execução. Segundo Bonow (2004), esses marcadores apresentam deficiências, principalmente quanto à estabilidade dos padrões isoenzimáticos, em materiais com diferentes níveis de qualidade. Os padrões isoenzimáticos podem variar ainda em função da parte e do estágio de desenvolvimento da planta analisada.

A utilização de marcadores de DNA pode ser uma ferramenta interessante para a caracterização de cultivares. Esses marcadores são mais precisos, não sofrem influência do ambiente e podem ser analisados em qualquer parte da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento.

Acredita-se que o levantamento de marcadores, visando à identificação de cultivares, assim como a certificação da pureza genética dessa espécie seja importante nos programas de controle de qualidade das empresas para garantir a comercialização de cormos de gladiolo com alta pureza genética.

Pelo fato de não ter sido encontrado na literatura trabalhos científicos visando à caracterização de cultivares de gladiolo, introdução, referencial teórico e discussão dos resultados tornaram-se comprometidos. No entanto, com essa

pesquisa objetivou-se fazer um levantamento dos descritores morfológicos e de marcadores moleculares de enzimas e de DNA que possam ser utilizados na identificação de cultivares dessa espécie visando à certificação da pureza genética.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos botânicos, culturais e econômicos da cultura do *Gladiolus* sp.

O gladiolo é uma planta cormosa de clima tropical e subtropical, originária do continente africano, pertencente à família botânica Iridaceae, subfamília Ixioidea, envolve entre 250 a 300 espécies (Rees, 1992). Segundo Rees (1992), Wilfret (1992) e Joly (1993), o híbrido designado de *Gladiolus x grandiflorus* L. é o principal representante do gênero e apresenta diferentes formas, cores ou cultivares botânicas.

Os gladiolos são plantas pertencentes ao grupo das herbáceas cormosas, atingindo de 50 a 90 cm de altura, com o cormo-sólido, folhas laminadas e longas, caule tipo escapo e inflorescência tipo espiga, ereta e não ramificada, com flores de variadas cores. Sua propagação ocorre, principalmente, por meio de cormos, sendo as sementes utilizadas somente em programas de melhoramento (Salinger, 1991). A temperatura ideal para o cultivo é entre 20 e 25°C, podendo ser cultivado também numa faixa de temperatura entre 15 a 30°C. São sensíveis a geadas e, quando expostas a essas situações, apresentam queimadura nas folhas e atraso na produção de flores (Paiva, 2003). A flor é mais sensível a mudanças climáticas, e a queda de temperatura resulta, imediatamente, em um atraso de produção. O excesso de chuva e de granizo prejudica ainda mais.

As cultivares de gladiolo são divididas em função do período necessário para o florescimento. Há cultivares de ciclo curto (60-65 dias), médio (75-85 dias) e longo (100-120 dias) (Paiva, 2003). O conhecimento do ciclo da cultivar

é importante, pois em algumas situações torna-se necessário o escalonamento do plantio para a disponibilização do produto no mercado.

Diferentes de muitas flores que precisam ser cultivadas em estufas, o gladiolo pode ser cultivado no campo, exigindo, portanto, um investimento menor e, em casos de doenças, a produção pode ser transferida para outra área, além de apresentarem um ciclo curto, tendo um rápido retorno da produção (Paiva, 2003).

A demanda pelos cormos dessas flores no mercado externo vem contribuindo para o investimento de empresas nacionais nessa espécie. No entanto, há uma grande exigência dos países importadores quanto à pureza genética das cultivares comercializadas, principalmente, em relação à cor da flor. Segundo Anefalos & Caixeta-Filho (2005), para que as flores brasileiras elevem sua participação no mercado internacional, o setor terá que enfrentar restrições, dentre as quais se destaca a adequação aos padrões de qualidade, incluindo a pureza genética.

## 2.2 Pureza genética

O aumento da produtividade agrícola deve-se à utilização de tecnologias avançadas, como o uso de produtos com alta qualidade. Esses produtos sejam eles sementes, cormos ou mudas devem somar vários atributos como, pureza genética, pureza física, poder germinativo, vigor, uniformidade e sanidade. Segundo Andreoli (1991), para garantir essa qualidade, são estabelecidos padrões que beneficiam todos os segmentos da agricultura e asseguram a qualidade por meio de uma série de funções e atividades, denominadas controle de qualidade.

Na produção de cormos de gladiolo, tanto para o mercado interno quanto para o externo, a presença de cormos de outras cultivares não é tolerada, tendo

em vista os prejuízos causados posteriormente, com a sua multiplicação. A garantia da pureza genética é primordial para as empresas produtoras de cormos. Segundo Ramos (2004), a presença de material propagativo de outras cultivares em um lote acarreta a perda da pureza genética. Isso ocorre, por exemplo, durante a colheita, classificação, transporte e armazenamento.

A certificação da pureza genética em gladiolo, principalmente, para fins de exportação, cujo mercado é bem mais exigente em qualidade, é de extrema importância para a comercialização de cormos de gladiolo, pois cada cultivar de gladiolo tem um ciclo, o que requer escalonamento no plantio para a obtenção das flores numa mesma época. No entanto, se houver contaminações varietais, o florescimento ocorrerá em épocas distintas em cada cultivar.

Por meio da análise de pureza genética, pode-se determinar a presença de mistura de cormos na amostra e a porcentagem de sua ocorrência. Na certificação da pureza genética podem ser utilizados descritores morfológicos, fisiológicos, citológicos e bioquímicos (*Association of Official Seed Analysis – AOSA*, 1983; Brasil, 1992; *International Seed Testing Association – ISTA*, 1996).

## 2.3 Técnicas para avaliação da pureza genética

### 2.3.1 Marcadores morfológicos

Um marcador morfológico é um fenótipo que deve ter fácil identificação, normalmente determinado por um único alelo e deve ser herdável. Outro ponto fundamental para um marcador ser eficiente na seleção é estar intimamente ligado ao alelo que se deseja selecionar, ou seja, eles tendem a ficar junto e sempre que um indivíduo expressar o fenótipo do marcador ele deverá também ser portador do alelo de interesse (Ramalho *et al.*, 2004).

Segundo Payne (1986), a avaliação da pureza genética é feita por meio da observação de determinadas características físicas dos materiais, comparando as amostras a serem testadas com uma amostra padrão da cultivar. Quando as diferenças morfológicas são facilmente visualizadas, tal avaliação possui diversas vantagens, como a rapidez, baixo custo e a pequena utilização de equipamentos. A maioria das novas cultivares, no entanto, possui características físicas muito semelhantes, fazendo com que haja dificuldade para essa avaliação. Em gladiolo, a avaliação da pureza genética dos cormos tem sido realizada por meio de marcadores morfológicos.

Uma grande limitação dos marcadores morfológicos é a sua ocorrência em número reduzido e, conseqüentemente, insuficiente para marcar alelos de interesse de vários genes da espécie (Ramalho *et al.*, 2004). Somente a observação do fenótipo dos cormos e das plantas até o estágio vegetativo para a avaliação da pureza genética, não oferece informações sobre os atributos genéticos de interesse, como os relacionados à cor da flor.

É importante ressaltar que a avaliação de características morfológicas de plântulas e plantas adultas pode ser considerada uma vantagem no caso de identificação de cultivares, mas uma desvantagem para a análise de pureza genética (Smith & Register III, 1998), uma vez que esperar até os estágios avançados da maturidade, para identificar contaminações em lotes de cormos, pode atrasar as decisões sobre o destino do lote (Ramos, 2004).

As características morfológicas variam, ainda, com o ambiente de produção, reduzindo a precisão dos resultados da análise da pureza genética (Ditmer, 1979; Schmidt, 1979; Cooke, 1984).

Em plantas de milho, por exemplo, a interação genótipo x ambiente pode levar à variação na intensidade da pigmentação de antocianina e da sua distribuição nas partes da planta de milho, que induzem à descaracterização do



fenótipo e dificultam a sua comparação com padrões de referência (Ramos, 2004). Esse pigmento tem sido utilizado com frequência em algumas culturas como marcador para a certificação da pureza genética.

O pigmento antocianina pertence ao grupo de flavanóides, de coloração púrpura e no milho pode estar presente no coleóptilo, raiz primária, lígula, folha, colmo, estilo-estigma, gluma, antera pericarpo e escutelo, entre outros tecidos. Seu uso como marcador, entretanto, pode trazer problemas devido à sua elevada variação de intensidade, observada em diferentes estádios fenológicos e partes da planta (Srivastava & Agrawal, 1995). Os autores enfatizam que o entendimento da genética da pigmentação de antocianina, em milho, é dificultado pela presença de vários genes antocianínicos. Dezesete locos então envolvidos na elaboração e distribuição do pigmento em vários tecidos de plantas e sementes; destes, nove são responsáveis pela expressão do pigmento na planta, contudo o alelo B parece ser o mais importante na determinação da presença da pigmentação.

Outros marcadores morfológicos além da antocianina, como formato, cor da folha, nervuras da folha, formato do corno, formato, tamanho e cor da flor também são de extrema importância.

Esses marcadores também são utilizados para estimar a divergência genética. Barbieri *et al.* (2005) com o objetivo de estimar a divergência genética entre populações de cebola avaliaram o peso, diâmetro, altura, coloração das túnicas externas, formato, uniformidade e conservação pós-colheita nas condições ambientais de Pelotas – RS. Verificaram que os caracteres morfológicos que foram avaliados foram suficientes para diferenciar as populações de cebola estudadas. Os caracteres que mais contribuem para a divergência entre os acessos foram a cor das cascas, o peso e a conservação pós-colheita dos cornos.

O alho e a cebola possuem a mesma maneira de propagação do gladiolo. A reprodução em escala comercial é assexuada, por meio de cormos e cormilhos.

Segundo Mota (2003), duas das características mais importantes e imprescindíveis na caracterização e distinção morfológicas de acessos de alho são a altura de plantas e o ângulo de inserção das folhas.

Por outro lado, Mota (2003) observou em alho que as características morfológicas não foram eficientes na seleção de cultivares e que as análises das características morfológicas não agruparam coerentemente as cultivares de alho conforme sua origem. Assim, a possibilidade de avaliação por meio de marcadores morfológicos é restrita, prejudicando a confiabilidade dos resultados dos testes.

Dessa forma, a utilização de marcadores moleculares é importante para a análise da pureza genética de cultivares, apresentando como vantagens a possibilidade de diferenciar indivíduos morfológicamente semelhantes, maior precisão, rapidez e confiança nos resultados obtidos.

### 2.3.2 Marcadores moleculares de enzimas

Dos marcadores moleculares de proteína, os mais usados são os enzimáticos e os de proteínas de reserva da semente. Como são produtos diretos dos alelos, basta identificá-los para selecionar o indivíduo com o fenótipo desejado, produzido pelo alelo de interesse (Ramalho *et al.*, 2004).

O termo isoenzima indica as diferentes formas moleculares nas quais as proteínas podem existir, com a mesma especificidade enzimática, em um único organismo (Webb, 1965). Essas são encontradas nas células de todos os organismos e podem exercer seus efeitos em muitos níveis da organização biológica. Não é apenas interessante estrutural ou funcionalmente, mas também

são provas poderosas de mecanismos fundamentais, tais como regulação, transmissão e evolução dos genes (Schwartz, 1960). As proteínas podem ser avaliadas por meio da técnica de eletroforese, que consiste num método bioquímico que separa moléculas por meio de um campo elétrico. Diferenças na mobilidade das proteínas, quando submetidas a um campo elétrico, resultam das seqüências distintas de nucleotídeos que codificam tais proteínas, logo se assume que diferenças nos padrões eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (Murphy *et al.*, 1990).

O uso de técnicas eletroforéticas de proteínas tem sido avaliado na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, por se tratar de uma técnica rápida, relativamente barata e operacionalmente acessível (Borém & Caixeta, 2006). De acordo com Kiang & Gorman (1983), as isoenzimas se constituem em valiosos marcadores na identificação de cultivares, em programas de certificação e testes de pureza em lotes de sementes. Da mesma forma, Orman *et al.* (1991) referem-se à análise de isoenzimas como uma ferramenta de alta utilidade na determinação da pureza genética em plantas.

Muitas isoenzimas têm sido úteis para a separação de genótipos de várias espécies como milho (Salgado *et al.*, 2006), arroz (Bonow, 2004), feijão e soja (Vieira, 2004).

Borém & Caixeta (2006) relatam que a estabilidade das isoenzimas dos diversos tecidos vegetais submetidos a condições ambientais distintas é variável, como temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral, injúria mecânica e associações com microrganismos podem influenciar a expressão isoenzimática, comprometendo os resultados. Além disso, existe uma especificidade de determinadas isoenzimas em certos tecidos ou órgãos vegetais.

Ressalta-se, ainda, que número de marcadores de enzimas em uma espécie é relativamente pequeno. Os alelos das proteínas facilmente

identificáveis, que são os marcadores, não ocorrem em número suficiente para marcar um grande número de alelos de interesse de vários genes. Devido a isso, a utilidade dos mesmos torna-se reduzida (Ramalho *et al.*, 2004).

Dessa forma, o uso de marcadores moleculares em nível de DNA torna-se promissor e mais seguro para a identificação e certificação da pureza genética de cultivares.

### 2.3.3 Marcadores moleculares de DNA

Por meio dos marcadores moleculares de DNA, diferenças genéticas geradas por mutações de ponto ou por aberrações cromossômicas, as quais são repassadas aos seus descendentes podem ser detectadas. Marcadores de DNA são, portanto, diferenças nas seqüências de nucleotídeos, as quais podem ser identificadas e, muitas vezes, suas funções permanecem desconhecidas. Dependendo dos procedimentos, as diferenças de nucleotídeos que constituem os marcadores moleculares podem ser quantificadas, qualificadas e seu comportamento é verificado em acordo com as leis básicas da herança de Mendel, definindo-os como marcadores genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1995, 1998).

As variações detectadas nas seqüências de DNA têm sido exploradas para a geração de tecnologias que permitem a obtenção de marcadores genéticos em plantas. Esses marcadores podem ser utilizados para diferentes aplicações como a determinação de divergência genética, relações evolutivas entre espécies, construção de mapas genéticos e identificação de genes ou alelos de interesse e identificação de cultivares.

Um das técnicas utilizadas para a detecção das variações nas seqüências de DNA é a PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação de Polimerase em Cadeia), que se baseia na síntese *in vitro* de um segmento de

DNA delimitado por um par de *primers* de fita simples, obtendo-se grande quantidade de fragmento de DNA, e por repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão pela ação da enzima DNA polimerase produzindo um aumento do fragmento de DNA (Borém & Caixeta, 2006).

Para a análise baseada em PCR, entretanto, há necessidade de se conhecer a seqüência de ligação entre o *primer* e o DNA molde (Williams *et al.*, 1990). A vantagem dessa técnica é gerar a amplificação do DNA molde em escala geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de DNA molde (Müllis & Faloona, 1987). Devido à facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da técnica PCR tornaram-na uma ferramenta fundamental para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

Um das variações da técnica de PCR é a tecnologia do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) (Borém & Caixeta, 2006). A técnica do RAPD consiste na extração do DNA de indivíduos, amplificação de fragmentos destes DNAs pela técnica de PCR, separação de fragmentos amplificados de comprimentos diferentes por eletroforese em gel e visualização de bandas correspondentes a regiões amplificadas do genoma por meio de coloração dos fragmentos de DNA, diretamente no gel (Sakiyama, 1993).

A técnica de RAPD é considerada simples, pois é fácil de ser executada, rápida na obtenção dos dados, o custo relativamente reduzido em relação as outras técnicas moleculares e aplicável a qualquer tipo de organismo, sendo largamente utilizada (Borém & Caixeta, 2006).

Os marcadores moleculares de RAPD têm sido utilizados em várias espécies com diferentes propósitos, como na confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *passiflora* em maracujá (Junqueira *et al.*,

2008), na seleção de um método para a extração de DNA de folhas de pau-rosa (Santos, 2007), na obtenção de informações das relações genéticas e da possibilidade de cruzamento interespecífico em gladiolo (Takatsu *et al.*, 2001), entre outros.

Os dados oriundos dos marcadores moleculares, entre outras aplicações, podem fornecer uma estimativa de distâncias ou similaridades genéticas que quantificam o grau de diferenciação entre conjuntos de organismos. Permitem, assim, a transformação de toda a informação genética disponível sobre as relações entre conjuntos em um único número que pode ser utilizado para proporcionar uma classificação objetiva e estável, tanto quanto possível, dos itens sob estudo (Telles *et al.*, 2001).

Os marcadores RAPD são dominantes, visto que a presença de uma determinada banda não determina se o loco correspondente é homozigoto (AA) ou heterozigoto (Aa) (Borém & Caixeta, 2006). Para os marcadores moleculares são revelados marcas ou fragmentos que permitem comparar os indivíduos em estudo quanto à sua presença ou ausência. Outra característica do RAPD é que durante a reação utiliza-se um único *primer* arbitrário.

Zufall & Rausher (2003), por meio de uma reação de PCR específico, diferenciaram genótipos de *Ipomea purpurea*. De maneira geral, foi possível distinguir os genótipos homozigotos provenientes de flores de coloração roxa, dos homozigotos de flores de cor rosa e os genótipos heterozigotos provenientes de flores de cor roxa. Segundo os autores, como a análise pode ser realizada em DNA genômico, obtido por meio de cotilédones ou de folhas jovens, a cor da flor pode ser determinada semanas antes do início do florescimento, pois o gene já está presente no DNA, porém não está expresso.

Durbin *et al.* (2003), ao estudarem os genes que determinam a cor da flor em *Ipomea purpurea* concluíram que ainda não se sabe a base molecular

para as mudanças da cor da flor, mas observaram que as mutações na regulação gênica são mais importantes que as mudanças estruturais dos genes na evolução da cor da flor.

Pesquisas relacionadas à identificação de cultivares de espécies de flores por meio de marcadores morfológicos e moleculares de enzimas e de DNA ainda é incipiente, havendo a necessidade de pesquisas nessa área.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOLI, C. Controle de qualidade da semente: conceito e estratégia. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 54-56, jun. 1991.

ANEFALOS, L. C.; CAIXETA-FILHO, J. V. O papel da logística na exportação de flores de corte. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1983. 88 p. (Contribution, 32).

BARBIERI, R. L.; LEITE, D. L.; CHOER, E.; SINIGAGLIA, C. Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, mar./abr. 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-4782005000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-4782005000200009)>. Acesso em: 15 fev. 2007.

BONOW, S. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz**. 2004. 125 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

COOKE, R. J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 5, p. 59-72, 1984.

DITMER, W. P. Varital determination made in the seed laboratory. **Journal of Seed Technology**, Zurich, v. 3, n. 2, p. 42-47, 1979.

DURBIN, M. L.; LUNDY, K. E.; MORRELL, P. L.; TORRES-MARTINEZ, C. L.; CLEGG, M. T. Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, p. 507-518, 2003. Disponível em:



<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=14615189&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=14615189&dopt=Abstract)>. Acesso em: 20 mar. 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

HÓRTICA CONSULTORIA E TREINAMENTO. **Hortica news**. 2007. Disponível em: <[http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc\\_Floricultura\\_2007.pdf](http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc_Floricultura_2007.pdf)>. Acesso em: 11 mar. 2008.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 44 p.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 11. ed. São Paulo: Nacional, 1993. 777 p.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. de. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 191-196, mar. 2008.

KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B. Soybean. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isoenzymes in plant genetics and breeding**: part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 295-328.

MOTA, J. H. **Diversidade genética e características morfológicas, físico-químicas e produtivas de cultivares de *Allium sativum* L.** 2003. 66 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Disponível em:

<[http://www.ceud.ufms.br/~jmota/curiculo\\_arquivos/TeseDr%20Mota.pdf](http://www.ceud.ufms.br/~jmota/curiculo_arquivos/TeseDr%20Mota.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2007.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, Oxford, v. 155, p. 335, 1987.

MURPHY, R. W.; SITES, J. W.; BUTH JUNIOR, D. G.; HAUFLER, C. H. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

ORMAN, B. A.; LAWERENCE, G. D.; DOWNES, P. M.; PHILLIPS, D. S. Assessment of maize inbred genetics purity by isozyme electrophoresis. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 19, n. 3, p. 527-535, 1991.

PAIVA, P. D. de O. **Floricultura 1: cultivo do gladiolo (palma-de-santa-rita)**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 18 p. (Textos acadêmicos).

PAYNE, R. C. Cultivar testing by official AOSA seed laboratories. **Journal of Seed Thecnology**, Lansing, v. 10, n. 1, p. 24-36, 1986.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3. ed. São Paulo: UFLA, 2004. 472 p.

RAMOS, N. P. **Determinação da pureza varietal em lotes de sementes de milho através de marcadores morfológicos e microssatélites**. 2004. 104 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

REES, A. P. **Ornamental corms, corms and tubers**. Wallingford: CAB International, 1992. 220 p.

SAKIYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 204-205, nov. 1993.

SALGADO, K. C. P. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, C. T.; PINHO, R. G. von; SOUZA, L. V. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 169-175, 2006.

SALINGER, J. P. Gladiolus. In: \_\_\_\_\_. **Producción comercial de flores**. Zaragoza: Acribia, 1991. cap. 12, p. 119-140, 371 p.

SANTOS, R. P.; ANGELO, P. C. da S.; QUINSEN, R. C.; OLIVEIRA, C. L.; SAMPAIO, O. de B. RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para colheita de amostras *in situ*, ajuste das condições de PCR e

apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, n. 2, p. 253-260, jun. 2007.

SCHAWARTZ, D. Genetic studies on mutant enzymes in maize: synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. **Proceeding of the National Academic Science of the USA**, Washington, v. 46, p. 1210-1215, 1960.

SCHMIDT, J. W. A plant breeder looks at the problem of distinguishing cultivars. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v. 3, n. 2, p. 57-60, 1979.

SMITH, J. S. C.; REGISTER III, J. C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 285-293, June 1998.

SRIVASTAVA, J. M.; AGRAWAL, B. D. Phenotypic variability in parental lines of some released maize hybrids. **Seed Research**, New Delhi, v. 13, n. 1, p. 8-15, 1985.

TAKATSU, Y.; MIYAMOTO, M.; INOUE, E.; YAMADA, T.; MANABE, T.; KASUMI, M.; HAYASHI, M.; SAKUMA, F.; MARUBASHI, W.; NIWA, M. Interspecific hybridization among wild *Gladiolus* species of southern Africa based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Scientia Horticulturae**, Tokio, v. 91, p. 339-348, 2001.

TELLES, M. P. C.; MONTEIRO, M. S. R.; RODRIGUES, F. M.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; AMARAL, A. G.; MARRA, P. R. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 87-95, jul./dez. 2001.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VILELA, H. Gladiolo, assim nasceu a cidade de Holambra. **Revista Setembro**, Holambra, p. 30-34, jul. 2005.

WEBB, E. C. The nomenclature of multiple enzyme forms. **Ezymology Biology Clinics**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 124-125, Dec. 1965.

WILFRET, G. J. *Gladiolus*. In: LARSON, R. A. **Introduction to floriculture**. 2. ed. San Diego: Academic, 1992. cap. 6, p. 143-157.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. R.; LIVAR, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

ZUFALL, R. A.; RAUSHER, M. D. The genetic basis of a flower color polymorphism in common morning glory (*Ipomea purpurea*). **Journal of Heredity**, Durham, v. 94, n. 6, Nov. 2003. Disponível em:

<<http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/content/full/94/6/442>>. Acesso em: 10 fev. 2008.

## **CAPÍTULO 2**

### **IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES E CERTIFICAÇÃO DA PUREZA GENÉTICA DE GLADÍOLO POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS**

## 1 RESUMO

FERREIRA, Clarissa Alves. Identificação de cultivares e certificação da pureza genética de gladiolo por meio de marcadores morfológicos. In: \_\_\_\_\_. **Identificação de cultivares de gladiolo por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2008. p. 16-52. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>3</sup>

A caracterização de cultivares de flores é fundamental nos processos de registro e proteção dessas e também na certificação da pureza genética. Nesse trabalho foram realizadas a caracterização e a certificação da pureza genética de cultivares de *Gladiolus sp.* por meio de marcadores morfológicos. Utilizaram-se onze cultivares de *Gladiolus sp.*, e para a caracterização das cultivares, as parcelas foram constituídas de 25 plantas avaliando-se características dos cormos, folhas e flores. O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados, com quatro repetições. Para a certificação da pureza genética, foram instaladas parcelas constituídas de 24 plantas e cormos contendo contaminação varietal em diferentes proporções. Foram utilizadas três cultivares para compor os tratamentos e as avaliações foram conduzidas por três avaliadores que desconheciam a porcentagem existente de contaminação varietal. Foram calculadas as porcentagens de acerto e de erro com base nos resultados obtidos das avaliações. Foi calculado o desvio padrão da média dos resultados nas quatro repetições, obtidos pelos três avaliadores. Para verificar a significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos avaliadores foi utilizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Por meio de características do corno é possível diferenciar quatro cultivares das onze avaliadas. A característica da cor das flores é o descritor morfológico mais seguro para a diferenciação das cultivares de gladiolo. Dependendo das características das cultivares contaminantes e das em análises é possível utilizar descritores morfológicos para a certificação de pureza genética em cultivares de gladiolo.

---

<sup>3</sup> Comitê Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Orientador), Prof<sup>a</sup> Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA, Dra. Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado.

## 2 ABSTRACT

FERREIRA, Clarissa Alves. Identification of cultivars and genetic purity certification in gladioli by morphological markers. In: \_\_\_\_\_. **Identification of cultivars in gladioli through morphologic and molecular markers**. 2008. p. 16-52. Dissertation (Master in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>4</sup>

The characterization of flower cultivars is fundamental in the registration and protection processes and also in the genetic purity certification. In this work, both the characterization and the genetic purity certification of cultivars of *Gladiolus* sp by means of morphologic markers were made. Eleven cultivars of *Gladiolus* sp. were utilized and for the characterization of the cultivars, the plots were made up of 25 plants, evaluating the characteristics of corms, leaves and flowers. The used experimental design was the one of randomized blocks with four replicates. For the genetic purity certification, plots with 24 plants and corms containing varietal contaminations in different proportions were established. Three cultivars were used to make up the treatments, and the evaluations were conducted by three evaluators who were unaware of the existent percentage of varietal contamination. The percentage of mistakes was calculated based upon the obtained results of the evaluations. The standard deviation of the means of the results in the four replicates obtained by the three evaluators was calculated. In order to verify the significance of the deviations among the obtained results by the evaluators, Chi-square test ( $\chi^2$ ) was used. By means of corm characteristics, it is possible to distinguish four cultivars out of the eleven evaluated. The characteristic of flower color is the safest morphological descriptor for distinguishing gladiolus cultivars. Depending on the characteristics of the contaminant cultivars and on the ones under analyses, it is possible to use morphological descriptors for the genetic purity certification in gladiolus cultivars.

---

<sup>4</sup> Guidance Committee: Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser), Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

O gladiolo tem grande importância como flor de corte e pertence à família botânica Iridaceae, subfamília Ixioidea, envolvendo entre 250 a 300 espécies (Rees, 1992).

A propagação de gladiolo em escala comercial se faz por meio de cormos e cormilhos. As sementes são utilizadas somente quando se realizam cruzamentos.

Atualmente, para se manterem no mercado, as empresas produtoras de cormos procuram monitorar todo o processo produtivo visando a um produto com alta pureza genética evitando as contaminações varietais.

Segundo Payne (1986), a avaliação da pureza genética é feita por meio da observação de determinadas características físicas dos materiais, comparando as amostras a serem testadas com uma amostra padrão da cultivar. Quando as diferenças morfológicas são facilmente visualizadas, tal avaliação possui vantagens como a rapidez, baixo custo e a pouca utilização de equipamentos. A maioria das novas cultivares, porém, possui características físicas muito semelhantes, que dificultam essa avaliação. Atualmente, em gladiolo, a pureza genética dos cormos tem sido avaliada por meio de marcadores morfológicos.

Um ponto fundamental para um marcador ser eficiente na seleção é que esteja intimamente ligado ao alelo que se deseja selecionar, ou seja, eles tendem a ficar juntos e sempre que um indivíduo expresse o fenótipo do marcador ele deverá também ser portador do alelo de interesse (Ramalho *et al.*, 2004). Além disso, outras características são essenciais para um bom marcador morfológico que se resume em ser um fenótipo de fácil identificação, normalmente determinado por um único alelo e ser herdável.



Uma grande limitação dos marcadores morfológicos é a sua ocorrência em número reduzido e, conseqüentemente, insuficiente para marcar alelos de interesse de vários genes da espécie (Ramalho *et al.*, 2004). Somente a observação do fenótipo dos cormos e das plantas até o estágio vegetativo para a avaliação da pureza genética não oferece informações sobre os atributos genéticos de interesse, como os relacionados à cor da flor.

Vale ressaltar que a avaliação de características morfológicas de plântulas e plantas adultas pode ser considerada uma vantagem no caso de identificação de cultivares, mas uma desvantagem para a análise de pureza genética (Smith & Register III, 1998), uma vez que esperar até os estágios avançados da maturidade, para identificar contaminações em lotes de cormos, pode atrasar as decisões sobre o destino do lote (Ramos, 2004). Além disso, as características morfológicas podem variar em relação ao ambiente de produção, reduzindo a precisão dos resultados da análise da pureza genética (Ditmer, 1979; Schimidt, 1979; Cooke, 1984).

Apesar de apresentarem limitações por requererem tempo e espaço e muitos serem avaliados em plantas adultas, os marcadores morfológicos são tradicionalmente usados na caracterização de cultivares, para o registro e proteção de cultivares (Vieira, 2004). Por meio da caracterização morfológica é fornecida uma série de informações a respeito da variabilidade genética de cada acesso estudado (Guimarães *et al.*, 2007).

As pesquisas relacionadas com certificação da pureza genética em flores são insuficientes para a identificação das diferentes cultivares existentes.

Nesse trabalho foram realizadas a identificação e a certificação da pureza genética de cultivares de *Gladilous sp.* por meio de marcadores morfológicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na área experimental do Setor de Floricultura do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, MG.

### 4.1 Materiais Genéticos

Foram utilizados cormos de onze cultivares diferentes de gladiolo, com perímetro de 10 a 12 cm, provenientes da Empresa Terra Viva, localizada na cidade de Holambra, SP, como descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Descrição de diferentes cultivares de gladiolo utilizadas na pesquisa. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Cultivares</b>	<b>Floresc. (dias)</b>	<b>Coloração das Flores</b>
1 White Friendship	65	Branca
2 White Goddess	75	Branca
3 Priscilla	75	Rosa, Branca E Amarela
4 Rose Friendship	65	Rosa
5 San Martin	75	Rosa
6 Gold Field	85	Amarela
7 Yester	85	Amarela com o Centro Vermelho
8 T 704	75	Lilás
9 Traderhorn	75	Vermelho Com Branco
10 Red Beauty	75	Vermelho
11 Peter Pears	70	Coral

Para a caracterização das cultivares por meio de marcadores morfológicos, foi instalado um experimento em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados. Cada bloco foi constituído de um canteiro (3,70 x 1,50 m), sendo os tratamentos, constituídos pelas diferentes cultivares, distribuídas ao acaso. Cada parcela foi composta de 25 plantas.

O preparo do solo para o plantio do gladiolo foi constituído de aração, seguida de gradagem. Logo após feita a abertura de sulcos, com 15 cm de profundidade.

Antes do plantio foi feito o controle de plantas daninhas com herbicida. Posteriormente foram controladas por meio de capinas manuais. O plantio, em cada parcela, foi realizado em linhas duplas, espaçadas de 10 cm. A profundidade de plantio foi de 15 cm e o espaçamento entre os sulcos de 40 cm. Nas linhas, o espaçamento entre os cormos foi de 7 a 10 cm (Figura 1).

A adubação foi feita de acordo com a recomendação baseada em análise de solo e dividida no plantio e na cobertura, aos 30 dias e 50 dias após o plantio. A irrigação foi utilizada quando necessária, pelo método de aspersão.

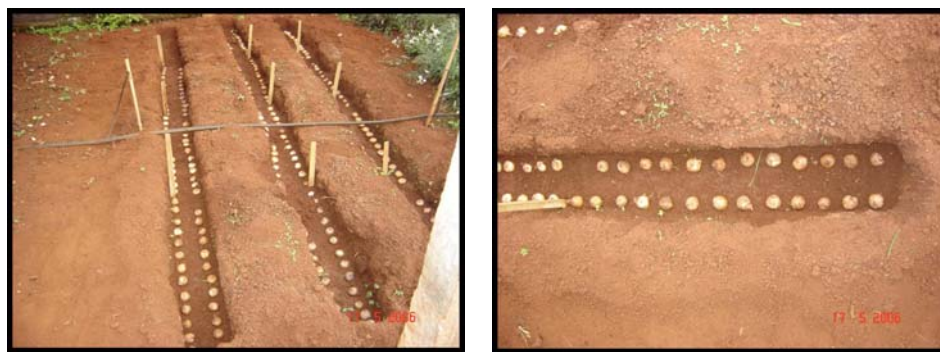


FIGURA 1 – Plantio dos cormos de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O tutoramento foi iniciado quando as plantas apresentaram 30 cm de altura. Foram utilizadas ripas, colocadas ao longo da linha de cultivo. O primeiro fio foi instalado a 30 cm do solo, e os demais foram distribuídos de acordo com o crescimento da planta, também espaçados de 30 cm (Figura 2).

Para o levantamento de características morfológicas com o potencial para a diferenciação das cultivares, tanto em cormos, antes e após o plantio,

como nas plantas em vários estágios de desenvolvimento foram avaliadas as seguintes características: peso, perímetro, cor da túnica, cor dos aros de inserção da túnica, cor dos cormos. No estágio vegetativo de plântulas e plantas foram avaliadas a cor, número e o tamanho (comprimento e maior largura) de folhas e a presença de antocianina nas folhas.



FIGURA 2 – Tutoramento das plantas de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No estágio reprodutivo avaliaram-se a cor da flor, porte da planta, tamanho da flor (comprimento e maior largura), número de flores, vida de vaso, comprimento da haste (Figura 3).

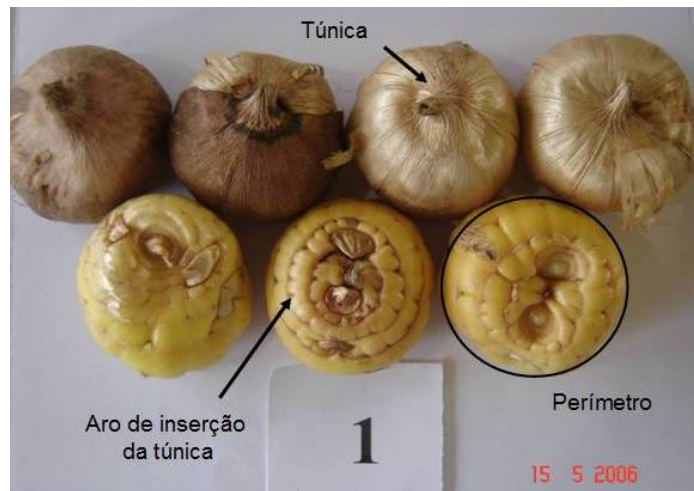


FIGURA 3 – Descritores utilizados na caracterização morfológica. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Scott-Knott 5%, pelo “software” Sisvar, Versão 4.0 (Ferreira, 1999).

Em um segundo experimento foi realizada a certificação da pureza genética em cultivares de gladiolo por meio de marcadores morfológicos.

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Setor de Floricultura. Foi utilizado delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, cada bloco foi constituído de um canteiro (3,40 x 2,00 m), sendo cada parcela constituída por uma linha de 2,00 m de comprimento, com três cultivares em análise e com três contaminantes, com valores de contaminação de uma segunda cultivar (Tabela 2 e Figura 4). A densidade foi de 24 plantas por parcela. O plantio, em cada parcela, foi realizado em linhas duplas, espaçadas de

10 cm. A profundidade de plantio foi de 15 cm e o espaçamento entre os sulcos de 70 cm. Nas linhas, o espaçamento entre os cormos foi de 7 a 10 cm.

Durante a semeadura, a localização dos cormos das cultivares contaminantes foi marcada com estacas. Após o desbaste, as estacas foram retiradas e o controle da posição das plantas contaminantes foi realizado por meio de um croqui.

TABELA 2 – Cultivares de gladiolo em análise e as contaminantes utilizadas na certificação da pureza genética das diferentes cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Cultivares em Análise</b>	<b>Contaminantes</b>	<b>Bloco</b>	<b>% de Contaminação</b>
1 White Friendship	2 White Goddess	1	4
		2	8
		3	0
		4	12
6 Gold Field	11 Peter Pears	1	8
		2	16
		3	4
		4	4
9 Traderhorn	4 Rose Friendship	1	0
		2	12
		3	12
		4	4



FIGURA 4 – Instalação do experimento para certificação da pureza genética. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Em cada parcela avaliada foi realizado o plantio da cultivar em análise na linha, com o objetivo de facilitar a identificação das contaminantes.

As avaliações foram realizadas por três avaliadores que desconheciam a porcentagem existente de contaminação. Os avaliadores foram previamente informados das características a serem observadas. As avaliações foram realizadas em cormos e em plantas, julgando quais eram provenientes de cada cultivar citada na Tabela 1 e quais eram contaminantes.

As plantas foram avaliadas no estágio vegetativo com 30 e 60 dias após o plantio e no estágio reprodutivo. Foram avaliados, ainda, os cormos, antes do plantio. Para essa avaliação, os cormos foram dispostos lado a lado em folhas de papel, numerados e foi utilizado o mesmo delineamento, número de repetições e percentual de contaminantes utilizados no campo. Os avaliadores também consideraram outras características que julgaram importantes para diferenciar as cultivares.

Foram calculadas as porcentagens de acerto e de erro com base nos resultados obtidos das avaliações. A porcentagem de acerto foi calculada pelo

quociente entre frequência observada e a frequência esperada, multiplicado por cem.

No cálculo da porcentagem de erro foram consideradas as plantas contaminantes que não foram identificadas pelos avaliadores e as não contaminantes que foram identificadas como contaminantes. O somatório dessas plantas foi dividido pelo número total de plantas na parcela e multiplicado por 100.

Foi calculado o desvio padrão da média dos resultados nas quatro repetições, obtidos pelos três avaliadores conforme Pimentel Gomes (1987). Para verificar a significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos avaliadores foi utilizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Nesse teste, os desvios foram transformados em um único valor de  $\chi^2$ , representando a medida padronizada da magnitude dos desvios (Ramalho *et al.*, 2004).

O valor de  $\chi^2$  foi estimado pela seguinte expressão:

$$\chi^2 = \sum (Fo - Fe)^2 / Fe$$

sendo:

- Fo: frequência observada de plantas contaminantes
- Fe: frequência esperada de plantas contaminantes

Os dados de frequência esperada e observada foram obtidos pela média das quatro repetições para cada avaliador.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das cultivares por meio de marcadores morfológicos

Pelos resultados obtidos na caracterização das cultivares em casa de vegetação (Tabelas 3), observou-se que, pela cor da túnica, só foi possível diferenciar a cultivar Traderhorn, que possui coloração rosa. Já por meio da coloração rosa da inserção da túnica, as cultivares San Martin, Gold Field e Peter Pears foram diferenciadas das demais, as quais possuem essa coloração dourada.

A cor dos cormos variou entre as cultivares, mas entre os tons de amarelo, a diferenciação não foi possível, cinco cultivares apresentaram cormos de coloração amarela (Tabela 3). A diferenciação de tonalidades de cores próximas pode ser influenciada pela luminosidade no momento de avaliação para a definição da cor (Bonow *et al.*, 2007). Devido a esse fato, torna-se difícil a distinção das cultivares por esse descritor. A cor dos cormos é considerada um descritor importante, pois o quanto antes as cultivares forem diferenciadas melhor para o controle de qualidade da empresa produtora.

Por meio da cor das folhas não foi possível separar as cultivares analisadas, exceto a Traderhorn que possui as folhas verdes arroxeadas (Tabela 3). As demais cultivares possuíam folhas de colorações verdes, variando apenas a tonalidade. Devido à variação do nível de nitrogênio disponível no solo, deve-se tomar cuidado com a variação da cor da folha e, geralmente, nas folhas mais jovens essa tonalidade é alterada (Bonow *et al.*, 2007).

TABELA 3 – Caracterização morfológica de onze cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

	WITHE FRIENDSHIP	WHITE GODDESS	PRISCILLA	ROSE FRIENDSHIP	SAN MARTIN	GOLD FIELD	YESTER	T 704	TRADERHORN	RED BEAUTY	PETER PEARS
Cor Da Túnica	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro	Rosa	Dourado E Rosa Claro	Dourado E Rosa Claro
Cor Da Inserção Da Túnica	Dourado	Dourado	Dourado	Dourado	Rosa	Rosa	Dourado	Dourado	Dourado	Dourado	Rosa
Cor Dos Cormos	Amarelo	Amarelo	Rosa Goiaba Claro	Amarelo	Laranja Claro	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho Escuro	Laranja	Amarelo
Cor Das Folhas	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde E Arrouxeada	Verde	Verde
Presença De Antocianina Na 1ªfolha	Sim. Vinho Abaixo Do Solo	Sim. Vinho Acima Do Solo	Sim. Vinho Acima Do Solo	Sim. Vinho Abaixo Do Solo	Sim. Vinho Acima Do Solo	Sim. Vinho Abaixo Do Solo	Não	Sim. Vinho Abaixo Do Solo	Sim. Vinho Acima Do Solo	Sim. Vinho Acima Do Solo	Sim. Vinho Acima Do Solo
Presença De Antocianina Entorno Do Limbo Foliar Na 2ªfolha	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Presença De Antocianina Na Ponta Da Folha	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Cor Das Flores	Branca	Branca Com Pontos Rosa	Rosa, Branca E Amarela	Rosa Claro	Rosa	Amarela	Amarela Com O Centro Vermelho	Lilás	Vermelha C/ O Centro Branco	Vermelha	Coral
Porte Da Planta	Baixo	Médio	Médio	Baixo	Médio	Alto	Médio	Médio	Médio	Alto	Alto

Foi observada a presença de antocianina na primeira folha (Tabela 3 e Figura 5) em todas as cultivares, exceto na cultivar Yester. Em alguns casos, porém, a presença de antocianina era observada somente no nível do solo, o que dificulta sua rápida visualização.

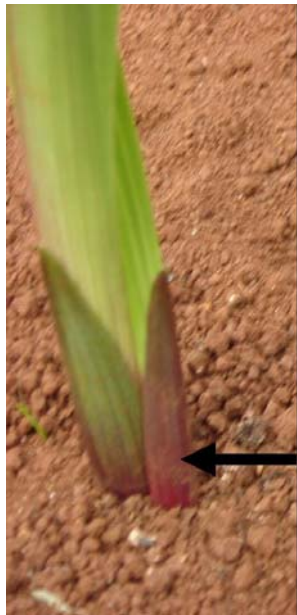


FIGURA 5 – Presença de antocianina na primeira folha acima do nível solo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A presença de antocianina também foi observada em torno do limbo foliar da segunda folha da cultivar Red Beauty e na ponta das primeiras folhas somente na cultivar White Goddess (Tabela 3 e Figura 6). Essa última, no entanto, foi observada somente no início do ciclo, provavelmente, devido a fatores ambientais. Segundo Bonow *et al.* (2007), em arroz, a herança da pigmentação de antocianina é bastante complexa, pois existem locos duplicados, série alélica múltipla para o mesmo loco. Observam-se pequenas diferenças na tonalidade e intensidade da cor entre os genótipos e essa variação

pode ser devido aos estádios de crescimento, fatores inibidores e/ou ambientais sobre o desenvolvimento da cor, como a luz, por exemplo.



FIGURA 6 – Presença de antocianina na ponta do limbo foliar das folhas no início do ciclo e a presença de antocianina em torno do limbo foliar da segunda folha. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A cor das flores foi o descritor mais seguro para diferenciar as cultivares pois, desse modo foi possível separar todas as cultivares analisadas (Tabela 3 e Figura 7). Esse descritor, contudo, pode ser observado somente na fase do florescimento da cultura, o que o torna inviável para um programa de controle de qualidade, visto que o ideal é que o contaminante seja identificado o mais cedo possível para o não comprometimento da comercialização.



White Friendship



White Goddess



Priscilla



Rose Friendship



San Martin



Gold Field

FIGURA 7 – Cores das flores das cultivares de gladiolo utilizadas no experimento. UFLA, Lavras, MG, 2006. “Continua”.

“FIGURA 7, Cont.”



Yester



T 704



Traderhorn



Red Beauty



Peter Pears

O porte da planta foi um marcador por meio do qual foi possível separar as cultivares em três grupos: porte alto, médio e baixo, sendo classificadas as cultivares White Friendship e Rose Friendship como de porte baixo, Gold Field, Red Beauty e Peter Pears como de porte alto e as demais como de porte médio (Tabela 3).

Algumas características morfológicas podem ser facilmente distintas, pois apresentam segregação descontínua e são denominadas de características qualitativas. No entanto nem todas as características apresentam esse tipo de segregação. Existem características que possuem uma distribuição essencialmente contínua, ou seja, entre os tipos mais extremos aparecem fenótipos intermediários (Ramalho *et al.*, 2004).

Observando a tabela 4, tanto o comprimento como a largura do limbo foliar diferiu entre as cultivares, tanto nos 30 dias após o plantio quanto na época da emissão da espiga. Somente as cultivares Gold Field e Red Beauty mantiveram o maior comprimento e maior largura do limbo foliar durante todo o ciclo da cultura. A cultivar Peter Pears estava pouco desenvolvida aos 30 dias e não pode ser avaliada, mas quando ocorreu a emissão da espiga, essa cultivar tinha o maior comprimento da folha e a segunda maior largura dentre as demais cultivares, logo essa característica é pouco estável, ocorrendo considerável variação entre as cultivares nas diferentes épocas analisadas. Mota (2003) trabalhou com essa característica e conseguiu diferenciar as cultivares de alho dentro do grupo semi-nobre, já para as cultivares do grupo nobre não foi possível a diferenciação.

TABELA 4 – Características morfológicas quantitativas de onze cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

	Withe Friendship	White Goddess	Priscilla	Rose Friendship	San Martin	Gold Field	Yester	T 704	Traderhorn	Red Beauty	Peter Pears	F tratam.	CV (%)
<b>Comprimento da folha aos 30 dias (cm)</b>	40,46 b	41,75 b	34,06c	48,11a	23,22d	46,36a	35,78c	38,40b	43,70a	48,32a	0,0e	78,91	8,72
<b>Largura da folha aos 30 dias (cm)</b>	3,18b	3,96a	2,79c	4,21a	1,38d	3,16b	2,68c	2,61c	2,37c	2,83c	0,0e	65,16	10,85
<b>Número de folhas aos 30 dias</b>	3,00a	3,50a	3,00a	3,50a	2,00b	3,50a	3,00a	3,25a	3,25a	3,75a	1,75b	8,33	14,35
<b>Número de folhas na EE</b>	6,00c	7,00b	6,75c	7,00b	6,50c	8,00a	7,25b	6,50c	6,50c	7,00b	7,00b	7,92	5,35
<b>Comprimento de folhas na EE (cm)</b>	83,55e	101,97c	107,64b	81,92e	101,63c	121,52a	91,64d	89,95d	110,17b	113,88a	121,52a	34,13	4,58
<b>Largura da folha na EE(cm)</b>	4,38a	4,40a	4,50a	4,44a	3,41c	3,85b	3,99b	3,23c	3,39c	3,59c	3,98b	10,22	7,46
<b>Número de flores na haste</b>	8,25b	8,25b	7,00b	8,00b	7,75b	10,25a	7,25b	8,00b	9,00a	7,25b	10,00a	5,16	11,44
<b>Comprimento da haste (cm)</b>	60,92a	66,60a	62,22a	67,31a	71,99a	77,88a	70,89a	65,29a	68,28a	61,37a	65,18a	2,52	9,54
<b>Vida de vaso (dias)</b>	4,25b	4,75b	5,75a	4,50b	4,75b	4,25b	4,50b	5,50a	4,50b	5,25a	3,75b	4,83	11,40
<b>Comprimento da flor (cm)</b>	8,54b	8,29b	9,34a	8,65b	9,76a	9,35a	8,17b	9,11a	8,97a	9,11a	8,46b	3,09	6,42
<b>Largura da flor (cm)</b>	9,54b	9,46b	10,08a	10,11a	10,00a	10,49a	9,39b	8,64c	9,95a	9,41b	9,22b	6,08	4,36
<b>Peso dos bulbos AP (g)</b>	22,06b	28,28a	20,39b	18,18c	17,23c	30,21a	18,02c	14,94c	16,22c	20,71b	22,14b	12,68	17,18
<b>Perímetro dos cormos AP (cm)</b>	12,91a	13,83a	12,88b	12,09c	12,14c	14,60a	12,83b	12,43c	12,11c	12,51c	13,14b	8,07	5,62
<b>Peso dos cormos DC (g)</b>	34,63b	55,39a	44,39a	31,83b	58,34a	49,57a	38,17b	26,81b	25,15b	34,90b	39,57b	6,61	21,40
<b>Perímetro dos cormos DC(cm)</b>	16,35b	17,97a	18,36a	16,29b	19,09a	17,17b	16,61b	15,05b	15,41b	15,93b	17,06b	5,18	6,48

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, na linha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

EE – emissão da espiga; AP – antes do plantio; DC – depois da colheita.



Por meio do número de folhas aos 30 dias após o plantio, foi possível diferenciar as cultivares em dois grupos. Somente as cultivares Peter Pears e San Martin possuíam um menor número de folhas em relação às outras (Tabela 4). Quando foi realizada uma avaliação nas cultivares no momento da emissão da espiga, o número de folhas diferenciou a cultivar Gold Field, com o maior número em relação às demais (Tabela 4). Mota (2003) também diferenciou cultivares de alho dentro do grupo semi-nobre e nobre por meio do número médio de folhas.

Pelo número de flores e a vida de vaso separaram-se as cultivares em dois grupos (Tabela 4). No primeiro, apenas nas cultivares Gold Field, Traderhorn e Peter Pears foi observado um número maior de flores em relação às outras cultivares. As cultivares que tiveram maior vida de vaso foram Priscilla, T-704 e Red Beauty, tempo esse correspondente a cinco dias, em média.

Por meio do comprimento da haste floral não foi possível distinguir as cultivares, não sendo detectada diferença estatística (Tabela 4).

As maiores flores, considerando o maior comprimento e a maior largura da flor, foram das cultivares Priscilla, San Martin, Gold Field e Traderhorn (Tabela 4).

O peso e o perímetro dos cormos avaliados antes do plantio permitiram o agrupamento das cultivares em três grupos (Tabela 4). As cultivares White Goddess e Gold Field apresentaram os maiores pesos e perímetros simultaneamente quando avaliados antes do plantio. Mas na avaliação após a colheita, o peso e o perímetro dos cormos permitiram diferenciar as cultivares apenas em dois grupos (Tabela 4). As cultivares que apresentaram os maiores pesos e perímetros foram a White Goddess e San Martin. Mota (2003), quando trabalhou com o peso médio de cormos de alho, conseguiu distinguir com esse

descriptor as cultivares tanto dentro do grupo de nobre quando dentro do semi-nobre.

É importante mencionar que durante as avaliações foram encontradas contaminações nas parcelas, tanto no primeiro experimento quanto no segundo. Essas contaminações já vieram misturadas no próprio material que foi adquirido. Sendo assim, pode-se concluir que realmente é necessário um programa de certificação de pureza genética dos cormos que são comercializados.

A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que para as características avaliadas, permitiu-se ao menos o agrupamento das cultivares, exceto para o comprimento da haste das flores. É importante ressaltar que, para a diferenciação das cultivares, devem ser realizadas análises de mais de uma característica dos cormos ou das plantas e a comparação dessas deve ocorrer sob o mesmo ambiente para evitar a influência de fatores ambientais.

## 5.2 Certificação da pureza genética em cultivares de gladiolo por meio de marcadores morfológicos

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados médios dos percentuais de acerto e de erro obtidos durante a certificação da pureza genética das cultivares estudadas.

TABELA 5 – Resultados de identificação (% de acerto e % de erro) de cormos e plantas provenientes de diferentes cultivares de gladiolo em várias épocas de avaliação. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Cultivar		Cormos	Épocas De		Avaliação
			30 dias AP	60 dias AP	Florescim.
White	% acerto	48,83± 26,02*	15,28± 21,28	23,61± 15,91	100,0± 0,0
Friendship	% erro	0,18± 0,09	17,68± 10,33	17,47± 8,01	0,0± 0,0
Gold field	% acerto	91,66± 14,43	72,92± 41,61	75,0± 33,07	100,0± 0,0
	% erro	0,02± 0,02	17,63± 21,13	16,93± 22,36	0,0± 0,0
Traderhorn	% acerto	100,0± 0,0	88,89± 12,73	94,45± 4,81	100,0± 0,0
	% erro	0,02± 0,04	8,66± 13,11	5,05± 6,90	0,0± 0,0

\* – Desvio padrão da média

AP – após o plantio

Na avaliação efetuada nos cormos, para a cultivar Traderhorn, houve uma porcentagem de acerto de 100%. A principal característica observada pelos avaliadores foi a cor do cormo, avermelhada, que era bastante diferente do contaminante. A menor porcentagem de acerto ocorreu para a cultivar White Friendship, com apenas 48,83%. Atribui-se a esses resultados o fato de tanto a cultivar White Friendship e seu contaminante possuírem cormos amarelos, variando apenas na intensidade da cor, o que provavelmente tenha dificultado a identificação.

Na avaliação realizada 30 dias após o plantio, a maior porcentagem de acerto, 88,89% e a menor porcentagem de erro, 8,66% foram observadas para a cultivar Traderhorn (Tabela 5). Essa alta porcentagem de acerto foi obtida pela presença acentuada da cor verde arroxeada das folhas, de folhas finas e do porte médio da cultivar Traderhorn o que a diferenciou em relação ao contaminante que possui a cor das folhas na tonalidade de verde, folhas largas e porte baixo. A cultivar Gold Field e seu contaminante apresentam ciclos bem distintos, que torna fácil sua diferenciação. A porcentagem de acerto observada para essa cultivar foi de 72,92%. Na cultivar White Friendship observou-se a menor porcentagem de acerto, 15,28% e a maior porcentagem de erro, 17,68%. A diferenciação entre estas cultivares foi dificultada pelo fato dessas duas cultivares apresentarem descritores bem semelhantes.

Aos 60 dias após o plantio, todos os contaminantes foram diferenciados das outras cultivares com a maior porcentagem de acerto e menor porcentagem de erro que na avaliação anterior (Tabela 5). Nessa fase, a maioria das cultivares encontrava-se entre a fase da emissão da espiga e a de florescimento, facilitando assim a diferenciação em função dos ciclos das cultivares, principalmente considerando-se a cultivar Gold Field e seu contaminante. Outra característica importante na diferenciação entre a cultivar Tradehorn e seu contaminante foi o porte de plantas, o que não ocorreu na diferenciação das outras cultivares. Já para a cultivar White Friendship e seu contaminante, a separação tornou-se difícil, pelo fato de possuírem porte bem semelhante.

No florescimento, a avaliação permitiu a total separação das cultivares e de seus contaminantes, com uma porcentagem de acerto de 100% e uma porcentagem de erro de 0% (Tabela 5). A principal característica que permitiu a diferenciação foi a coloração das flores. A cultivar White Friendship, que possui

flores brancas, foi separada do seu contaminante por meio de pontuações rosas que aparecem nas flores dessa última.

Segundo Salgado *et al.* (2006), a escolha do estágio para análise da pureza genética depende do objetivo da avaliação. Pinho *et al.* (1997) concluíram que é mais interessante a identificação de contaminantes em um programa de controle de qualidade na produção de milho no estágio de plântulas, por permitir a análise da pureza genética após a colheita e antes da comercialização das sementes. No caso da produção de cormos de gladiolo, o interessante é identificar os cormos contaminantes a fim de evitar o plantio de materiais diferentes no campo, pois o desbaste de contaminantes no campo é uma operação bem trabalhosa. Neste estudo a coloração do corno permitiu separar as variedades Priscilla (Rosa goiaba), San Matin (Laranja claro), Traderhorn (Vermelho escuro) e Red Beauty (Laranja).

Com base nos resultados da Tabela 5, pode-se afirmar que a identificação dos contaminantes em estádios mais avançados de desenvolvimento das plantas é mais segura, com exceção da avaliação de caracterização nos cormos, para a diferenciação da cultivar White Friendship e de seu contaminante.

Na Tabela 6, estão apresentados os resultados do teste de qui-quadrado, utilizado para verificar a significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos três avaliadores.

TABELA 6 – Resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), aplicados aos dados de identificação de cormos e plantas provenientes de cultivares de gladiolo diferentes em várias épocas de avaliação, obtidos por três avaliadores. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Cultivar	Avaliador	Cormos	Épocas de		Florescimento
			30 dias AP	60 dias AP	
White	1	0,17	0,63	1,23	0
	2	1,50	2,03	0,90	0
	3	1,04	2,50	2,03	0
	$\chi^2$	2,71 NS	5,15 NS	4,15 NS	0 NS
Gold Field	1	0,0	0,04	1,29	0
	2	0,03	1,75	0,14	0
	3	0,0	0	0	0 NS
	$\chi^2$	0,03 NS	1,79 NS	1,43 NS	0
Traderhorn	1	0,0	0,32	0,0	0
	2	0,0	0,0	0,04	0
	3	0	0,04	0,04	0
	$\chi^2$	0 NS	0,36 NS	0,08 NS	0 NS

\* NS – Não significativo.

Pode-se observar que não houve significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos três avaliadores (Tabela 6). É importante esclarecer que, quando ocorreu a não significância dos desvios na avaliação, os erros foram devido ao acaso (erro amostral). Assim, aceitaram-se as variações que ocorreram entre os resultados obtidos pelos três avaliadores.

As avaliações realizadas nas cultivares Traderhorn e na Gold Field, independentemente da época, apresentaram baixos valores de qui-quadrado juntamente com as altas taxas de acerto e as baixas porcentagens de erro, indicando ser possível a separação dessas cultivares de seus respectivos contaminantes por meio de marcadores morfológicos.

## 6 CONCLUSÕES

Por meio de características do corno de gladiolo é possível diferenciar quatro cultivares das onze avaliadas.

A característica cor das flores é o descritor morfológico mais seguro para a diferenciação das cultivares de gladiolo.

Dependendo das características das cultivares contaminantes e das em análises é possível utilizar descritores morfológicos para a certificação de pureza genética em cultivares de gladiolo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONOW, S.; PINHO, E. V. de R. von; SOARES, A. A.; SOARES JÚNIOR, S. Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando a certificação da pureza varietal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 619-627, maio/jun. 2007.

COOKE, R. J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 5, p. 59-72, 1984.

DITMER, W. P. Varital determination made in the seed laboratory. **Journal of Seed Technology**, Zurich, v. 3, n. 2, p. 42-47, 1979.

FERREIRA, D. F. **Sisvar – Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados**. Versão 4.0. Lavras: DEX/UFLA, 1999. Software estatístico.

GUIMARÃES, W. N. R.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F. da; FERRAZ, G. de M. G.; OLIVEIRA, F. J. de. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

MOTA, J. H. **Diversidade genética e características morfológicas, físico-químicas e produtivas de cultivares de *Allium sativum* L.** 2003. 66 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Disponível em: <[http://www.ceud.ufms.br/~jmota/curiculo\\_arquivos/TeseDr%20Mota.pdf](http://www.ceud.ufms.br/~jmota/curiculo_arquivos/TeseDr%20Mota.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2007.

PAYNE, R. C. Cultivar testing by official AOSA seed laboratories. **Journal of Seed Thecnology**, Lansing, v. 10, n. 1, p. 24-36, 1986.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. Piracicaba: ESALQ/USP; Nobel, 1987. 466 p.

PINHO, E. V. R. von; PINHO, R. Z. von; CICERO, S. M. Utilização de características morfológicas para avaliação da pureza genética em sementes híbridas de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 9, p. 941-949, 1997.



RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3. ed. São Paulo: UFLA, 2004. 472 p.

RAMOS, N. P. **Determinação da pureza varietal em lotes de sementes de milho através de marcadores morfológicos e microssatélites**. 2004. 104 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

REES, A. P. **Ornamental corms, corms and tubers**. Wallingford: CAB International, 1992. 220 p.

SALGADO, K. C. P. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, C. T.; PINHO, R. G. von; SOUZA, L. V. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 169-175, 2006.

SCHMIDT, J. W. A plant breeder looks at the problem of distinguishing cultivars. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v. 3, n. 2, p. 57-60, 1979.

SMITH, J. S. C.; REGISTER III, J. C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 285-293, June 1998.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

### **CAPÍTULO 3**

#### **IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE *Gladiolus* sp. POR MEIO DE MARCADORES DE ENZIMAS E DE DNA**

## 1 RESUMO

FERREIRA, Clarissa Alves. Identificação de cultivares de *Gladiolus* sp. por meio de isoenzimas. In: \_\_\_\_\_. **Identificação de cultivares de gladiolo por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2008. p. 16-52. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>5</sup>

A certificação da pureza genética é fundamental na produção de flores para que as características de uma cultivar se mantenham até a comercialização. Para isso há a necessidade de identificação de cultivares por meio de marcadores mais estáveis. Nesse trabalho foram avaliados marcadores moleculares de proteínas e de DNA, visando à caracterização de onze cultivares de *Gladiolus* sp. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Para a extração de enzimas e de DNA foi coletada a terceira folha definitiva, de dezesseis plantas escolhidas ao acaso e de cinco cormos de cada cultivar. A avaliação das enzimas foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos  $\alpha$ -amilase, álcool desidrogenase, esterase, peroxidase, malato desidrogenase e catalase. A avaliação do DNA foi realizada por meio da técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Dentre os sistemas enzimáticos testados, foi detectada baixa atividade para a enzima peroxidase, nos cormos, sem ocorrência de polimorfismo entre as cultivares testadas. Em folhas, para a peroxidase, seis padrões eletroforéticos diferentes foram gerados. Quanto ao sistema enzimático malato desidrogenase nos tecidos dos cormos e nas folhas, foram obtidos cinco padrões eletroforéticos diferentes. Para a álcool desidrogenase, nos tecidos dos cormos, todos os padrões obtidos foram monomórficos, exceto para uma cultivar. Para a análise catalase, em folhas, não foi observado polimorfismo nos padrões das cultivares analisadas. Por meio da enzima  $\alpha$ -amilase, nos cormos e da esterase, em folhas, foi possível diferenciar todas as cultivares de *Gladiolus* sp. Com relação ao uso de RAPD para a caracterização das cultivares de gladiolo foi observado polimorfismo em nove primers testados. Por meio da técnica de RADP é possível diferenciar oito cultivares das onze avaliadas nesse estudo. A similaridade das cultivares avaliadas por meio dos marcadores de

---

<sup>5</sup> Comitê Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Orientador), Prof<sup>a</sup> Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-orientadora), Dra. Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado (Co-orientadora).

enzima variou de 0,32 a 0,69 e a observada por meio dos marcadores de RAPD de 0,38 a 0,64.

## 2 ABSTRACT

FERREIRA, Clarissa Alves. Identification of cultivars of *Gladiolus* sp. by isozymes. In: \_\_\_\_\_. **Identification of cultivars in gladioli through morphologic and molecular markers**. 2008. p. 16-52. Dissertation (Master in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>6</sup>

The certification of genetic purity is fundamental in flower production for the characteristics of one cultivar to be kept up to its commercialization. For such, there is the need of the identification of cultivars by means of more stable markers. In this work, molecular markers of both protein and DNA were evaluated aiming at the characterization of eleven cultivars of *Gladiolus* sp. The research was developed at the Seed Center Laboratory of Agriculture Department at the Federal University of Lavras. For enzyme and DNA extraction, the third definitive leaf was collected from sixteen chosen plants randomly and from five corms of each cultivar. The evaluation of the enzymes was made through gel electrophoresis technique. The gels were revealed to the enzymatic systems  $\alpha$ -amylase, alcohol dehydrogenase, esterase, peroxidase, maltase dehydrogenate and catalase. The DNA evaluation was made through RAPD technique (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and the products were separated by electrophoresis in 0.8 agarose gel. Out of the tested enzyme systems, low activity for the peroxidase enzyme was detected in the corms, without any occurrence of polymorphism among the tested cultivars. In leaves, for peroxidase enzyme, six different electrophoresis standards were generated. Concerning the enzyme system maltase dehydrogenate in the corm and leaf tissues, five different electrophoresis standards were obtained. For alcohol dehydrogenase, in the corm tissues, all obtained standards were monomorphic, except for one cultivar. For catalase analysis, in leaves, no polymorphism in the standards of the analyzed cultivars was found. By means of  $\alpha$ -amilase enzyme, in the corms and of esterase, in leaves, it was possible to distinguish all the cultivars of *Gladiolus* sp. with relation to the use of RAPD for the characterization of gladiolus cultivars, polymorphism in nine tested primers was found. Through RADP technique, it is possible to distinguish eight cultivars out of the eleven evaluated in this study. The similarity of the cultivars evaluated by the enzyme markers ranged from 0.32 to 0.69 and that observed by means of by RAPD markers did from 0.38 to 0.64.

---

<sup>6</sup> Guidance Committee: Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser), Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

A demanda por cormos de gladiolo (*Gladiolus* sp.), no mercado externo, vem contribuindo para o investimento de empresas nacionais no cultivo dessa espécie. Há uma grande exigência, contudo, dos países importadores quanto à pureza genética dos cormos das cultivares comercializadas dessa espécie, principalmente, em relação à coloração da flor. Observa-se que o uso de marcadores morfológicos para a caracterização de cultivares pode demandar grande tempo e espaço, além de muitos deles serem influenciados pelo ambiente de produção.

Os marcadores moleculares de proteínas, produtos de expressão gênica podem ser utilizados como descritores para a caracterização de cultivares (Vieira, 2004). Esses marcadores apresentam, na maioria dos casos, polimorfismo que permite distinguir, em várias espécies, um grande número de cultivares, sendo rápido e de fácil execução. Esses marcadores, porém, podem variar em função da parte e do estágio de desenvolvimento da planta analisada, condições ambientais distintas, alteração na temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral e injúrias (Bonow, 2004), mas quando comparados com os marcadores morfológicos apresentam elevada precisão.

Os sistemas enzimáticos utilizados por Gaia et al. (2007), em sua totalidade, apresentaram polimorfismo capazes de caracterizar e identificar acessos ou grupos de acessos de pimenta-do-reino. Malone et al. (2007) utilizaram marcadores isoenzimáticos os quais foram eficientes para estimar a variabilidade genética entre acessos de arroz vermelho.

As variações isoenzimáticas são detectadas por eletroforese, a qual é uma técnica relativamente de baixo custo e acessível. Os marcadores isoenzimáticos são de caráter co-dominante, possibilitando a separação de genótipos homozigotos e heterozigotos, que é de grande utilidade nos testes de certificação da pureza genética (Borém & Caixeta, 2006).

As informações sobre a certificação da pureza genética, obtidas a partir desses marcadores, para a utilização em programas de qualidade, têm sido consideradas insuficientes, devido ao pequeno número de marcadores disponíveis e a pequena porção genômica acessada, respectivamente. Por outro lado, por meio de marcadores genéticos, baseados na análise direta da molécula de DNA, tem-se observado alto nível de polimorfismo e com acesso a uma ampla região do genoma. Com o desenvolvimento da técnica de PCR, foram desenvolvidos métodos que são fundamentados na amplificação do DNA genômico a partir de iniciadores que detectam polimorfismo específico de fragmentos de DNA. Dentre esses, destacam-se os marcadores de RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Borém & Caixeta, 2006).

Marcadores RAPD têm sido utilizados no melhoramento de plantas para identificar ao acaso regiões genômicas. Por meio desses marcadores, de natureza dominante, pode-se detectar rapidamente grande número de polimorfismo genético. Essa técnica, também, tem a vantagem de, mesmo sem o conhecimento prévio do genoma, requerer pequena quantidade de DNA por análise (Borém & Caixeta, 2006).

O número de trabalhos visando à certificação da pureza genética em flores por meio de marcadores moleculares de proteínas e de DNA é bastante reduzido. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho avaliar marcadores moleculares de proteína e de DNA visando à identificação de cultivares de

gladiolo, assim como a similaridade genética entre as cultivares a partir desses marcadores.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida na área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, Minas Gerais.

Para a identificação das cultivares de gladiolo foram usadas onze cultivares (1 – Withe Friendship, 2 – White Goddess, 3 -Priscilla, 4 – Rose Friendship, 5 – San Martin, 6 – Gold Field, 7 – Yester, 8 – T-704, 9 – Traderhorn, 10 – Red Beauty, 11 – Peter Pears) provenientes da Empresa Terra Viva, localizada na cidade de Holambra, SP.

### 4.1 Avaliações da pureza genética por meio de marcadores moleculares de enzimas

Para a extração de enzimas, foram coletadas, para cada cultivar, ao estarem com três folhas definitivas, a terceira folha definitiva, iniciando a contagem de baixo para cima, de dezesseis plantas, escolhidas ao acaso e também cinco cormos de cada cultivar. Foram utilizadas duas repetições por tratamento. As folhas e os cormos foram macerados em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, foram adicionados a 100 mg do tecido, 250µL do tampão de extração, o qual se constituiu de Tris HCl 0,2M pH 8 e 0,1% de β-mercaptoetanol. As amostras foram deixadas a 4°C por 12 horas e centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. Foram aplicados 60µL do sobrenadante da cada amostra em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). No tampão de corrida foram utilizados Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética a 4°C, por duas horas e realizada a uma voltagem constante de 150V. Após, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos

$\alpha$ -amilase, álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO), malato desidrogenase (MDH), catalase (CAT) (Alfenas, 1998).

#### 4.1.1 Obtenção das similaridades genéticas

A avaliação dos géis constou da observação da ausência e presença de bandas em cada genótipo, designadas por 0 e 1, respectivamente. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa da similaridade genética ( $S_{gij}$ ) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de Jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}, \text{ sendo:}$$

a = presença de banda em ambos os genótipos i e j;

b = presença de banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j;

c = ausência de banda no indivíduo i e presença no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method), aproveitando-se o programa NTSYS versão 2.11 (Rohlf, 1992).

#### 4.2 Avaliações da pureza genética por meio de marcadores moleculares de DNA

Para a avaliação de polimorfismo entre as cultivares de gladiolo foram utilizadas cinco plantas de cada uma das cultivares e os nove primers aleatórios da OPERON para RAPD selecionados, segundo Takatsu et al. (2001) (Tabela 1).

TABELA 7 – Relação dos *primers* utilizados na caracterização das cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

<b><i>Primers</i></b>	<b>Seqüência de bases</b>
OPD 11	AGCGCCATTG
OPD13	GGGGTGACGA
OPD 16	AGGGCGTAAG
OPD 19	CTGGGGACTT
OPD 20	ACCCGGTCAC
OPN 18	GGTGAGGTCA
OPO 10	TCAGAGCGCC
OPP 03	CTGATACGCC
OPQ 15	GGGTAACGTG

#### 4.2.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA de folhas e de cormos, foram amostradas, para cada cultivar, no estádio de três folhas definitivas, a terceira folha superior definitiva, de dezesseis plantas, escolhidas ao acaso e cinco cormos de cada cultivar.

A extração foi realizada segundo Salgado (2005). As folhas e cormos foram macerados em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó bem fino. Após, foram adicionados a 100mg desse pó, 800 µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5mM de EDTA pH 8,0; 5M NaCl) com adição de 2% de β mercaptoetanol seguida de incubação a 65°C por 90 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 800 µL da mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram invertidos gentilmente por 5 minutos para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada a 14000 rpm. O

sobrenadante foi retirado e, novamente, foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo as mesmas condições até a centrifugação a 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionado isopropanol a 4°C, na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram incubadas a 4 °C durante 2 horas e, posteriormente, foram centrifugadas a 14000 rpm. O pellet foi secado por 30 minutos e então foram adicionados 50 µL de TE (Tris-HCl 0,1mM, EDTA 0,1mM) + 2 µL de RNase (10 mg/mL), mantendo-se à temperatura de 37 °C por 1 hora. Após esse período, o DNA foi precipitado com 100 µL de álcool etílico 95%, lavado com 100 µL de etanol 70%. Após a eliminação do álcool etílico 70%, os ácidos nucleicos foram secados por 40 minutos e, posteriormente, diluídos com 50 µL de TE. O DNA foi quantificado em fluorímetro Hoeffer Scientific TKO100.

#### 4.2.2 Reações de PCR

As reações de RAPD constaram de um volume final de 13µl, sendo seus componentes: 40,70% de água ultra pura; 9,23% de tampão de reação (1M de Tris-HCl pH 8; 1M de MgCl<sub>2</sub>; 125mg.ml<sup>-1</sup> de soro albumina bovina; 1M de KCl); 7,38% de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 18,46% de *primer*; 1,15% da enzima taq DNA polimerase (Pharmacia) e 23,08% de DNA na concentração de 10ng/µl. Foram utilizados 9 primers com bases de seqüência arbitrária, obtidos da "Operon Technologies" (Califórnia – EUA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600, programado para 40 ciclos nas seguintes condições: uma primeira etapa a 94°C por um minuto, 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento de 36°C por 30 segundos e temperatura de alongação de 72°C por 30 segundos, e uma última etapa de manutenção a 72°C por sete minutos. Após a amplificação, aos produtos de cada reação foram acrescidos 3µl de tampão de

corrida, contendo azul de bromofenol e, em seguida, aplicados em gel de agarose 0,8%. O tampão do tanque utilizado foi TBE 1x (0,045M de Tris-borato; 0,001μl de EDTA pH 8). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 150 v por 2h.

#### 4.2.3 Revelação dos géis

Para a revelação, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,04μl/ml), visualizados em transluminador de luz ultra-violeta e as imagens foram captadas por um sistema de foto-documentação.

#### 4.2.4 Obtenção das similaridades genéticas

A obtenção das similaridades genéticas foi realizada conforme descrita no item 4.1.1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Marcadores moleculares de enzimas

Foram verificadas variações nos padrões eletroforéticos dos sistemas enzimáticos peroxidase nos tecidos extraídos das folhas, na malato desidrogenase, álcool desidrogenase,  $\alpha$ -amilase, catalase e esterase nos tecidos extraídos dos cormos e folhas.

Dentre os sistemas enzimáticos que foram testados, foi detectada baixa atividade para a enzima peroxidase (PO) nos tecidos dos cormos e, onde houve atividade, ocorreu ausência de polimorfismo nos padrões para as cultivares testadas. Já nos tecidos das folhas, seis padrões eletroforéticos diferentes foram observados, o que possibilitou distinguir as cultivares Priscilla (3), Gold Field (6), Traderhorn (9), Red Beauty (10) nas quais foram observados padrões específicos (Figura 9). Para as cultivares San Martin (5) e Yester (7) não foi detectada atividade para essa enzima (Figura 9).

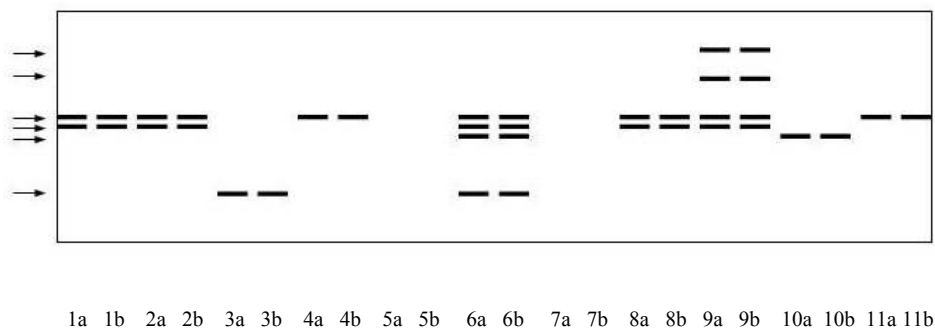


FIGURA 6 – Padrões eletroforéticos da isoenzima peroxidase observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Peroxidases são proteínas de oxidorreductase, específicas para acceptor de hidrogênio (Alfenas, 1998) e estão presentes em certas células animais, em microrganismos e em tecidos vegetais. Ocorrem em diversos componentes celulares, com núcleo, mitocôndrias, ribossomos, paredes celulares e membranas celulares (Hoagland, 1990). Dessa forma, a atividade da peroxidase pode estar relacionada com a atividade celular para a eliminação dos peróxidos formados nas folhas. A baixa atividade da peroxidase pode estar relacionada à forma de cultivo das plantas do experimento. Essas foram cultivadas em estufas, sem exposição das plantas às condições de estresse.

Quanto ao sistema enzimático malato desidrogenase (MDH) nos tecidos dos cormos (Figura 10), foram obtidos cinco padrões eletroforéticos diferentes, sendo as cultivares separadas em cinco grupos: A) White Friendship (1), White Goddess (2), Priscilla (3), Rose Friendship (4), Gold Field (6) e T 704 (8); B) San Martin (5); C) Yester (7) e Traderhorn (9); D) Red Beauty (10) e E) Peter Pears (11).

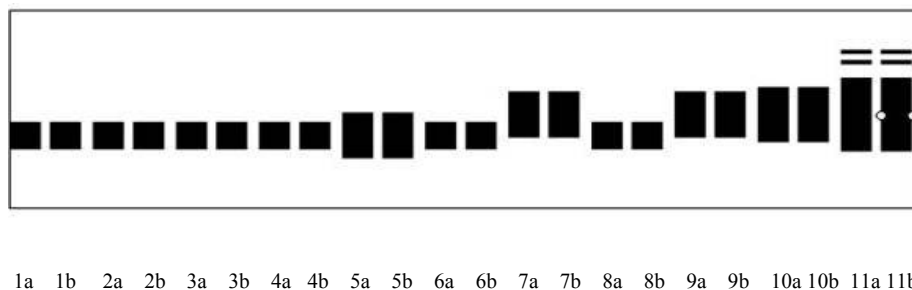


FIGURA 7 – Padrões eletroforéticos da isoenzima malato desidrogenase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Nos tecidos das folhas também foram obtidos cinco padrões (Figura 3), mas o agrupamento dos padrões das cultivares foi diferente em relação aos cormos, sendo separadas nos seguintes grupos: A) White Friendship (1); B)

White Goddess; C) Priscilla (3), Gold Field (6); D) Rose Friendship (4), San Martin (5) e Yester (7), T 704 (8), Traderhorn (9), Red Beauty (10) e E) Peter Pears (11). Essa diferença pode ser devido ao gene ser expresso ou não em cada órgão ou tecido da planta.

A enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxalacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO<sub>2</sub> nas plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

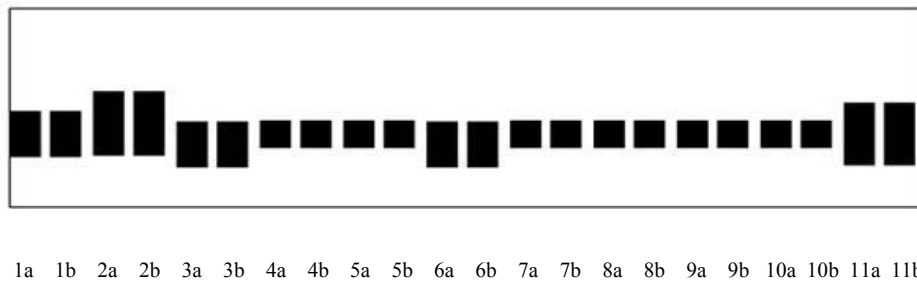


FIGURA 8 – Padrões eletroforéticos da izoenzima malato desidrogenase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.



Quanto ao sistema enzimático da álcool desidrogenase (ADH) (Figura 6), nos tecidos dos cormos, todos os padrões obtidos foram monomórficos, exceto para a cultivar Traderhorn (9), sendo observado por duas bandas. Nos tecidos das folhas (Figura 7), foram obtidos três padrões eletroforéticos diferentes, um para as cultivares San Martin (5) e Traderhorn (9), outro para a cultivar Red Beauty (10) e um terceiro para as demais cultivares. Tais resultados divergem dos encontrados por Siqueira *et al.* (1985), que não detectaram atividade nos tecidos de folhas de alho para as isoenzimas álcool desidrogenase, esterase e peroxidase. Esses mesmo autores, contudo, conseguiram obter resultados satisfatórios para essas enzimas ao utilizarem tecidos da raiz e tecidos da base dos cormilhos.

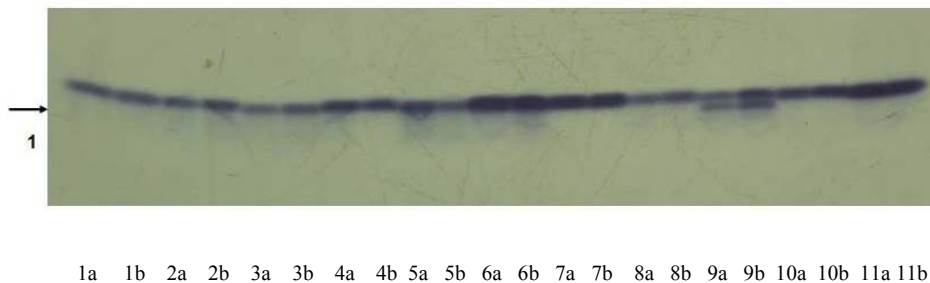


FIGURA 9 – Padrões eletroforéticos da isoenzima álcool desidrogenase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

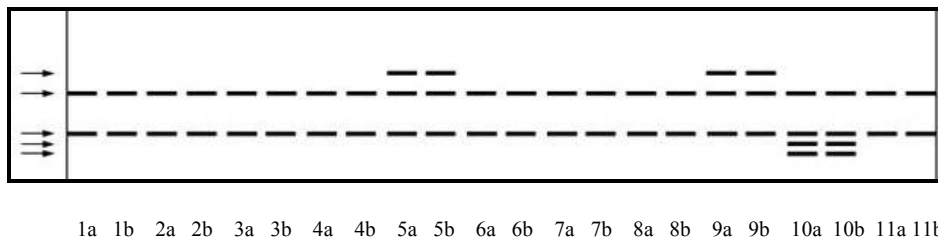
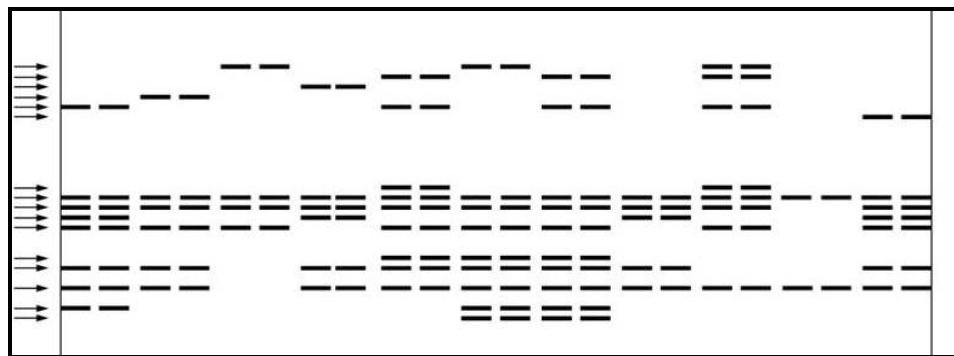


FIGURA 10 – Padrões eletroforéticos da isoenzima álcool desidrogenase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quando a via aeróbica é comprometida, a via anaeróbica da respiração é ativada e produtos tóxicos às células, como acetaldeído e etanol, são acumulados. No metabolismo anaeróbico, o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido para acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído é, então, reduzido para etanol pela álcool desidrogenase (ADH) (Taiz & Zeiger, 2004).

Tanto nos tecidos de cormos quanto nos tecidos de folhas houve atividade da  $\alpha$ -amilase (Figura 14). No perfil eletroforético do sistema enzimático  $\alpha$ -amilase, nos tecidos dos cormos, foi visualizado polimorfismo para todas as cultivares, ou seja, foi possível distinguir todas as cultivares por meio desse sistema. O padrão 1 foi observado nas variedades Priscilla (3), Gold Field (6) e Traderhorn (9). Os padrões 3, 4 e 11 foram verificados somente para as variedades Rose Friendship (4), White Goddness (2) e Peter Pears (11), respectivamente. E o último padrão foi observado somente para as variedades Goddess (6) e Yester (7). Já para os tecidos das folhas (Figura 15), foram observados somente dois padrões eletroforéticos, distinguindo apenas a variedade T 704 (8).



1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b 9a 9b 10a 10b 11a 11b  
 FIGURA 11 – Padrões eletroforéticos da izoenzima  $\alpha$ -amilase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.



1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b 9a 9b 10a 10b 11a 11b

FIGURA 12 – Padrões eletroforéticos da izoenzima  $\alpha$ -amilase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No início da hidratação, enzimas hidrolíticas, tais como amilases, proteinases e  $\beta$ -glucanases, tornam-se ativadas no embrião (Ganguli & Sem-Mandi, 1993). No caso da enzima  $\alpha$ -amilase, essa é sintetizada pela ação das giberelinas (Marcos Filho, 2005). A atividade da amilase, em cereais, é a principal forma para o fornecimento de energia e esqueleto carbônico para o embrião se desenvolver, por meio da quebra respiratória de substratos utilizáveis. As enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases estão envolvidas no principal sistema de degradação de amido das sementes (Ferreira, 2006). Quando se fez a amostragem dos cormos para essa análise, esses se encontravam em processo de brotação, ou seja, em processo de degradação do amido. Devido a essas razões pode-se justificar a alta taxa de polimorfismo encontrada nos cormos, pois a maioria do seu tecido é material de reserva. Provavelmente exista uma quantidade substancial de amido nesses cormos, embora não tenha sido encontrado na literatura dados da composição química de cormos de gladiolo.

Para catalase (Figura 16), foram visualizados nos tecidos dos cormos, quatro padrões diferentes. As cultivares foram agrupadas da seguinte forma: A) White Friendship (1), White Goddess (2), Rose Friendship (4), Goddess (6), Yester (7), e T 704 (8), B) Priscilla (3) C) San Martin (5) e D) Traderhorn (9), Red Beauty (10) e Peter Pears (11) nos padrões dessa enzima. Já nos tecidos das folhas não houve polimorfismo entre as cultivares analisadas.

As catalases são enzimas de oxidorreductase, que estão presentes em todas as células de plantas, animais e microrganismos aeróbicos (Scandalios, 1990). Podem ser encontradas no citoplasma, mitocôndrios, peroxissomos de folhas, glioxissomos de tecidos (Frugoli *et al.*, 1996). São importantes catalisadores que atuam como reguladoras dos níveis de  $H_2O_2$  e sua atividade consiste na conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ .

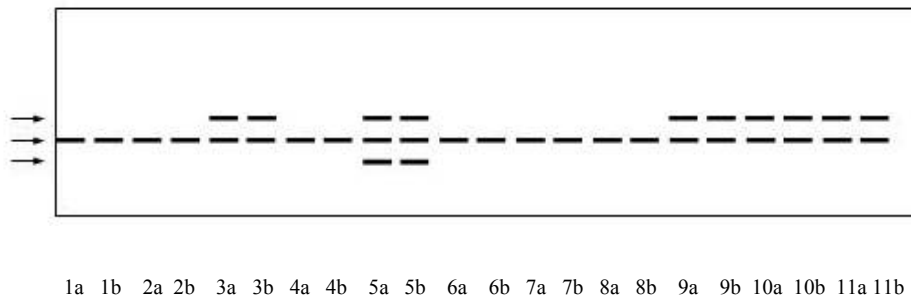


FIGURA 13 – Padrões eletroforéticos da isoenzima catalase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Foram verificados padrões polimórficos para a isoenzima esterase (Figura 17), no tecido das folhas, o que permitiu a separação de todas as cultivares, ou seja, cada variedade apresentou um padrão diferente. O padrão 2 foi verificado somente para a variedade Red Beauty (10), os padrões 3 e 5 foram verificados apenas para a variedade White Goddess (2) e o padrão 9, apenas para a variedade Peter Pears (10). Para os padrões observados dessa enzima nos tecidos dos cormos foram visualizados nove padrões diferentes (Figura 19), o que permitiu o agrupamento das cultivares da seguinte forma: A) White Friendship (1); B) White Goddess (2), Priscilla (3) e Rose Friendship (4); C) San Martin (5); D) Gold Field (6); E) Yester (7); F) T-704 (8); G) Traderhorn (9); H) Red Beauty (10); e I) Peter Pears (11). A esterase é uma enzima que participa da hidrólise de ésteres de membrana.

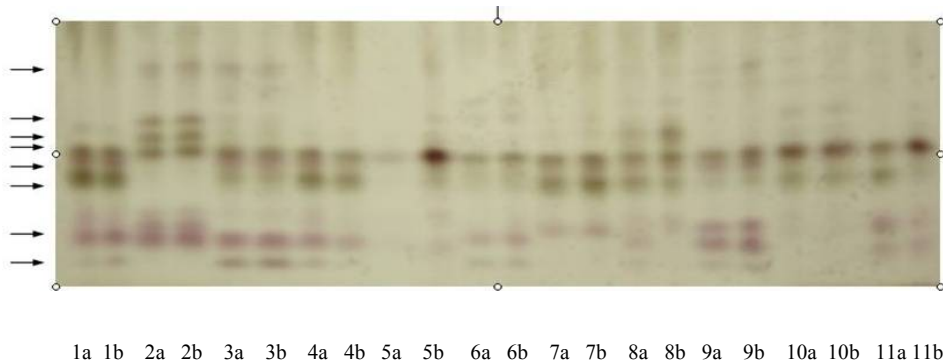
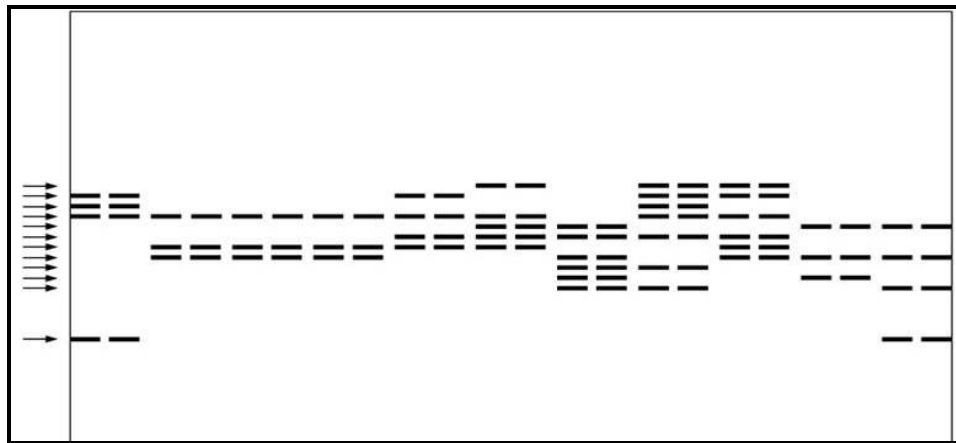


FIGURA 14 – Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, observados em tecidos de folhas de gladiólo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.



1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b 9a 9b 10a 10b 11a 11b

FIGURA 15 – Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, observados em tecidos cormos de gladiólo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Polimorfismo nos padrões dessa enzima tem sido verificado em várias espécies como feijão (Vieira, 2000), arroz (Bonow, 2004) e trigo (Cardoso & Nedel, 2002). Esses autores relataram a importância desse sistema enzimático para a distinção de cultivares.

Precisa-se ter cuidado ao interpretar o polimorfismo do sistema enzimático da esterase, pois, apesar de serem muito utilizadas como marcadores essas enzimas, outras enzimas têm afinidade pelo mesmo substrato dessa enzima, podendo dessa forma também serem reveladas no mesmo gel. Na revelação da esterase, enzimas capazes de quebrar a ligação nafil-acetato resultam em reações positivas, que produzem um grande número de bandas. É importante que a atividade da esterase varie quanto ao estágio de desenvolvimento da planta, quanto às condições fisiológicas e quanto ao tecido utilizado (Alfenas, 1998).

Pode-se, logo, ter o polimorfismo superestimado devido a interpretações errôneas dos zimogramas obtidos para essa enzima.

As enzimas podem ser controladas por diferentes locos nos diferentes estádios de desenvolvimento e tecidos (Alfenas, 1998), o que justifica os padrões distintos verificados nos tecidos avaliados nessa pesquisa. Os marcadores moleculares enzimáticos podem ser considerados úteis para distinção de cultivares desde que os padrões observados nos mesmos sejam estáveis.

Segundo Bonow (2004), existe a necessidade de estudos para garantir a precisão e confiabilidade ao uso de marcadores isoenzimáticos como descritores, pois esses sistemas podem ser influenciados pela qualidade fisiológica e sanitária do material. Esse fato deve ser levado em consideração quando marcadores isoenzimáticos são utilizados na caracterização de cultivares avaliando-se os padrões estáveis mesmo em condições que propiciam as variações nesses.

No agrupamento das cultivares (Figura 19) visualizam-se dois grupos, sendo um deles constituído pela cultivar Red Beauty e o outro, pelas outras cultivares com similaridade 0,32. Dentro desse último foram observados outros três subgrupos, compostos pelas seguintes cultivares: I – Yester; II – Gold Field, Traderhorn e San Martin; III – Peter Pears, Rose Friendship, Priscilla, White Goddess, T 704 e White Friendship, com níveis de similaridade de 0,38; 0,45; 0,46, respectivamente.

Por meio desse agrupamento nota-se que as cultivares com maior similaridade, 0,69, foram as White Friendship e T 704. Não foi possível obter dados relacionados às populações base utilizadas para o desenvolvimento dessas cultivares. Provavelmente as cultivares White Friendship e T 704 sejam provenientes de genótipos mais próximos.

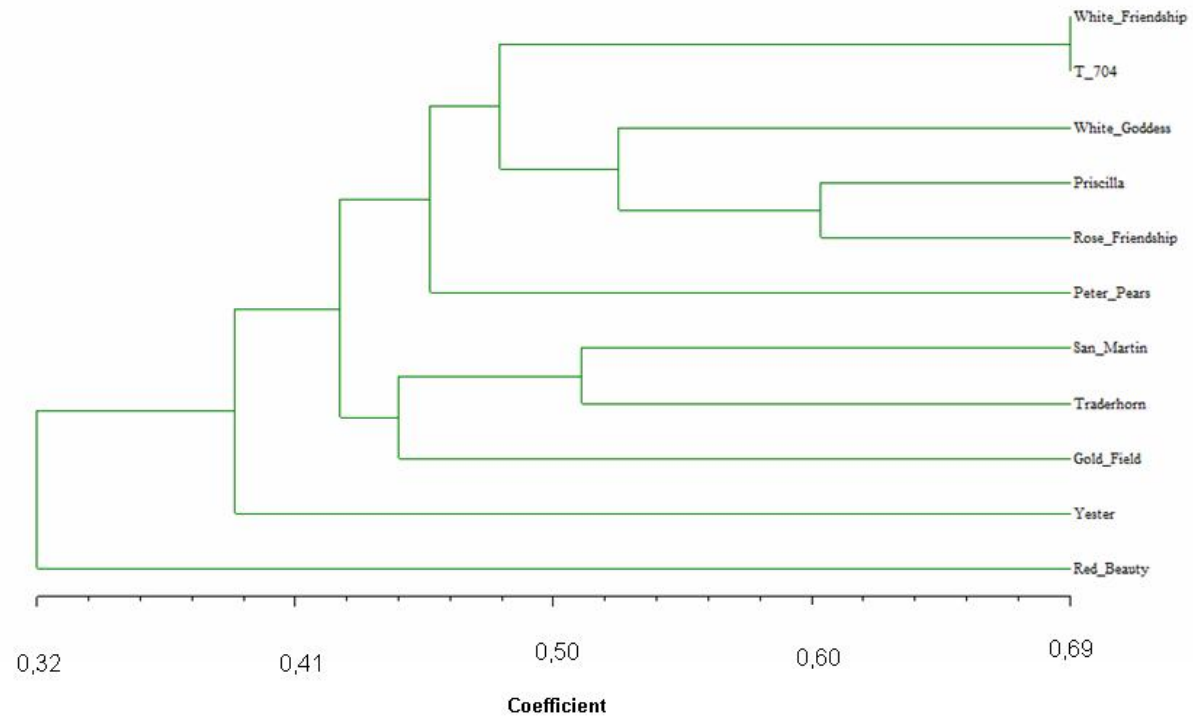


FIGURA 16 – Dendrograma das onze cultivares de gladiolo estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores isoenzimáticos. UFLA, Lavras, MG, 2008.



## 5.2 Marcadores moleculares de DNA

Dos nove *primers* testados, observou-se amplificação e polimorfismo nos padrões entre as cultivares avaliadas. Foram observadas variações nos padrões de marcadores de RAPD nos tecidos extraídos dos cormos e folhas.

Na Figura 19 está apresentado o padrão de bandas obtido pelos iniciadores OPD11 em tecidos de cormos. Não foi possível distinguir todas as cultivares com os primers testados. Com a utilização do primer OPD11 em tecidos de cormos, observaram-se sete padrões diferentes e as cultivares White Friendship (1), White Goddess (2), Sant Martin (5), Gold Field (6) apresentaram padrões de bandas semelhantes. As cultivares T 704 (8) e Red Beauty (10) apresentaram padrão semelhante.

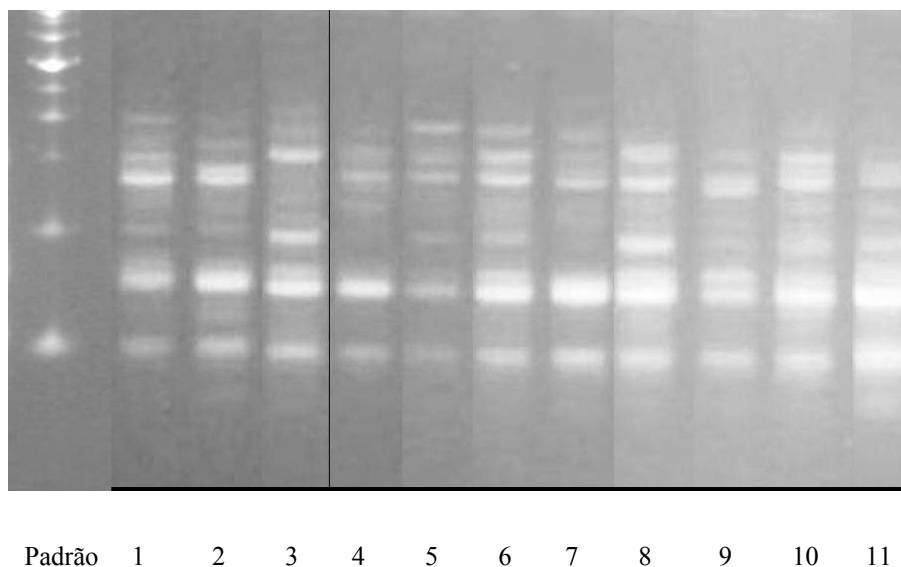
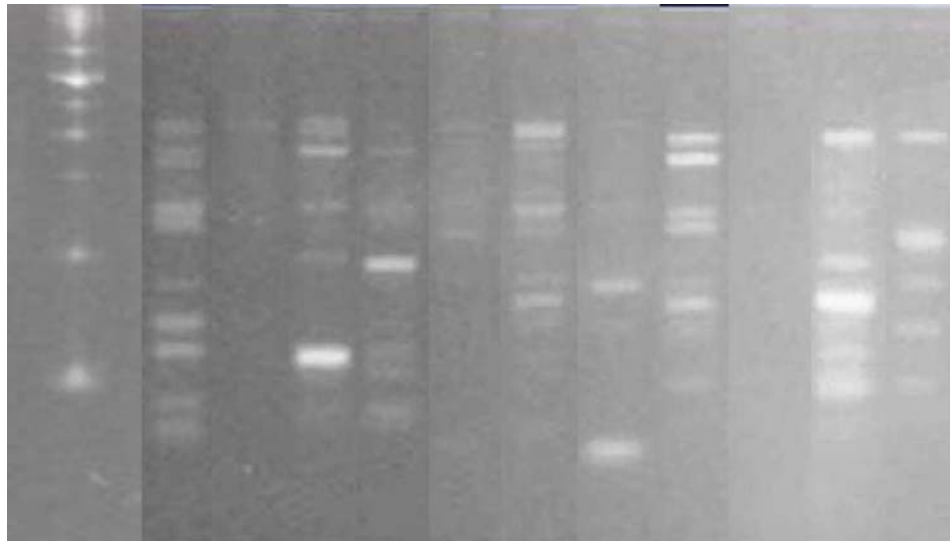


FIGURA 17 – Padrões de marcadores de RAPD das onze variedades de gladiolo, extraídos do tecido dos cormos, utilizando o *primer* OPD 11. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Em relação ao *primer* OPD15, também nos tecidos de cormos, apenas três cultivares não puderam ser distinguidas, pois não houve amplificação, porém, as demais cultivares foram passíveis de serem diferenciadas por esse *primer*.



Padrão    1    2    3    4    5    6    7    8    9    10    11

FIGURA 18 – Padrões de marcadores de RAPD das onze variedades de gladiolo, extraídos do tecido dos cormos, utilizando o *primer* OPQ 15. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Takatsu *et al.* (2001) consideraram que os marcadores RAPD são úteis para obter informação sobre as relações genéticas em gladiolo.

Foram verificadas 99 bandas, as quais foram utilizadas na geração do dendrograma (Figura 20). No agrupamento das cultivares, foi verificada uma similaridade (0,38) entre os grupos constituídos pelas cultivares White Friendship e San Martin e o constituído pelas cultivares: White Goddness, Princilla, Red Beauty, Peter Pears, Rose Friendship e Traderhorn; Gold Field, e

Yester; T 704. A maior similaridade (0,64) foi observada entre as cultivares Red Beauty e Peter Pears.

Vieira & Nodari (2007) demonstraram uma boa capacidade informativa dos marcadores RAPD para estimativa da diversidade genética em populações de alho.

Apesar de, neste estudo, a diferenciação das onze cultivares não ter sido possível pelo uso da técnica RAPD, essa possibilitou a separação das cultivares em grandes grupos, o que coloca a técnica RAPD como uma ferramenta útil no estudo da similaridade genética entre indivíduos de uma mesma espécie.

O agrupamento observado para os padrões enzimáticos foi distinto do observado nos padrões de DNA. Isso se justifica pelo fato de que os locos amostrados, no genoma, provavelmente, tenham sido distintos para esses marcadores.

Sugere-se, dessa forma, trabalhar com um número maior de *primers* RAPD em pesquisas dessa natureza, que permitam cobertura maior do genoma e, conseqüentemente, dados mais seguros de similaridade.

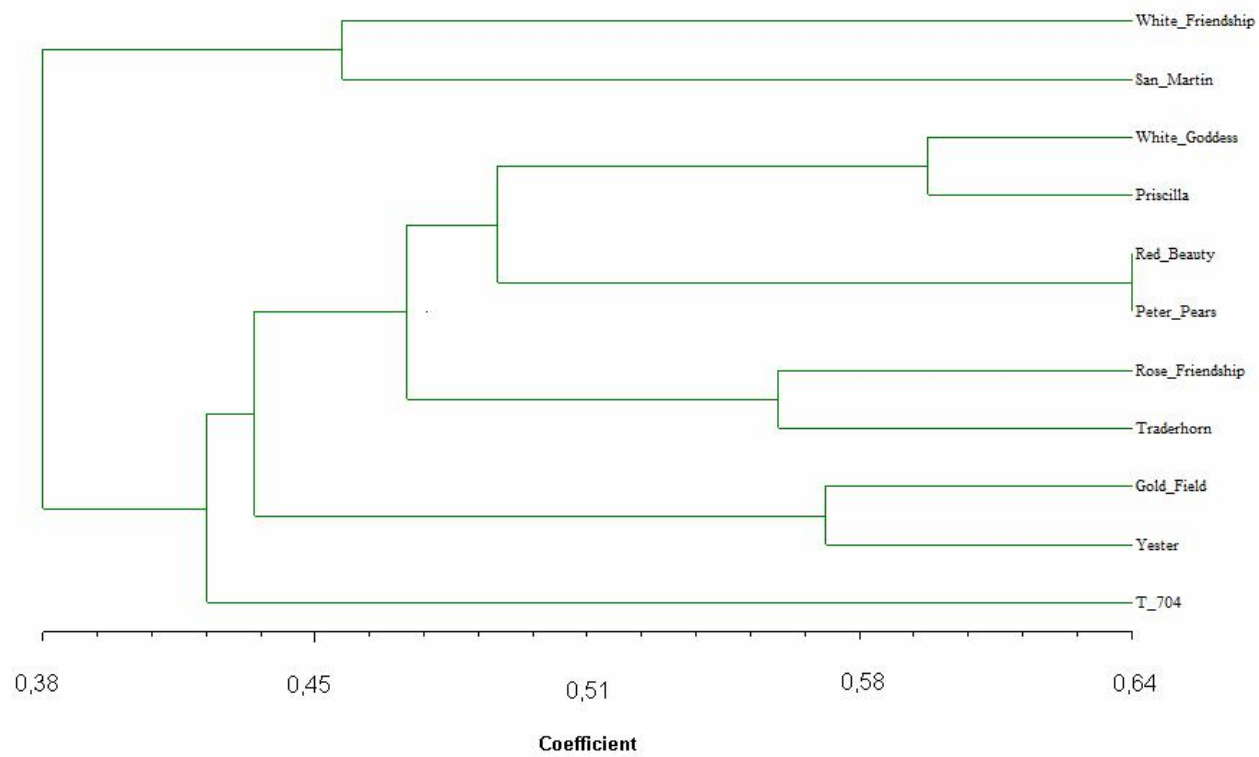


FIGURA 19 – Dendrograma de onze cultivares de gladiolo estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores RAPD. UFLA, Lavras, MG, 2008.

## 6 CONCLUSÕES

Por meio dos sistemas enzimáticos da  $\alpha$ -amilase, nos tecidos de cormos e da esterase em folhas, é possível diferenciar todas as cultivares de gladiolo avaliadas nessa pesquisa.

Por meio da técnica de RADP é possível diferenciar oito cultivares das onze avaliadas nesse estudo.

A similaridade das cultivares avaliadas por meio dos marcadores de enzima variou de 0,32 a 0,69 e a observada por meio dos marcadores de RAPD de 0,38 a 0,64.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

BONOW, S. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz**. 2004. 125 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.

CARDOSO, E. T.; NEDEL, J. L. Padrões eletroforéticos de cultivares de trigo indicadas para região sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 203-209, 2002.

FERREIRA, L. A. **Bioestimulantes e fertilizantes associados ao tratamento de sementes de milho e soja**. 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRUGOLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NICCIO, M. L.; McCOURT, P.; McPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; McCLUNG, C. R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, v. 112, p. 327-336, 1996.

GAIA, J. M. D.; MOTA, M. G. C.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; OLIVEIRA, V. R.; COSTA, M. R.; MARTINS, C. da S.; POLTRONIERI, M. C. Caracterização de acessos de pimenta-do-reino com base em sistemas enzimáticos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 333-342, set. 2007.

GANGULI, S.; SEN-MANDI, S. Effects of ageing on amylase activity and scutellar cell structure during imbibition in wheat seed. **Annals of Botany**, London, v. 71, n. 5, p. 411-416, May 1993.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: \_\_\_\_\_. **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p. 87-113.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles**, v. 44, p. 223-270, 1908.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; CASTRO, M. A. da S. de C.; ARIAS, L. N.; MENEGHELLO, G. E.; PESKE, S. T. Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 2, p. 77-85, jun. 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de plantas cultivada**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 496 p.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.11. New York: [s.n.], 1992. 470 p.

SALGADO, K. C. P. de C. S. **Mapeamento de QTLs associados à tolerância a alta temperatura de secagem em sementes de milho**. 2005. 113 p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCANDALIOS, J. G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, v. 28, p. 1-40, 1990.

SIQUEIRA, W. J.; MAGALHÃES FILHO, H. P.; LISBAO, R. S.; FORNASIER, J. B. Caracterização isoenzimática e morfológica de clones e introduções de alho. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 357-374, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Traduzido por Eliane Romanato Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKATSU, Y.; MIYAMOTO, M.; INOUE, E.; YAMADA, T.; MANABE, T.; KASUMI, M.; HAYASHI, M.; SAKUMA, F.; MARUBASHI, W.; NIWA, M. Interspecific hybridization among wild *Gladiolus* species of southern Africa based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Scientia Horticulturae**, Tokio, v. 91, p. 339-348, 2001.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, R. L.; NODARI, R. O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 51-57, jan./fev. 2007.