

## Variabilidade Genética de Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Morangueiro da Embrapa Clima Temperado<sup>1</sup>

Miriam Valli Büttow<sup>2</sup>, Natália Al-Alam<sup>3</sup>, Natércia Lobato Pinheiro Lima<sup>4</sup>, Ana Claudia Barneche de Oliveira<sup>5</sup>, Sandro Bonow<sup>6</sup>

### Resumo

O melhoramento genético do morangueiro busca, atualmente, cultivares mais adaptadas às condições locais e melhor qualidade de fruta. No entanto, não existem muitas informações sobre a variabilidade genética do germoplasma disponível, o que pode ser um fator limitante no desenvolvimento de novas cultivares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de 16 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de morangueiro da Embrapa Clima Temperado, através de 11 marcadores microssatélites. Foi encontrado um total de 102 alelos polimórficos, com média de 9,2 alelos por loco. A análise de agrupamento UPGMA mostrou considerável variabilidade genética entre as cultivares, e uma similaridade alta entre duas cultivares desenvolvidas pela Embrapa Clima Temperado.

### Introdução

O morangueiro pertence ao gênero *Fragaria*, família Rosaceae, sendo reconhecidas 24 espécies de morangueiro. A espécie *Fragaria x ananassa*, octoploide, é a mundialmente cultivada, sendo originária de um híbrido entre *F. chiloensis* e *F. virginiana* (Njuguna, 2010). Os programas de melhoramento de morangueiro no Brasil buscam o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas, frutos grandes, adocicados, firmes, com boa conservação pós-colheita e com período de colheita estendido (Oliveira; Bonow, 2012). No entanto, a maioria das cultivares atuais originou-se de poucos ancestrais e o melhoramento genético tem estreitado ainda mais a base genética do morango cultivado (Brunings et al., 2010). Além disso, são poucas as informações sobre a diversidade do germoplasma disponível em programas de melhoramento. Deste modo, o sucesso no desenvolvimento de novas combinações de caracteres em futuras cultivares de morangueiro pode ser limitada pela falta de informações e pela baixa variabilidade genética (Conti et al., 2002).

Atualmente, os marcadores microssatélites, ou SSR, do inglês *single sequence repeats*, estão disponíveis em grande quantidade para o morangueiro, principalmente devido à construção de bibliotecas genômicas e de microssatélites em regiões expressas do genoma (EST, do inglês *expressed sequence tags*), os EST-SSR. Estes marcadores mostraram altos índices de polimorfismo dentro de cultivares de morangueiro e entre espécies de *Fragaria* e podem, portanto, ser utilizados para a caracterização da diversidade, identificação de cultivares, melhoramento assistido por seleção, entre outros (Govan et al., 2008; Honjo et al., 2011; Schulze et al., 2012). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de 16 acessos de morangueiro (*F. x ananassa sp.*) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado através de 11 locos microssatélites.

### Material e Métodos

O DNA foi extraído de folhas jovens de 16 acessos de morangueiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Tabela 1), através do método de Ferreira e Grattapaglia (1996). A concentração e a qualidade do DNA foram confirmadas em gel de agarose 1%, corado com gel red e visuali-

1 Projeto Melhoramento Genético do Morangueiro visando adaptação, resistência a pragas e qualidade de fruta. PIBIC/CNPq, com bolsa de Iniciação Científica da apresentadora.

2 Bolsista de Pós Doutorado Júnior do CNPq na Embrapa Clima Temperado – CPACT – Embrapa/Pelotas. E-mail: [miriamvb@gmail.com](mailto:miriamvb@gmail.com)

3 Estudante do curso de Biotecnologia da UFPEl/Pelotas, bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Clima Temperado. E-mail: [natalia\\_alam@hotmail.com](mailto:natalia_alam@hotmail.com)

4 Analista da Embrapa Clima Temperado – CPACT – Embrapa/Pelotas. E-mail: [natercia.lobato@embrapa.br](mailto:natercia.lobato@embrapa.br)

5 Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado – CPACT – Embrapa/Pelotas. Email: [ana.barneche@embrapa.br](mailto:ana.barneche@embrapa.br)

6 Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – CPACT – Embrapa/Pelotas. E-mail: [sandro.bonow@embrapa.br](mailto:sandro.bonow@embrapa.br)

zado em luz UV. Um conjunto de 11 primers de microssatélites (Tabela 2) selecionados previamente foram amplificados nos 16 acessos. As condições do PCR foram as seguintes: 5,0µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1µM de primer *reverse*, 1µM de primer fluorescente universal marcado com M13, 1µM de primer *forward* marcado com cauda M13 (Schuelke, 2000) e 20ng de DNA em um volume final de 10µL.

O ciclo utilizado foi: uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94° C por 45 seg; temperatura de anelamento de acordo com o primer (Tabela 2), por 45 seg; e extensão a 72° C por 2 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 2 min. Os PCRs foram realizados um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos de PCR foram corridos em sequenciador automático LI-COR 4300 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Tabela 1 Cultivares de morangueiro (*F. x ananassa* sp.) usadas no estudo de variabilidade genética do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de morangueiro da Embrapa Clima Temperado.

Código BAG	Nome	Origem
MOR1	Albion	Univ. Califórnia/USA
MOR2	Aromas	Univ. Califórnia/USA
MOR4	Camarosa	Univ. Califórnia/USA
MOR5	Camino Real	Univ. Califórnia/USA
MOR6	Campidover	Desconhecida
MOR13	Sabrosa	Planasa/Espanha
MOR14	Santa Clara	Embrapa Clima Temperado
MOR15	Sweet Charlie	Univ. Florida/USA
MOR16	Toyonoka	Japão
MOR17	Ventana	Univ. Califórnia/USA
MOR18	Vila Nova	Embrapa Clima Temperado
MOR 21	Nova Milano/Farroupilha	Nova Milano/Farroupilha
MOR 27	Serrana	Antonio Pasa
MOR 28	Portola	Univ. Califórnia/USA
MOR 29	Monterey	Univ. Califórnia/USA
MOR 31	Palomar	Univ. Califórnia/USA

Os produtos de PCR foram designados como “1” para presença e “0” para ausência de bandas. Somente bandas que apresentaram constância e nitidez foram analisadas, e com base nos dados obtidos, foi construída uma matriz binária. A similaridade entre os indivíduos foi estimada segundo o coeficiente de Jaccard (Bonin et al., 2007) através da fórmula  $S_{ij} = a/(a+b+c)$ . Com base nos coeficientes de similaridade, foi construído um dendrograma, adotando como critério de agrupamento o método UPGMA (*unweighted pair-group method of arithmetic averages*) (Dias, 1998). Foi estimado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade e o dendrograma obtido. Estas análises foram realizadas com o auxílio do programa NTSYSpc versão 2.01 (Rohlf, 2001). Em espécies poliploides, a frequência alélica não pode ser calculada diretamente, mesmo com marcadores codominantes como microssatélites. Deste modo, foi calculado o número de alelos por loco ( $N_i$ ) e o número total de alelos ( $N_A$ ) para cada primer (Tabela 2).

Tabela 2 Primers de microssatélites, temperatura de anelamento ( $T_a$ ) em °C, número de alelos por indivíduo ( $N_i$ ), e número total de alelos ( $N_A$ ) avaliados em 16 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de morangueiro da Embrapa Clima Temperado.

Primers	$T_a$	$N_i$	$N_A$	Primers	$T_a$	$N_i$	$N_A$
ENFn111	57	2-4	8	ARSFL9	55	2-4	8

EMFn121	55	2-4	8	ARSFL11	60	3-6	8
EMFn170	55	4-7	13	ARSFL15	55	2-4	11
EMFvi136	55	3-7	14	ARSFL17	55	1-2	7
EMFvi166	55	2-4	5	CHFAM023	60	2-6	12
EMFv104	58	2-8	12				
Total							102
Média							9,3

## Resultados e Discussão

Um conjunto de 16 acessos de morangueiro foram genotipados com 11 pares de primers de microssatélites polimórficos permitindo a identificação de um total de 102 alelos, com média de 9,3 alelos por loco (Tabela 2). O primer ARSFL17 identificou um ou dois alelos por loco, enquanto que os outros dez primers identificaram dois a oito alelos por loco, como previamente reportado por Gil-Ariza et al.(2006). Estes resultados são consistentes com a amplificação em locos únicos (uma ou duas bandas) ou duplicadas/homólogos (mais de duas bandas) no genoma octoploide de *F. x ananassa* (Gil-Ariza et al., 2009) "type": "article-journal", "volume": "134" }, "uris": [ "http://www.mendeley.com/documents/?uuid=84473d-19-84e1-47d8-b29b-cf03c5d8ff74" ] } ], "mendeley": { "manualFormatting": "(Gil-Ariza et al., 2009.

O agrupamento gráfico feito pelo UPGMA separou os acessos de morango em diversos pequenos grupos (Figura 1) e mostrou considerável variabilidade entre as cultivares. No entanto, duas cultivares desenvolvidas na Embrapa Clima Temperado (Santa Clara e Vila Nova) possuem uma similaridade alta, próxima de 95%.

Este trabalho mostra que é possível utilizar marcadores moleculares do tipo microssatélites para avaliar a variabilidade genética presente no Banco Ativo de Germoplasma de morangueiro da Embrapa Clima Temperado. Portanto, em estudos futuros serão incluídos mais acessos nas análises, e pretende-se, ainda, estabelecer um conjunto de marcadores que possa discriminar e identificar as variedades deste BAG, da mesma maneira que foi feito para cultivares em diversos programas de melhoramento (Govan et al., 2008; Honjo et al., 2011).

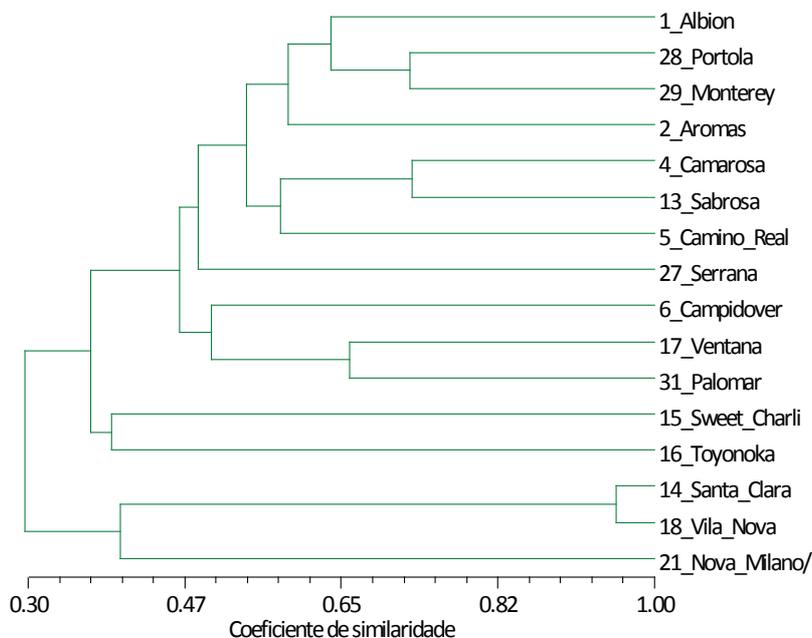


Figura 1 - Dendrograma gerado a partir dos dados de presença e ausência pelo método UPGMA. Similaridade média de 49%. Resultados gerados a partir de 11 locos de SSR. Coeficiente de correlação cofenética: de 0,93.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica para a apresentadora do trabalho e bolsa de pós-doutorado júnior à primeira autora. À Embrapa Clima Temperado pelo suporte e auxílio financeiro para realização deste trabalho.

### Referências

- BONIN, A.; EHRICH, D.; MANEL, S. (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular Ecology**, 16(18), p.3737-3758.
- BRUNINGS, A. M., MOYER, C., PERES, N., & FOLTA, K. M. (2010). Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. **Euphytica**, 173(1), 63–75.
- CONTI, J. H., MINAMI, K., GOMES, L. H., & TAVARES, F. C. A. (2002). Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares do morango por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**, 20(2), 145–152.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p.405-473.
- FAEDI, W.; MOURGUES, F.; ROSATI, C. (1999) Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. **Acta Hortícola**, Alexandria, 567, p. 51–60.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1996). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. (EMBRAPACENARGEN, Documento 20).
- GOVAN, C. L., SIMPSON, D. W., JOHNSON, a. W., TOBUTT, K. R., & SARGENT, D. J. (2008). A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 F. × ananassa cultivars. **Molecular Breeding**, 22(4), 649–661.
- HONJO, M., NUNOME, T., KATAOKA, S., YANO, T., YAMAZAKI, H., HAMANO, M., Yui, S., et al. (2011). Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. **Breeding science**, 61(4), 420–5.
- NJUGUNA, W. (2010) **Development and use of molecular tools in *Fragaria***. 389 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura)- Oregon State University, Oregon.