

ARTIGO CIENTÍFICO

Identificação de cultivares de *Gladiolus* sp. por meio de marcadores genético-bioquímicos e de RAPD⁽¹⁾

CLARISSA A. FERREIRA⁽²⁾, ÉDILA V. R. VON PINHO⁽²⁾,
KALINKA C.P. de C. SALGADO⁽²⁾, GABRIELLA S. PEREIRA⁽²⁾, IARAA. FERREIRA⁽²⁾

RESUMO

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 genético-bioquímicos 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 α -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 α -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 dos marcadores genético-bioquímicos e da técnica de RAPD, é possível diferenciar as cultivares avaliadas neste estudo. A similaridade das cultivares avaliadas por meio dos marcadores genético-bioquímicos e dos marcadores de RAPD varia de 0,32 a 0,69.

Palavras-chave: gladiolo, certificação da pureza genética, marcador molecular de proteínas e DNA.

ABSTRACT

Identification of cultivars of *Gladiolus* sp. by biochemical genetic markers and DNA molecular markers

In flower production the certification of genetic purity is fundamental to keep characteristics of one cultivar. For such, there is a need of identification of cultivars using more stable markers. In this work, molecular markers of both biochemical genetic and DNA were evaluated aiming the characterization of eleven cultivars of *Gladiolus* sp. The research was developed in the Department of Agriculture's Seed Center Laboratory, at the Federal University of Lavras. For enzyme and DNA extraction, the third definitive leaf was collected from sixteen randomly chosen plants 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 α -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 malate 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 α -amylase 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 biochemical genetic markers and RAPD technique, it is possible to distinguish the cultivars evaluated in this study. The similarity of the cultivars evaluated by the biochemical genetic markers and by RAPD markers range from 0.32 to 0.69.

Keywords: certification of genetic purity, molecular markers by proteins and DNA.

¹ Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora, financiada pelo CNPq. Recebido para publicação em 26/01/2009 e aceito em 15/01/2010

² Departamento de Agricultura, UFLA, 37200-000, CP. 37, Lavras, MG.

1. 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 genético-bioquímicos, 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 o método 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 capaz de caracterizar e identificar acessos ou grupos de acessos de pimenta-do-reino. MALONE et al. (2007) utilizaram marcadores genético-bioquímicos, os quais foram eficientes para estimar a variabilidade genética entre acessos de arroz vermelho.

As variações isoenzimáticas são detectadas por eletroforese, uma técnica relativamente de baixo custo e acessível. Os marcadores genético-bioquímicos são de caráter co-dominante, possibilitando a separação de genótipos homocigotos e heterocigotos, que é de grande utilidade nos testes de certificação da pureza genética (BORÉM e 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, por causa do pequeno número de marcadores disponíveis e da 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 e 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 polimorfismos genéticos. Essa técnica, também, tem a vantagem de, mesmo sem o conhecimento prévio do genoma, requerer pequena quantidade de DNA por análise (BORÉM e 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, neste trabalho, avaliar marcadores moleculares genético-bioquímicos e de DNA visando à identificação de cultivares de gladiolo, assim como a similaridade genética entre as cultivares a partir desses marcadores.

2. MATERIAL 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 variedades (1 – White 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, São Paulo.

2.1 Avaliações da pureza genética por meio de marcadores moleculares genético-bioquímicos

Para a extração de enzimas, foram coletados, de cada cultivar, a terceira folha definitiva, a partir do momento em que a planta tinha três folhas definitivas, iniciando a contagem de baixo para cima, de dezesseis plantas, escolhidas ao acaso, e também cinco cormos. Foram utilizadas duas repetições por tratamento. As folhas e os cormos foram macerados em N₂ 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 14000 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 a corrida, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos α-amilase (α-AM, E.C. 3.2.1.1), álcool desidrogenase (ADH, E.C. 1.1.1.1), esterase (EST, E.C. 3.1), peroxidase (PO, E.C. 1.11.1.7), malato desidrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) (ALFENAS, 1998).

2.1.1 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.

Para iniciar os dados correspondentes a ausência e presença de bandas, foi feita digitação em Edit-ntsys. Este arquivo expressa por um (1) a presença das bandas e por zero (0) a ausência das bandas em um dado gel, ou em um conjunto de géis. Assim, de posse destes dados, foi possível seguir os passos: 1. o software, no menu o item "similarity", foi aberto; 2. dentro desta janela, foi clicado o item "qualitative" data, (qualitative data, por que são dados de presença e ausência de bandas e não dados quantitativos); 3. após abri-lo, aparecem duas colunas, uma com parâmetros e outra com "Arguments"; 4.

no item "Input file", foi selecionado o arquivo que foi montada a matriz; 5. retornando à janela, foi visto o item "By Rows", que não foi modificado ("By Rows" significa o sentido que foi usado para dispor os seus genótipos no arquivo da matriz de zero e um, e, na maioria das vezes, os genótipos ficam nas colunas e as bandas analisadas, nas linhas; assim, este item não foi marcado porque os genótipos foram adicionados nas colunas e não nas linhas); 6. no item "Coefficient", foram clicados e vistos vários coeficientes de similaridade, e o utilizado para o cálculo de similaridades foi o coeficiente de Jaccard; 7. no item Output File, foi digitado o nome do arquivo correspondente à matriz mais qualquer letra para diferenciar do primeiro arquivo; 8. no "Positive Code" e "Negative Code", não foram feitas modificações ("Positive Code" significa que há presença de bandas, utilizando-se um (1), e "Negative Code" significa que não existe banda, utilizando-se zero (0)); 9. após preenchimento dos itens listados, foi-se até o menu acima do quadro de parâmetros e foi clicado em Compute; 10. voltou-se para o menu do programa; 11. no menu, foi escolhido o item "Clustering" e dentro desta janela, o item SAHN; 12. novamente, aparece uma janela com parâmetros e argumentos; 13. no item "Input File", foi digitado o nome do último arquivo que foi nomeado; 14. no item "Output Tree file", foi digitado outro nome de arquivo diferente dos dois anteriores; 15. foi deixado UPGMA no item "Clustering Method" (UPGMA significa médias aritméticas não ponderadas, pois, para dados de zero e um, não se pode calcular a média ponderada); 16. no item "in case of ties", foi escolhida a opção "find" ("In case of tie" quer dizer que podem ser processados vários agrupamentos, e quando se escolhe a opção "find", isto quer dizer que o software irá encontrar o agrupamento que melhor definiu a distinção dos genótipos

segundo os parâmetros usados); 17. não foram alterados os demais itens; foi clicado em "Compute" para processar; 18. caso apareça uma tela com alguns dados, minimizá-la e voltar para o menu principal; 19. no menu, foi escolhida a opção "Graphics" e, dentro desta janela, foi escolhido o item "tree plot", clicando-se nele; 20. aparece novamente a janela de parâmetros; 21. no item "Input File", foi escrito o nome do último arquivo que foi nomeado; 22. acima deste menu, clicar na opção "compute", para processar; 23. deverá aparecer o dendrograma.

Foi construída uma matriz de 0 e 1, ausência e presença de bandas para cada cultivar em cada loco, e a estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908), pela seguinte expressão:

$$\frac{a}{a+b+c}$$

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

2.2 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 1. Relação dos "primers" utilizados na caracterização das cultivares de gladiolo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Table 1. List of "primers" used in the characterization of cultivars of gladiolus. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Primers	Seqüência de bases
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

2.2.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA de folhas e de cormos, foram amostrados, para cada cultivar, no estádio de três folhas definitivas, a terceira folha superior, de dezesseis plantas,

escolhidas ao acaso, e cinco cormos de cada cultivar.

A extração foi realizada segundo SALGADO (2005). As folhas e os cormos foram macerados em N_2 líquido até a obtenção de um pó bem fino. Depois, foram adicionados a

100mg desse pó, 800 μ L 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 μ L 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 adicionou-se 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 μ L de TE (Tris-HCl 0,1mM, EDTA 0,1mM) + 2 μ L de RNase (10 mg/mL), mantendo-se à temperatura de 37 °C por 1 hora. Após esse período, o DNA foi precipitado com 100 μ L de álcool etílico 95%, lavado com 100 μ L de etanol 70%. Após a eliminação do álcool etílico 70%, os ácidos nucleicos foram secados por 40 minutos e, posteriormente, diluídos com 50 μ L de TE. O DNA foi quantificado em fluorímetro Hoeffer Scientific TKO100.

2.2.2 Reações de PCR

As reações de RAPD constaram de um volume final de 13 μ l, sendo seus componentes: 40,70% de água ultra pura; 9,23% de tampão de reação (1M de Tris-HCl pH 8; 1M de MgCl₂; 125mg.ml⁻¹ 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/ μ l. Foram utilizados 9 "primers" com bases de sequência 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 3l de tampão de corrida, contendo azul de bromofenol e, em seguida, os produtos foram aplicados em gel de agarose 0,8%. O tampão do tanque utilizado foi TBE 1x (0,045M de Tris-borato; 0,001 μ l de EDTA pH 8). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 150 v por 2h.

2.2.3 Revelação dos géis

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

2.2.4 Obtenção das similaridades genéticas

A obtenção das similaridades genéticas foi realizada conforme descrita no item 1.1.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Marcadores moleculares genético-bioquímicos

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

Dentre os sistemas enzimáticos testados, foi detectada baixa atividade para a enzima peroxidase (PO) nos tecidos dos cormos e, onde houve atividade, não ocorreu 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) e 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 1).

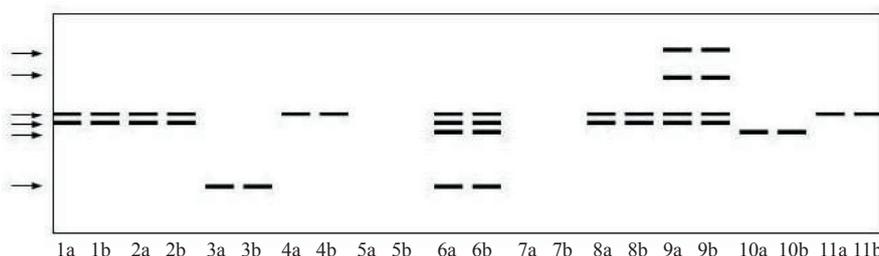


Figura 1. Padrões eletroforéticos da isoenzima peroxidase observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 1. Electrophoretic standards of peroxidase isoenzyme observed in leaf tissues of *Gladiolus*, a and b are replicates. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Peroxidasas 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 2), 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).

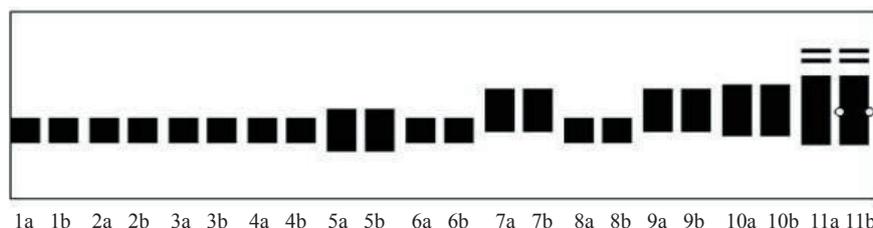


Figura 2. Padrões eletroforéticos da isoenzima malato desidrogenase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 2. Electrophoretic standards of malate dehydrogenase isoenzyme observed in tissues of corms of gladiolus, a and b are replicates. 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 devida ao gene ser expresso ou não em cada órgão ou tecido da planta.

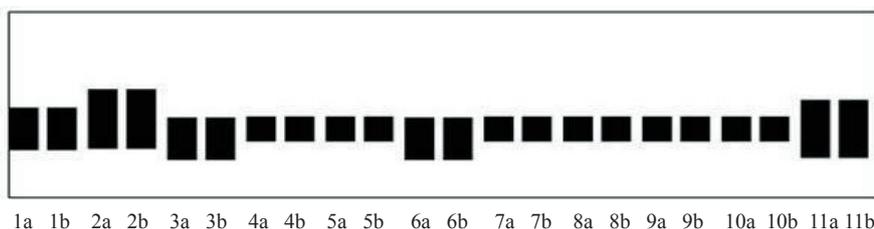


Figura 3. Padrões eletroforéticos da isoenzima malato desidrogenase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 3. Electrophoretic standards of malate dehydrogenase isoenzyme observed in leaf tissues of gladiolus, a and b are replicates. UFLA, Lavras, MG, 2006.

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 CO₂ nas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Quanto ao sistema enzimático álcool desidrogenase (ADH) (figura 4), nos tecidos dos cormos, todos os padrões obtidos foram monomórficos, exceto para a cultivar Traderhorn (9), sendo observadas duas bandas. Nos tecidos das folhas (figura

5), 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 mesmos autores, contudo, conseguiram obter resultados satisfatórios para essas enzimas ao utilizarem tecidos da raiz e tecidos da base dos cormilhos.

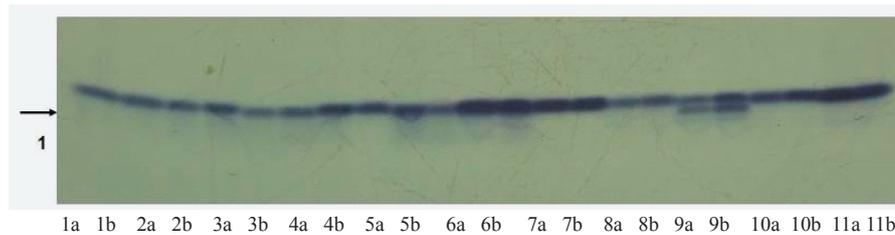


Figura 4. Padrões eletroforéticos da isoenzima álcool desidrogenase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 4. Electrophoretic standards of alcohol dehydrogenase isoenzyme observed in tissues of corms of gladiolus, a and b are replicates. UFLA, Lavras, MG, 2006.

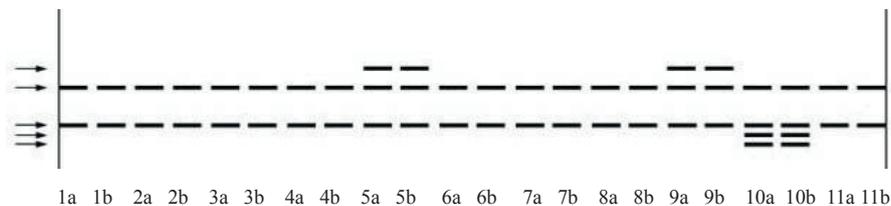


Figura 5. Padrões eletroforéticos da isoenzima álcool desidrogenase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 5. Electrophoretic standards of alcohol dehydrogenase isoenzyme observed in leaf tissues of gladiolus, a and b are replicates. 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 e ZEIGER, 2004).

Tanto nos tecidos de cormos quanto nos tecidos de folhas, houve atividade da α -amilase (α -AM). No perfil eletroforético do sistema enzimático α -amilase, nos tecidos dos cormos (figura

6), 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 Goddess (2) e Peter Pears (11), respectivamente. O último padrão foi observado somente para as variedades Goddess (6) e Yester (7). Já para os tecidos das folhas (figura 7), foram observados somente dois padrões eletroforéticos, distinguindo apenas a variedade T 704 (8).

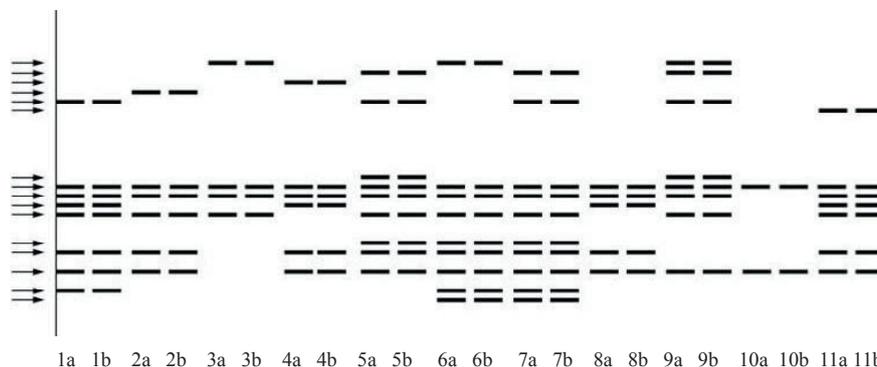


Figura 6. Padrões eletroforéticos da isoenzima α -amilase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 6. Electrophoretic standards α -amylase isoenzyme observed in tissues of corms of gladiolus, a and b are replicates. UFLA, Lavras, MG, 2006.

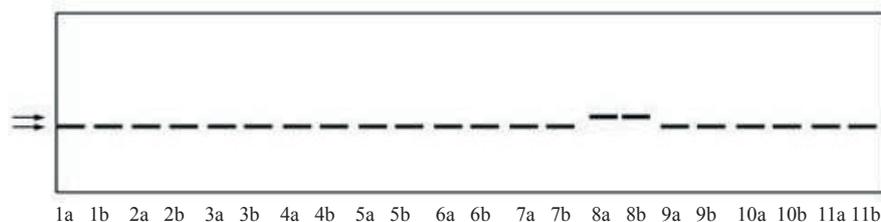


Figura 7. Padrões eletroforéticos da isoenzima α -amilase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 7. Electrophoretic standards α -amylase isoenzyme observed in leaf tissues of *Gladiolus*, a and b are replicates. . UFLA, Lavras, MG, 2006.

Enzimas hidrolíticas, tais como amilases, proteinases e β -glucanases, no início da embebição, ativam-se no embrião (GANGULI e SEN-MANDI, 1993). 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 α e β -amilases estão envolvidas no principal sistema de degradação de amido das sementes (FERREIRA, 2006).

Quando se fez a amostragem dos cormos para essa análise, estes se encontravam em processo de brotação, ou seja, em processo de degradação do amido. Por essas razões, pode-se justificar a alta taxa de polimorfismo encontrada nos cormos, pois a maioria do seu tecido é material de reserva. Provavelmente, existe uma quantidade substancial de amido nesses cormos, embora não tenham sido encontrados na literatura dados da composição química de cormos de gladiolo.

Para catalase (figura 8), foram visualizados nos tecidos dos cormos quatro padrões diferentes. As cultivares foram agrupadas da seguinte forma, nos padrões dessa enzima: 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). Já nos tecidos das folhas, não houve polimorfismo entre as cultivares analisadas.

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

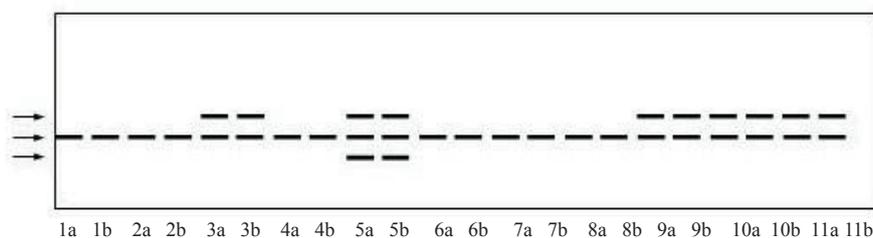


Figura 8. Padrões eletroforéticos da isoenzima catalase, observados em tecidos de cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 8. Electrophoretic standards catalase isoenzyme observed in tissues of corms of *gladiolus*, a and b are replicates. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Foram verificados padrões polimórficos para a isoenzima esterase (figura 9), 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 10), 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.

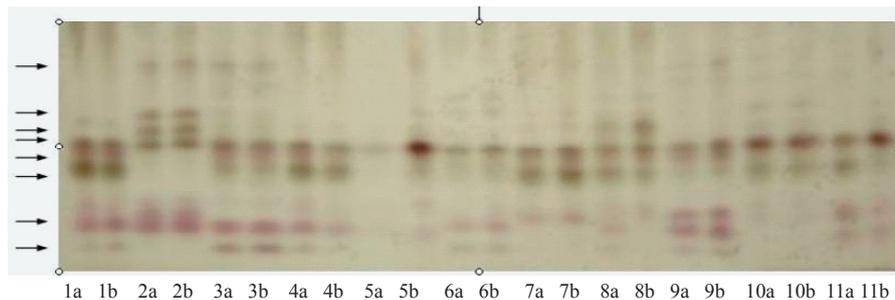


Figura 9. Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, observados em tecidos de folhas de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 9. Electrophoretic standards esterase isoenzyme observed in leaf tissues of *Gladiolus*, a and b are replicates. . UFLA, Lavras, MG, 2006.

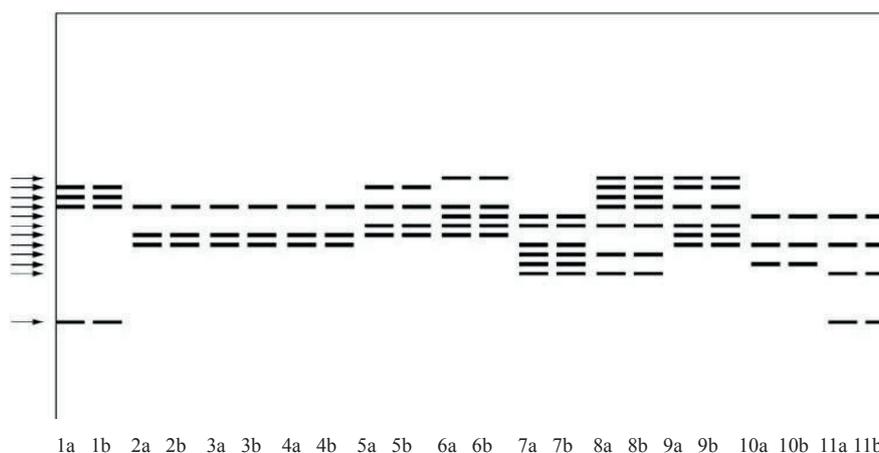


Figura 10. Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, observados em tecidos cormos de gladiolo, sendo a e b repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Figure 10 Electrophoretic standards esterase isoenzyme observed in tissues of *gladiolus* corms, a and b are replicates. 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 e 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 esta enzima ser muito utilizada como marcador, outras enzimas têm afinidade pelo mesmo substrato, podendo, dessa forma, também serem reveladas no mesmo gel. Na revelação da esterase, enzimas capazes de quebrar a ligação naftil-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, portanto, ter o polimorfismo superestimado por interpretações errôneas dos zimogramas obtidos para essa enzima.

As enzimas podem ser controladas por diferentes locos nos diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos (ALFENAS, 1998), o que justifica os padrões distintos verificados nos tecidos avaliados nesta pesquisa. Os marcadores moleculares genético-bioquímico podem ser considerados úteis para distinção de cultivares desde que os padrões observados sejam

estáveis.

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

No agrupamento das cultivares (figura 11), observaram-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, notou-se que as cultivares com maior similaridade, 0,69, foram 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 são provenientes de genótipos mais próximos.

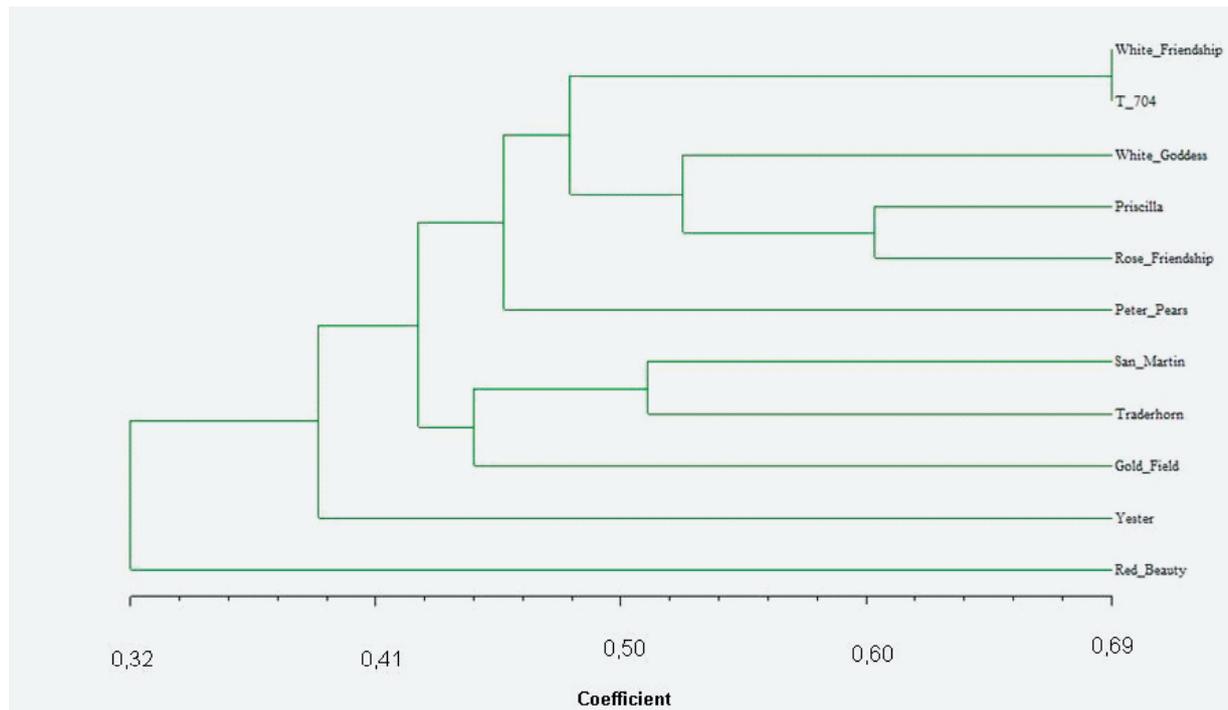


Figura 11. Dendrograma das onze cultivares de gladiolo estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores genético-bioquímicos. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Figure 11. Dendrogram of eleven cultivars of gladiolus studied, obtained by UPGMA cluster analysis based on the similarity coefficient of Jaccard, using genetic and biochemical markers. . UFLA, Lavras, MG, 2006.

3.2 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 das folhas.

Pelo 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) e Gold Field (6) apresentaram padrões de bandas semelhantes. As cultivares T 704 (8) e Red Beauty (10) apresentaram padrão semelhante (figura 12).

Em relação ao primer OPD15 (figura 13), também nos tecidos de cormos, apenas três cultivares não puderam ser distinguidas, pois não houve amplificação, mas as demais cultivares foram passíveis de serem diferenciadas por esse primer.

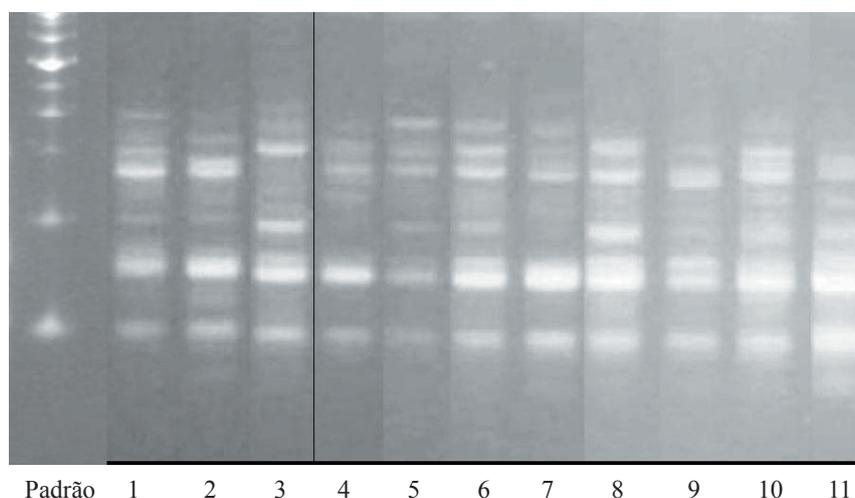


Figura 12. Padrões de marcadores de RAPD das onze variedades de gladiolo, extraídos do tecido dos cormos, utilizando o primer OPD 11. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Figure 12. Standards of RAPD markers of the eleven varieties of gladiolus, extracted from the tissue of corms, using the primer OPD 11. UFLA, Lavras, MG, 2006.

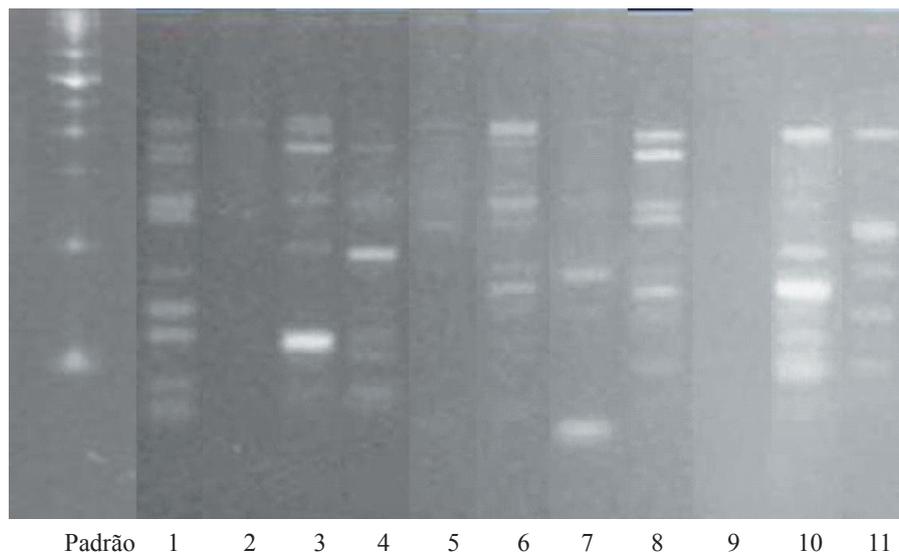


Figura 13. Padrões de marcadores de RAPD das onze variedades de gladiolo, extraídos do tecido dos cormos, utilizando o primer OPQ 15. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Figure 13. Standards of RAPD markers of the eleven varieties of gladiolus, extracted from the tissue of corms, using primer OPD 15. . UFLA, Lavras, MG, 2006.

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 14). 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 Goddess, Princilla, Red Beauty, Peter Pears, Rose Friendship e Traderhorn; Gold Field, e Yester; T 704. Dentro desse grande grupo, para as cultivares de flores amarelas Gold Field e Yester, foi observada uma similaridade de aproximadamente de 0,58. A maior similaridade (0,64) foi observada entre as cultivares Red Beauty e Peter Pears.

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.

Para a estimativa da diversidade genética em populações de alho, VIEIRA e NODARI (2007) demonstraram uma boa capacidade informativa dos marcadores RAPD.

O agrupamento observado para os padrões isoenzimáticos 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. E, possivelmente, é também devido ao pequeno número de "primers" usados neste estudo, o que certamente não cobriu todo o genoma das cultivares de *Gladiolus* sp.

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.

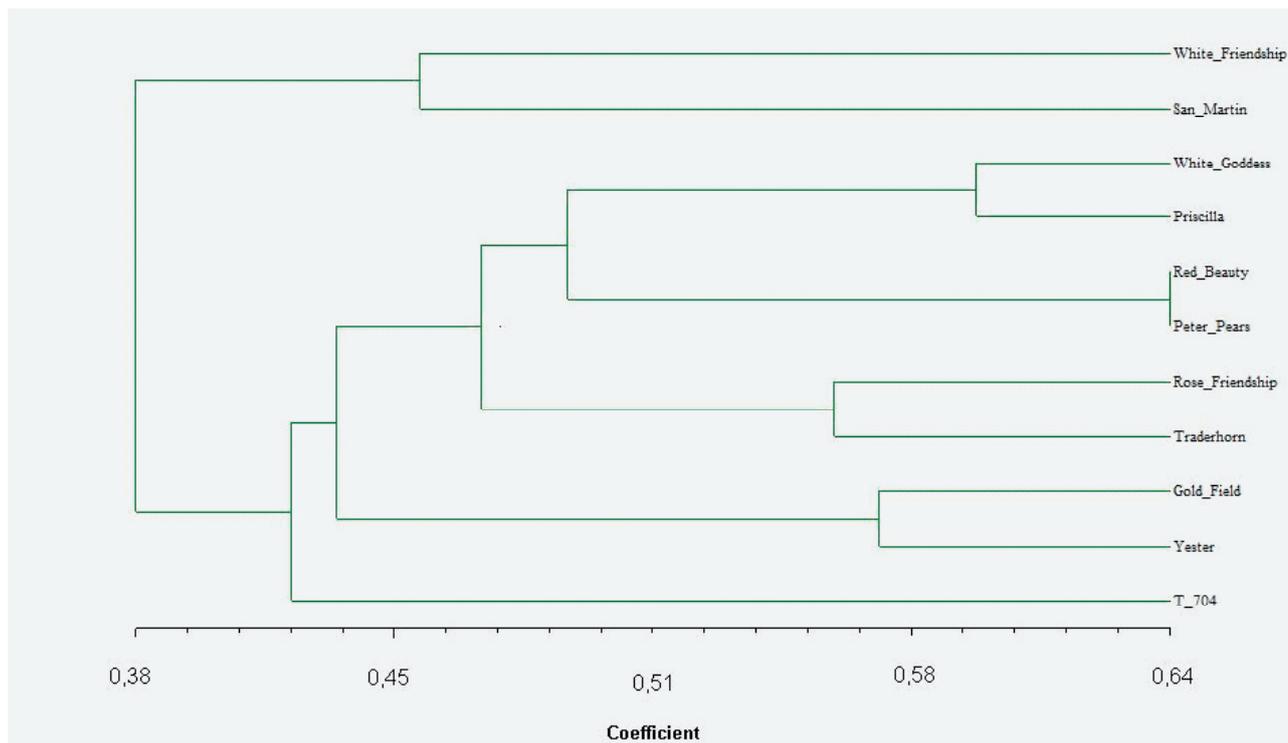


Figura 14. Dendrograma de onze cultivares de gladiolo estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores RAPD. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Figure 14. Dendrogram of eleven cultivars of gladiolus studied, obtained by UPGMA cluster analysis based on the similarity coefficient of Jaccard, using RAPD markers. UFLA, Lavras, MG, 2008.

4. CONCLUSÕES

Por meio dos marcadores genético-bioquímicos e da técnica de RADP, é possível diferenciar as cultivares de gladiolos avaliadas nesse estudo. A similaridade das cultivares avaliadas por meio dos marcadores genético-bioquímicos e dos marcadores de RAPD varia de 0,32 a 0,69.

REFERÊNCIAS

- 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. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 125p. Tese (Doutorado em Fitotecnia).
- 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. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).
- 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, Rockville, 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 pimentado-reino com base em sistemas enzimáticos. Horticultura Brasileira, Brasília, v.25, n.3, p.333-342, 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, 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 Vaudaise 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, 2007.
- ROHLF, F. J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.11. New York: [s.n.], 1992. 470p.
- SALGADO, K. C. P. de C. S. Mapeamento de QTLs associados à tolerância a alta temperatura de secagem em sementes de milho. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 113p. Tese (Doutorado em Fitotecnia).
- SCANDALIOS, J. G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics*, New York, v.28, p.1-40, 1990.
- SIQUEIRA, W. J., MAGALHÃES FILHO, H. P., LISBÃO, 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. 719p.
- TAKATSU, Y., MIYAMOTO, M., INOURE, 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. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 137p. Tese (Doutorado em Fitotecnia).
- 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. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).
- 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, 2007.