

VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE GÉRBERA (*Gerbera hybrida*)

BENEMANN, Daiane de Pinho^{1,2}; ARGE, Luis Willian Pacheco²; NOGUEIRA, Luciana Rodrigues²; BIANCHI, Valmor João²; MAIA, Luciano Carlos da³; PETERS, Jose Antonio²

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (daiane_bio@yahoo.com.br)

²Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas

³Deptº de Fitotecnia – Centro de Genômica e Fitomelhoramento - FAEM/UFPel

1 INTRODUÇÃO

A gérbera cultivada (*Gerbera hybrida*) é uma das mais importantes culturas no comércio mundial de flores de corte e de vaso, estando em quinto lugar no ranking, perdendo apenas para a rosa, cravo, crisântemo e tulipa, (Bhatia et al. 2009; Teeri et al. 2006). Somente no estado da Califórnia (E.U.A.), o valor do comércio de gérbera é de 30 milhões de dólares anuais, enquanto na Europa, representa mais de 100 milhões de euros por ano (Teeri et al., 2006). É uma planta de ciclo relativamente rápido (8 meses), com ampla diversidade de cores e formato das flores. Praticamente todos as cultivares comerciais plantados no Brasil foram desenvolvidos no exterior para onde os royalties da comercialização destas plantas são remetidos. Atualmente são conhecidas cerca de 70 espécies de gérberas (Asteraceae), a maioria originária da Ásia e da América do Sul (Bellé, 1998).

O mercado de plantas ornamentais é extremamente dinâmico e demanda lançamento de novidades constantemente. Para suprir as necessidades deste mercado é fundamental um programa de melhoramento genético sincronizado com as exigências do mercado consumidor. O melhoramento de gérbera consiste basicamente em realizar cruzamentos e seleção de genótipos “elite”, que são propagados por touceiras ou por meio da cultura de tecidos (Nagaraju et al., 1998).

Para melhores combinações híbridas, a avaliação da diversidade genética das populações se faz necessário, viabilizando a obtenção de genótipos superiores nas gerações segregantes. Desse modo, o estudo da diversidade das populações fornece as bases para a identificação de indivíduos divergentes, auxiliando o melhorista na seleção de combinações mais promissoras e favoráveis aos cruzamentos. Desta forma, marcadores moleculares baseados na análise de DNA têm sido considerados extremamente úteis para a caracterização de genótipos. Recentemente, a ênfase na área de marcadores moleculares tem sido no uso de EST-SSR (Gupta et al., 2003), os quais são obtidos pela utilização de ferramentas de bioinformática, sendo derivados de microssatélites (SSR) localizados em ESTs (*Expressed Sequence Tags*) ou genomas completos seqüenciados.

Com base no exposto acima, o trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética de acessos de Gérberas, utilizando marcadores EST-SSR, a fim de verificar a divergência genética entre as plantas para uso em futuros cruzamentos.

2 METODOLOGIA

DNA genômico foi extraído conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), a partir de folhas jovens expandidas de 34 acessos de Gérberas do banco de germoplasma da Empresa Pró-Clone, Holambra, Brasil.

Para a análise de marcadores EST-SSR, as reações de PCR foram conduzidas em termociclador Biorad marca Icyler, utilizado 2,5 µL de tampão 10x (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 0,15 µM de cada *primer*; 0,8 Ude Taq polimerase (Invitrogen); 15 ng de DNA genômico e água Milli-Q para o volume final de 25 µL. Foi usado o seguinte perfil térmico: 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45s, temperatura de anelamento específica para cada *primer* por 45 s, 72 °C por 1 min e 30 s, com uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Aos produtos da reação de PCR foram adicionados 10 µL de solução desnaturante (98% formamida, 10 mM EDTA, 0,05% bromofenol Blue e 0,05% de xileno cianol), seguido de tratamento térmico a 95°C por 5 minutos e imersão imediata em gelo. Posteriormente 4,5 µL de cada amostra amplificada foi aplicada ao gel. Como marcador de peso molecular utilizou-se DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). A eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida na concentração de 6%, em tampão TBE 1X a 65 volts, por aproximadamente 3 horas. Para revelação dos géis se utilizou nitrato de prata, segundo a metodologia descrita por Bassam et al. (1991).

O perfil eletroforético dos genótipos foi registrado quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas, em conjunto para análise de similaridade e em cada loco individual, para o cálculo da frequência alélica (número médio de alelos por loco, estimado pela média aritmética dos locos estudados). A similaridade genética foi calculada por meio do Coeficiente Simple Matching (SOKAL; SNEATH,1963) e o agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted pair group mean average), utilizando o software NTSYS.pc versão 2.1 (Rohlf, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos 50 pares de *primers* testados, 17 revalaram-se marcadores altamente polimórficos, amplificando 101 alelos. O número de alelos detectados no estudo variou de 5 a 7, com uma média de 5,94. A heterozigosidade esperada (He) e heterozigosidade observada (Ho) variaram de 0,68 a 0,77 (com uma média de 0,72) e 0,4 a 0,64 (com uma média de 0,52), respectivamente (Tabela 1). O conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) variou 0,61 a 0,73, com uma média de 0,67 e o valor cofenético foi de 0,87. O dendograma gerado a partir da análise de agrupamento pelo método UPGMA separou o material em cinco grupos principais. O grupo 1 inclui a cultivar Igor que apresenta inflorescência rosa do tipo semi dobrado e cultivar Cariba que apresenta inflorescência vermelha do tipo semi dobrado, enquanto o grupo 2 constituído apenas por cultivares Terra Feme que apresentam inflorescências amarelas e tipo simples. O grupo 3 constituído pelas cultivares Golden Kozak, Cosmo, Monique, Denarage, Orça e Pacífico, enquanto o grupo 4 e 5 representa as cultivares Pink elegance e tipo selvagem. Na Figura 1, pode-se verificar que há uma relação muito grande de similaridade entre os genótipos derivados de mesmo cruzamento.

A marcadores moleculares como RAPD, ISSR e SSR-EST tem sido utilizado para estimar a diversidade genética em diferentes cultivares de Gerbera (Da Mata et al., 2009; Rezende et al., 2009; Bhatia et al. 2009; Gong e Deng , 2010). A avaliação da diversidade genética utilizando marcadores moleculares é rápida e útil para a

conservação dos recursos genéticos, identificação de cultivares e seleção de progenitores para hibridação controlada (Graner et al., 2004). Portanto, a escolha de um determinado tipo marcador molecular é importante e depende fundamentalmente da utilização prevista (Gupta et al., 2002).

Table 1. Diversidade dos 17 EST-SSR em Gérbera, número de alelos, heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), coeficiente de endogamia (F) e conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Nome do loco	Nº de alelos	He	Ho	F	PIC
GERB1	7	0,73	0,55	0,23	0,68
GERB4	6	0,71	0,40	0,34	0,67
GERB9	6	0,77	0,44	0,42	0,73
GERB10	7	0,73	0,55	0,23	0,68
GERB12	7	0,76	0,55	0,26	0,72
GERB14	6	0,72	0,51	0,28	0,67
GERB17	6	0,73	0,50	0,32	0,69
GERB21	6	0,72	0,52	0,27	0,68
GERB22	5	0,67	0,64	0,03	0,61
GERB25	5	0,69	0,57	0,17	0,64
GERB30	6	0,72	0,51	0,29	0,68
GERB34	6	0,72	0,58	0,19	0,68
GERB35	5	0,68	0,43	0,36	0,62
GERB40	7	0,75	0,48	0,35	0,71
GERB41	6	0,70	0,51	0,27	0,65
GERB42	5	0,68	0,52	0,23	0,63
GERB44	5	0,68	0,51	0,24	0,62
Total	101				
Média	5,94	0,72	0,52	0,26	0,67

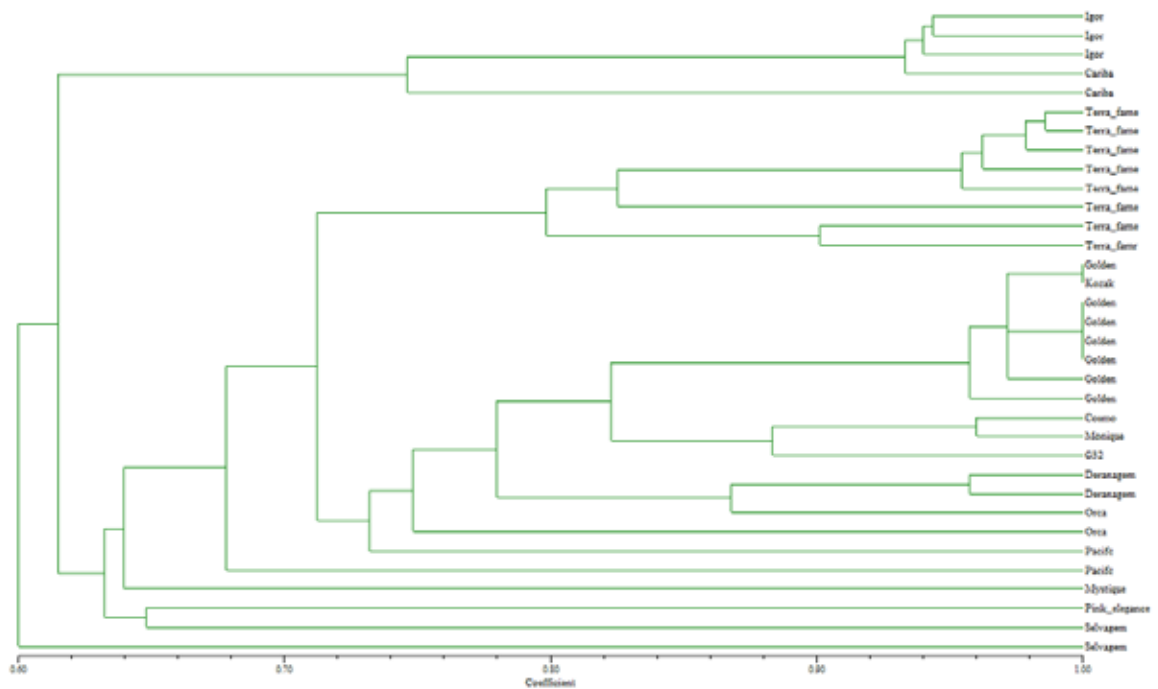


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética elaborado a partir da análise de 17 locos SSR de 34 acessos de gérbera, utilizando o coeficiente Simple Matching do software NTSys.

4 CONCLUSÕES

A análise de germoplasma com marcadores EST-SSR permite identificar de forma rápida a variabilidade genética entre os acessos de Gérbera, facilitando o trabalho de escolha dos genótipos mais divergentes para realização de cruzamentos controlados.

5 REFERÊNCIAS

- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, n.196, p.80-83, 1991.
- BELLÉ, S. Sistemas de irrigação e concentrações de adubação complementar na produção de *Gerbera jamesonii* cv. 1187 em vaso. Porto Alegre, 1998, 122f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BHATIAA R., SINGHA K.P., JHANGB T.; SHARMAB T.R.; Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. *Sci Hortic.*, n.119, p.208–211, 2009.
- DA MATA, T.L., SEGEREN,, M. I., FONSECA A. S., COLOMBO, C. A. Genetic divergence among gerbera accessions evaluated by RAPD. *Scientia Horticulturae*. 121: 92-96, 2009.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v.19, p.11-15. 1987.
- GONG, L., DENG, Z. Est-SSR markers for gerbera (*Gerbera Hybrida*). *Molecular Breeding*, v.26, p.125-132, 2010.
- GRANER, A.; DEHMER, K.J.; THIEL, T.; BORNER A. Plant genetic resources: benefits and implications of using molecular markers. In: *The Evolving Role of Genebanks in the Fast-developing Field of Molecular Genetics* (de Vicente MC ed): 26-32. IPGRI, Rome, 2004.
- GUPTA, P.K.; RUSTGI S.; SHARMA, S.; SINGH, R.; KUMAR, N.; BALYAN, H.S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity. *Mol Genet Genomics*, n.270, p. 315-323, 2003.
- GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K.; PRASAD, M. Molecular markers: principles and methodology. In: *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 9-54, 2002.
- NAGARAJU, V.; SRINIVAS, G.S.L.; LAKSHMI SITA, G. Agrobacterium mediated genetic transformation in *Gerbera Hybrida*. *Current Science*. v.74, n.7, p.630-633, 1998.
- Rezende, R. K. S.; Paiva, L. V.; Paiva, R.; Junior, A. C.; Torg, P. P.; Masetto, T. E. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. *Ciência Rural*, v.39, n.8, 2009.
- ROHLF, J.F. NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis System. Version 2.1. Setauket. NY: Exeter Software, 38p. 2000.
- SOKAL, R.R.; SNEATH, P.H.A. Principles of Numeric Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco, p.359, 1963.
- TEERI; T.H.; ELOMAA, P.; KOTILAINEN, M.; ALBERT, V.A. Mining plant diversity: Gerbera as a model system for plant developmental and biosynthetic research. *BioEssays*, n.28, p.756–767, 2006.