

# VARIAÇÃO GENÔMICA INTRACLONAL DE EXPLANTES DE MORANGO EM AMBIENTE CONTROLADO

## INTRACLONAL GENOMIC VARIETY OF STRAWBERRY EXPLANTS IN CONTROLLED FIELD

*Alcione da Silva ARRUDA<sup>1</sup>; Elisângela Rodrigues FIGUEIRA<sup>3</sup>; Adelaide Siqueira SILVA<sup>5</sup>; Luciana Nogueira LONDE<sup>2</sup>; Glaucia de F. M. Vieira e SOUZA<sup>3</sup>; Vanessa Beatriz Monteiro Galassi SPINI<sup>4</sup>; Cristina Soares de SOUSA<sup>1</sup>; Warwick Estevam KERR<sup>4</sup>; Luiz Ricardo GOULART<sup>4</sup>*

**RESUMO:** Com o objetivo de analisar a variação genômica de clones de morangueiro foram utilizados marcadores RAPD. As plântulas das cultivares Oso Grande e Sweet Charlie, que estavam mantidas em meio MS suplementado com 2,2 µM de BAP, foram transferidas para meio contendo 6,6 µM de BAP. Como controle foram utilizadas plântulas com a concentração inicial de BAP (2,2 µM). A extração de DNA foi realizada após quinze dias da transferência para o novo meio de cultura, retirando amostra de folhas. Foi feita a reação de PCR empregando treze *primers* decâmeros de seqüência arbitrária. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições para cada cultivar, sendo considerado como repetição, cada vidro de cultivo. O método UPGMA mostrou que os clones se diferenciam e que a maior distância genética entre eles foi de 2,1% para cv. Oso Grande e de 2,8% para cv. Sweet Charlie, sendo está, mais susceptível à variação intraclonal gerada pela adição do BAP do que a cv. Oso Grande. Para os genótipos avaliados a técnica de RAPD foi sensível e confiável, sendo adequada para revelar alterações genômicas associadas à variação na cultura de tecido, identificando diferenças entre os clones. As cultivares Oso Grande e Sweet Charlie podem sofrer variação somaclonal mesmo quando submetidas à baixas concentrações de BAP e uma única replicagem.

**UNITERMS:** *Fragaria ananassa*; Cultivo *in vitro*; RAPD.

## INTRODUÇÃO

Plantado em todos os continentes, o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) se desenvolveu em vários países. No Brasil a produção se expande a cada ano destacando-se como maiores produtores os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (CASTRO et al., 2003)

A obtenção de mudas de morango por micropropagação é de grande importância para esta cultura, contribuindo significativamente para o aumento da produtividade.

Na micropropagação do morangueiro altas concentrações de reguladores de crescimento são utilizadas e segundo Kumar, Barker e Reed., (1999), esses reguladores podem induzir alta proporção de variação somaclonal. Essas variantes podem causar problemas na uniformidade e no rendimento da cultura. A maioria dos variantes ocorre em plantas regeneradas por cultura de tecido, que passam por uma fase de dediferenciação.

Vários autores apontam a inserção, deleção, mutação de ponto e o rearranjo como mudanças genéticas que podem ocorrer durante a cultura de tecidos e que os sintomas fenotípicos são herdáveis (ANDERSON et al.,

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Doutorado em Genética e Bioquímica. Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 38400-902 Uberlândia, MG

<sup>2</sup> Acadêmica do curso de Mestrado em Genética e Bioquímica. Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 38400-902 Uberlândia, MG

<sup>3</sup> Acadêmica. Curso de Mestrado em Agronomia. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>4</sup> Professor Dr. da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, MG

<sup>5</sup> Bióloga Formada pela Universidade Federal de Uberlândia - UFU, MG

Received: 18/05/05

Accepted: 23/09/05

1991; KANE; WILSON; CHOUREY, 1992; KARP, 1995 e SANSAVINI *et al.*, 1990;).

A maioria dos trabalhos aborda a variação encontrada nas plantas regeneradas de cultura de tecidos; necessitam-se estudos mais detalhados sobre a natureza genética das características variantes. A verificação desses variantes pode ser constatada por meio do uso de marcadores moleculares.

A técnica de PCR utilizando *primers* de seqüência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações. Ela também facilita e acelera os estudos com as espécies mais tradicionais, como pelo uso do RAPD, que auxiliou na análise de polimorfismo molecular ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com os mesmos autores, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas tem tido uma difusão rápida e suas aplicações incluem: mapeamento genético; genética de populações; sistemática molecular; *fingerprints* de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas e animais. Esse trabalho objetivou analisar a variação genômica dos clones de morangueiro por marcadores RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

As plântulas das cultivares Oso Grande e Sweet Charlie, que estavam mantidas em meio de Murashige e Skoog – MS (1962), suplementado com 2,2 µM de BAP (6 – benzilaminopurina), foram transferidas para um meio contendo 6,6 µM de BAP e ajustando o pH da solução para 5,8 antes da autoclavagem, distribuindo 20 mL de meio de cultura em vidros de cultivo.

Como controle foram utilizadas plântulas com a concentração inicial de BAP (2,2 µM). A extração de DNA foi realizada após quinze dias da transferência para o novo meio de cultura, retirando uma amostra de folhas. O método de extração utilizado foi segundo Mercado *et al.* (1999).

Após a extração o DNA foi quantificado, a fim de verificar a sua integridade e a inexistência de possíveis contaminantes, em espectrofotômetro, modelo Ultraspect 1000 da Pharmacia com leitura de absorbância de 260nm.

A qualificação do DNA foi avaliada em

eletroforese. Para isso, um volume de 10µl de DNA foi aplicado em gel de agarose a 0,8%, de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Uma vez quantificada e avaliada, a amostra foi diluída em TE (10mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0) para a concentração de trabalho de 50ng/µl, a qual foi mantida em freezer a -20°C.

A reação de PCR foi feita utilizando um volume final de 20 µl incluindo tampão da Taq 1X, 100X de Tween 20, 0,3 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de *primers*, 8ng de DNA e 1U da enzima Taq DNA polimerase e água para completar o volume. O programa iniciou-se com a pré-denaturação a 94°C por 1 minuto, 37°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, seguido de 2 ciclos. 94°C por 10 segundos, 40°C por 20 segundos, 72°C por 2 minutos seguido de 33 ciclos. Por fim foi feita uma extensão de 72°C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X corados com brometo de etídeo. Foram selecionados treze *primers* decâmeros de seqüência arbitrária, sendo eles (OPG 02, OPG 08, OPG 19, OPC 09, OPC 14, OPO 02, OPO 06, OPI 01, OPI 08, OPM 05, OPM 12, OPM 18 E OPZ 15).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições para cada cultivar, sendo considerado como repetição cada vidro de cultivo.

Inicialmente foi construída uma matriz binária (1/0), onde as bandas presentes foram registradas como 1 e as ausentes como zero. Esses dados foram utilizados para determinar as distâncias genéticas (aos pares) para os tratamentos utilizados. As distâncias genéticas foram baseadas também, no percentual de desacordo ou distância genética comuns, as distâncias genéticas comuns obtidas foram utilizadas para as análises de agrupamento dos tratamentos pelo método UPGMA, que é um método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas. Para a análise dos dados foi usado o sistema computacional STAT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cultivo *In Vitro*

Os resultados mostram que a ausência de auxina não foi fator limitante no processo de regeneração, entretanto não se observou formação de raízes adventícias durante o desenvolvimento. De acordo com Jemmali, Boxus e Kinet (1992) e Damiano *et al.*, (1997), somente o uso de BAP no meio de cultura é suficiente para induzir a regeneração de plantas. No entanto Castro (1998),

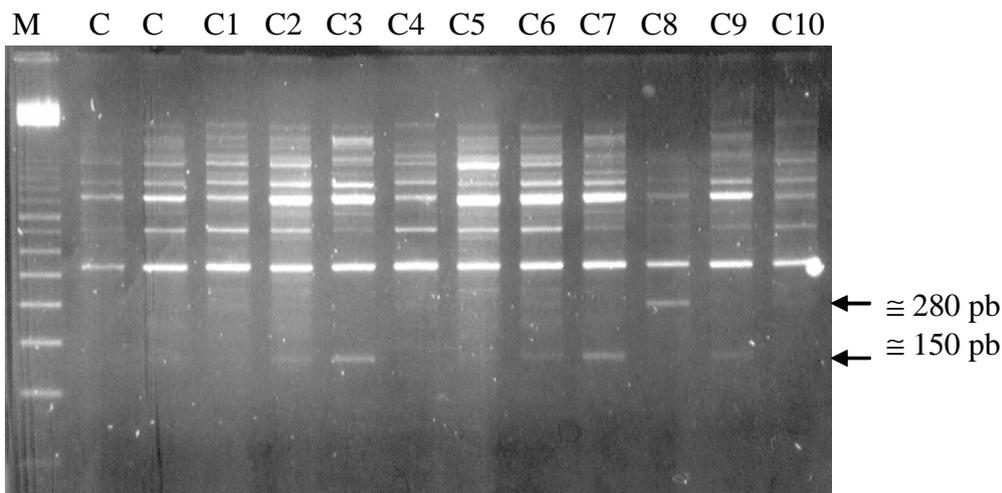
detectou melhor influência da concentração de auxina no meio de cultura na formação de raízes adventícias na cv. Campinas de morango.

**Análise Molecular**

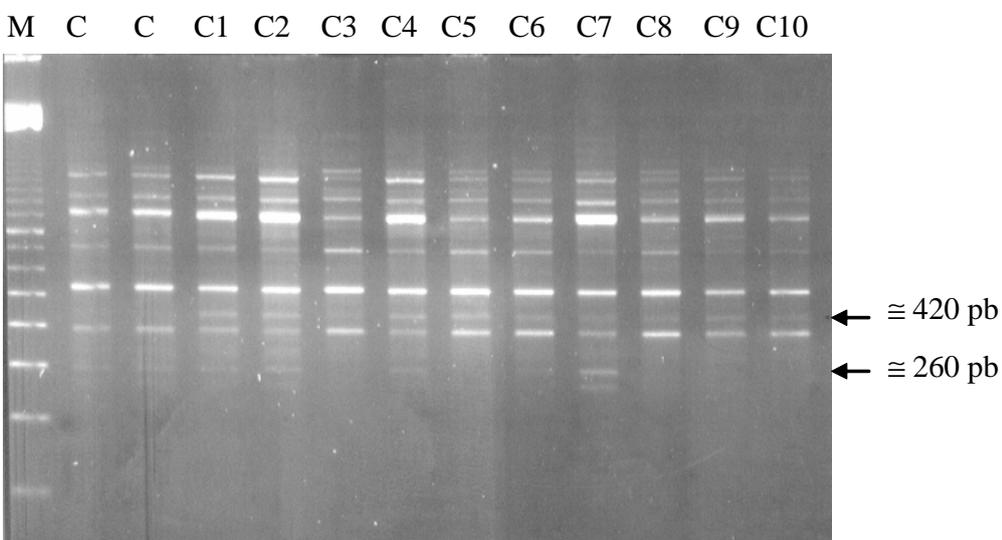
A amplificação usando os treze *primers* seletivos forneceu um total de 78 bandas analisadas para a cv.

Oso Grande e 79 para a cv. Sweet Charlie.

As Figuras 1 e 2 mostram que o marcador RAPD permitiu a detecção de polimorfismo nas cultivares estudadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Degani *et al.*, (2001), que analisaram a similaridade genética em cultivares de morango com marcadores RAPD e obtiveram distância genética de 8%.



**Figura 1.** Marcador RAPD para os 10 clones estudados (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10) em relação ao controle (C), com marcador de 100 pb (M), usando o *primer* OPO 02 cv. Oso Grande em gel de agarose 1,5%.



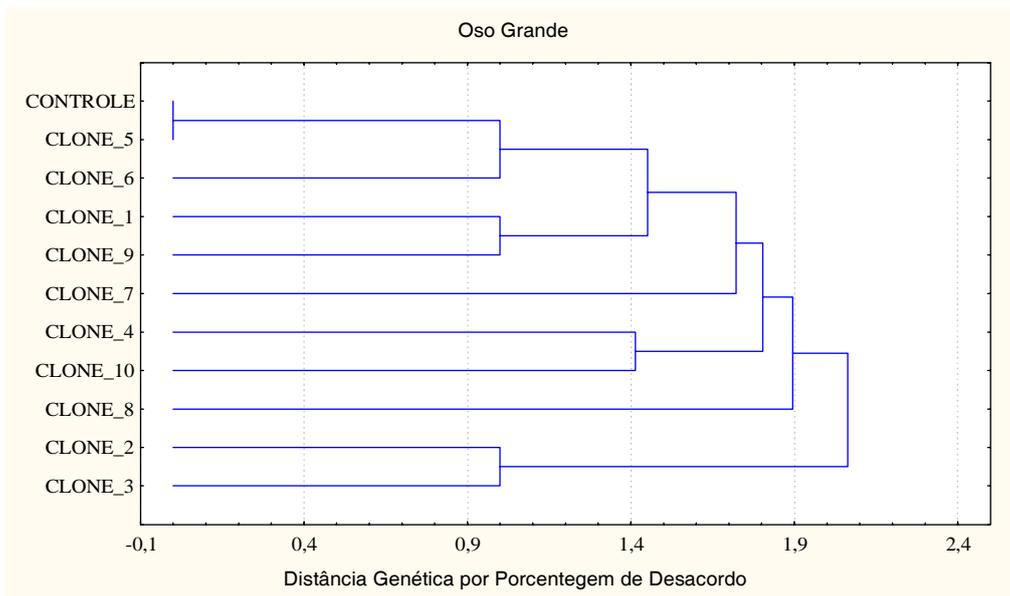
**Figura 2.** Marcador RAPD para os 10 clones estudados (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10) em relação ao controle (C), com marcador de 100 pb (M), usando o *primer* OPO 02 cv. Sweet Charlie em gel de agarose 1,5%.

A menor distância genética ocorreu entre o controle e o clone 5 para cv. Oso Grande (Figura 3). Para os demais clones houve um agrupamento onde

observou-se a distância genética máxima entre eles de 2,1%. Este resultado sugere que ocorreu uma variação genética entre os clones, e que isto pode ter ocorrido

devido à concentração de BAP utilizada. Este resultado confirma os dados obtidos por Quarta, Nati e Paoloni (1991); Faedi *et al.*, (1993), que avaliaram a variabilidade em morango com sistemas enzimáticos e obtiveram alta

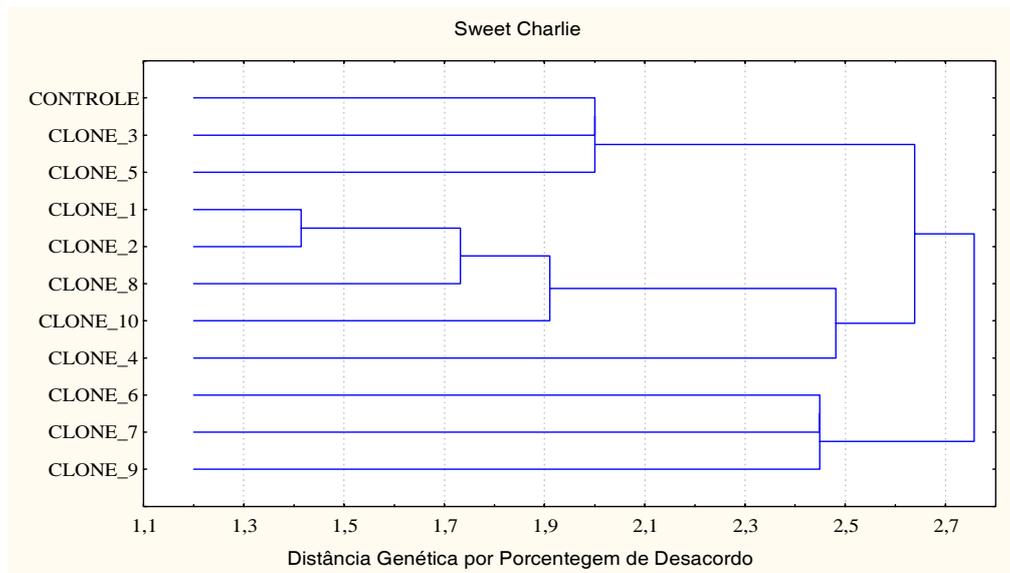
variação fenotípica e genotípica, sugerindo que este resultado aumenta o número de possíveis marcadores bioquímicos para identificação de genótipos.



**Figura 3.** Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre o controle e os clones utilizando 13 *primers*, na cv. Osos Grande.

Na cv. Sweet Charlie ocorreu a formação de três grupos, sendo o primeiro grupo formado pelo controle, clone 3 e 5, o segundo grupo contém os clones 1, 2, 8, 10 e 4, e o terceiro grupo foi formado pelos clones 6, 7 e 9. A menor distância genética ocorreu entre os clones 1 e 2, e a maior distância genética observada foi de 2,8% (Figura 4). A cv. Sweet Charlie sofreu maior variação que a cv. Oso Grande.

A cv. Sweet Charlie foi mais susceptível à variação intraclonal gerada pela adição do BAP do que a cv. Oso Grande. A menor variação observada entre os clones para a cv. Oso Grande foi de 0 e ocorreu entre o controle e o clone 5, indicando que somente este clone foi semelhante ao controle. Para cv. Sweet Charlie a menor distância genética ocorreu entre os clones 1 e 2 e apenas 2 clones foram semelhantes ao controle (clones 3 e 5).



**Figura 4.** Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA, entre o controle e os clones utilizando 13 *primers*, na cv. Sweet Charlie.

A distância genética estimada entre as duas cultivares foi de 10%. Isto significa que entre as 79 bandas investigadas, 8 fragmentos foram específicos para uma das cultivares. A estimativa de distâncias genéticas entre clones, dentro de cada cultivar, não pode ser feita pela análise conjunta das cultivares, pois as bandas específicas de cada cultivar podem superestimar os valores. Assim, a análise entre clones deve ser realizada para cada cultivar, independentemente.

Kumar, Barker e Reed (1999), obtiveram baixos níveis de variação na cultura morango quando determinados por marcador RAPD, o que diverge dos resultados obtidos neste trabalho, em que foi possível observar variação entre os clones avaliados quando amplificados com os treze *primers* selecionados.

Damiano et al., (1995), trabalhando com detecção de variação somaclonal em morangos com isozimas, pôde observar variação fenotípica e genotípica nas cultivares estudadas. Os mesmos autores afirmam que, não é possível determinar se a variabilidade é devido à composição química do meio, devido à adição de reguladores de crescimento que podem induzir mutações, ou pelo rearranjo do DNA em função da rápida divisão celular.

Ainda trabalhando com as mesmas cultivares, Damiano et al., (1997), observaram que o polimorfismo aparece em plantas regeneradas quando analisadas por ácido fosfatase, glutamato desidrogenase e peroxidase, e sugerem que a concentração de hormônio pode induzir mutações ou causar modificações no DNA devido à rápida divisão celular.

O método UPGMA permitiu o agrupamento dos clones em relação ao controle com os treze *primers* seletivos nas duas cultivares, mostrando que os clones se diferenciam e que a maior distância genética entre eles foi de 2,1% para cv. Oso Grande e de 2,8% para cv. Sweet Charlie.

Na cv. Oso Grande o clone 5 foi o único semelhante ao controle, enquanto na cv. Sweet Charlie foram os clones 3 e 5. A cv. Sweet Charlie foi mais susceptível à variação intraclonal gerada pela adição do BAP do que a cv. Oso Grande.

Para os genótipos avaliados a técnica de RAPD foi sensível e confiável, sendo muito útil para revelar alterações genômicas associadas à variação na cultura de tecido identificando pequenas diferenças entre os clones. As cultivares Oso Grande e Sweet Charlie podem sofrer variação somaclonal mesmo quando submetidas à baixas concentrações de BAP e uma única repicagem.

---

**ABSTRACT:** The present work has had the aim to analyze the strawberry clones genomic variety made through RAPD markers. The Oso Grande and Sweet Charlie plantlets cultivation which were kept in MS field supplemented with 2,2  $\mu$ M of BAP, were then moved to a field of 6,6  $\mu$ M of BAP. Plantlets with an initial concentration of BAP (2,2  $\mu$ M) were used as a way of control. The DNA extraction was made by leaves retraction after fifteen days of the transference to the new growing field. A PCR reaction was made and amplification products were shared in agarose gel 1,5% in 0,5x buffer colored with ethidium bromide. Thirteen decamer arbitrary primers sequence were selected. The experiment was leaded in completely randomized with ten replicates for each cultivation, considering as replicates each jar of cultivation. The UPGMA method showed the clones differentiation and the biggest genetic distance among then was of 2,1% in Oso Grande and 2,8% in Sweet Charlie cultivation, which was more likely to intraclonal variety caused by the BAP addition than Oso Grande cultivation. According to the analyzed genotypes the RAPD technique was sensitive, reliable and useful to reveal genomic modification associated to tissue cultivation variety identifying small differences among the clones. The Oso Grande and Sweet Charlie cultivation may suffer somaclonal variety even when submitted to low BAP concentration and to a single subcultures.

**UNITERMS:** *Fragaria ananassa*; Culture *in vitro*; RAPD.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ANDERSON, G.; LEWIS-SMITH, A. C.; CHAMBERLAIN, M.; SMITH, S. M. Variation in organization and copy number of ribosomal RNA genes in *Petunia hybrida* somaclones. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 33, n.2, p. 206-210, Apr/Jun. 1991.

CASTRO, Ricardo Lima de. **Calogênese e organogênese de tecido foliar de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 1998. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1198.

CASTRO, R. L.; CASALI, V. W. D.; BARRELLA, T. P.; SANTOS, R. H. S.; CRUZ, C. D. Produtividade de cultivares de morangueiro em sistema de cultivo orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21 n. 2, p. 227-230, abr./jun. 2003.

DAMIANO, C.; MONTICELLI, S.; FRATTARELLI, A.; NICOLINI, S.; CORAZZA, L. Somaclonal variability and *in vitro* regeneration of strawberry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1, n. 447, p. 87-94, Oct. 1997.

DAMIANO, C.; ASCARELLI, A.; FRATTARELLI, A.; LAURI, P. Adventitious regeneration and genetic variability in strawberry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1, n. 392, p. 107-114, Mar. 1995.

DEGANI, C.; ROWLAND, L. J.; SAUNDERS, J. A.; HOKANSON, S. C.; OGDEN, E. L.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; GALLETTA, G. J. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPS, RAPDs, and pedigree data. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 1-12, Jan. 2001.

FAEDI, W.; QUARTA, R.; PERSANO, F.; PAOLONI, F. M.; DAMIANO, C. Somaclonal variations in plants regenerated by anther culture of cv Pajaro. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1, n. 348, p. 427-443, Aug. 1993.

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

JEMMALI, A.; BOXUS, P. H.; KINET, J. M. Are strawberry plantlets arising from adventitious stipule buds also true to type? **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 2, n. 319, p. 171-176, Oct. 1992.

KANE, E. J.; WILSON, A. J.; CHOUREY, P. S. Mitochondrial genome variability in *Sorghum* cell culture protoclones. **Theoretical Applied Genetic**, v. 83, n. 6-7, p. 799-806, Apr. 1992.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for improvement. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 3, p. 295-302, Aug. 1995.

KUMAR, M. B.; BARKER, R. E.; REED, B. M. Morphological and molecular analysis of genetic stability in micropropagated *Fragaria x Ananassa* cv. Pocahontas. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, n. 35, p. 254-258, May/June 1999.

MERCADO, J. A.; MANSOURI, I. E.; JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESEDA, M. A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, n. 35, p. 152-153, Mar./Apr. 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, Apr. 1962.

QUARTA, R.; NATI, D.; PAOLONI, F. M. Strawberry anther culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1, n. 300, p.335-339, Jan. 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANSAVINI, S.; ROSATI, P.; GAGGIOLI, D.; TOSCHI, M. F. Inheritance and stability of somaclonal variation in micropropagated strawberry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1, n. 208, p. 375-384, Jul. 1990.