

CONTI, J.H.; MINAMI, K.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares de morangueiro por análise de RAPD. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 145-152, junho 2.002.

Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares do morangueiro por análise de RAPD

José Henrique Conti; Keigo Minami; Luiz Humberto Gomes; Flavio Cesar A. Tavares

USP-ESALQ, C. Postal 09, 13.418-900 Piracicaba – SP. Email: jhconti@hiway.com.br

RESUMO

Caracteres moleculares do morango foram avaliados para conhecer cultivares que estão sendo introduzidas no Brasil. Utilizou-se o método do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Os caracteres moleculares com maior poder de discriminação foram os “marcadores” gerados pelos “primers” Operon B8, Operon B19 e Operon G5, que foram eficientes para discriminar as vinte e seis cultivares estudadas. Os dados foram interpretados com o auxílio de dendograma, mapa de bandas, quadro de identificação e chave dicotômica. Foi possível distinguir seis grupos de similaridade, dois deles com cultivares selecionadas no Brasil, sendo um com ‘Campinas’, ‘Agf 80’, ‘Piedade’, ‘Jundiá’ e ‘Monte Alegre’ e o outro com ‘Obaira’ e ‘Mantiqueira’; três grupos com cultivares introduzidas, sendo o primeiro com ‘Lassen’, ‘Reiko’, ‘Chandler’, ‘Pajaro’, ‘Blackmore’ e ‘Seascape’, o segundo com ‘Fern’ e ‘Oso Grande’ e o terceiro com ‘Florida Belle’ e ‘Selva’. O último grupo reuniu as cultivares ‘Dover’ e ‘Dabreak’ junto com ‘Princesa Isabel’.

Palavras-chave: *Fragaria X ananassa* Duch., marcador molecular, germoplasma.

ABSTRACT

Estimate of the genetic similarity and identification of strawberry cultivars by RAPD analysis

Strawberry cultivars introduced in Brazil were identified through molecular study. The method of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used. Molecular characters with larger discrimination power were produced by the primers Operon B8, Operon B19 and Operon G5. These were efficient to discriminate the twenty six studied cultivars. Data were analysed through dendogram, bandmap, picture and dicotomic key. Six similarity groups were distinguished: Two with cultivars selected in Brazil, one with ‘Campinas’, ‘Agf 80’, ‘Piedade’, ‘Jundiá’ and ‘Monte Alegre’ and the other with ‘Obaira’ and ‘Mantiqueira’; three with introduced cultivars the first of which ‘Lassen’, ‘Reiko’, ‘Chandler’, ‘Pajaro’, ‘Blackmore’ and ‘Seascape’, the second with ‘Fern’ and ‘Oso Grande’ and the third with ‘Florida Belle’ and ‘Selva’. The last group united the cultivars ‘Dover’ and ‘Dabreak’ with ‘Princesa Isabel’.

Keywords: *Fragaria X ananassa* Duch., molecular marker, germplasm.

(Aceito para publicação em 04 de abril de 2.002)

A maioria das cultivares de morangueiro originou-se de poucos ancestrais (Scott & Lawrence, 1975) e o melhoramento genético tem estreitado ainda mais a base genética do morango cultivado (Sjulin & Dale, 1987). São poucas as informações sobre a diversidade do germoplasma disponível em programas de melhoramento e a origem dos materiais não parece estar correlacionada com a diversidade genética. Assim, o sucesso no desenvolvimento de novas combinações de caracteres em futuras cultivares de morangueiro pode ser limitado pela falta de informações e pela baixa diversidade genética (Graham *et al.*, 1996). A introdução de cultivares, a produção de mudas e o patenteamento de cultivares necessitam de sistema de identificação. A caracterização de cultivares é a base para trabalhos de estimativa de similaridade genética e para a sua identificação.

Atualmente a identificação de cultivares do morangueiro no Brasil é baseada em características morfológicas. O registro institucional de cultivares do morangueiro baseia-se em trabalho de Passos *et al.* (1994) onde são descritas as características morfológicas que devem ser consideradas na caracterização de cultivares. Os trabalhos de Nehra *et al.* (1991) e Bringhurst *et al.* (1981), que utilizaram a análise de proteínas, demonstraram que o número de “marcadores” isoenzimáticos possíveis é pequeno, confirmando a opinião de Ferreira & Grattapaglia (1996) que o número de locos isoenzimáticos disponíveis limita o poder desta técnica. Proposta por Williams *et al.* (1990), a técnica de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) demonstrou ser eficiente na identificação de cultivares do morangueiro nos trabalhos de Parent & Pagé (1995); Gidoni *et al.* (1994) e Graham *et al.* (1996).

O presente trabalho visou a caracterização molecular, via RAPD, de vinte e seis cultivares de morangueiro, nacionais e introduzidas, incluindo as atualmente cultivadas e aquelas com potencial de uso em programas de melhoramento e nas diferentes regiões produtoras.

MATERIAL E MÉTODOS

As vinte e seis cultivares de morangueiro, fornecidos pelo IAC, foram mantidas em vasos, coletando-se as amostras de folhas utilizadas na caracterização molecular. As cultivares foram numeradas de 1 a 26. A Tabela 1 descreve as cultivares, o respectivo número indicativo, o país de origem e os marcadores que as identificam.

Em cada cultivar foram coletadas uma ou duas folhas “não expandidas” que foram colocadas em cadinho de porcelana onde foi adicionado nitrogê-

Tabela 1. Cultivares organizadas pela mesma ordem em que aparecem no dendograma e os respectivos códigos de identificação, Estado e país de origem e “marcadores” que identificam as cultivares.

Código	Cultivar	Local de origem	"Marcadores"
1	'Dover'	Flórida/EUA	B19E (+), B19M (-), B8I (-)
4	'Princesa Isabel'	São Paulo/Brasil	B19V (+), B19P (+)
10	'Dabreak'	Califórnia/EUA	B8G (+)
2	'Agf 80'	São Paulo/Brasil	B19M (+), B19E (-), B19F (-), B19W (-), B19R (-)
3	'Campinas'	São Paulo/Brasil	B19M (+), B19E (-), B19F (-), B19W (-), B19R (-)
7	'Jundiaí'	São Paulo/Brasil	B19E(-),B19W(-),B19R(-),B19J(-),B8I(+),B8O(-),G5A (+)
6	'Piedade'	São Paulo/Brasil	B19R (+), B19W(-), B19L (-)
11	'Monte Alegre'	São Paulo/Brasil	B19W (+), G5N (-)
23	'Chandler'	Califórnia/EUA	B8J (+), B19E (-)
26	'Seascape'	Califórnia/EUA	B19F (+), G5D (-) e B8J (-)
9	'Lassen'	Califórnia/EUA	B19E (+),B19M (-),G5C (-),B8J (-),B8I (+),B19J(+)
25	'Blackmore'	Califórnia/EUA	B19M (+), B19E (+), B8G (-), B19V (-)
13	'Reiko'	Japão	B19E(+),B19M(-),G5D (-),B8I (+),B19J (-),G5A (+)
24	'Pajaro'	Califórnia/EUA	B8J (+), B19E (+)
5	'Guarani'	São Paulo/Brasil	B19V (+), B19P (-)
16	'Sequoia'	Califórnia/EUA	G5C (+)
8	'Cruz'	Flórida/EUA	G5N (+), B8L (-)
17	'Florida Belle'	Flórida/EUA	B19I (+)
19	'Selva'	Califórnia/EUA	G5A (+), B19E (-), B19L (-), B8L (-), B8I (-)
14	'Dr. Morère'	França	B19L (+)
12	'Obaira'	São Paulo/Brasil	B19E (-), B8I (+), B8O (+), B8B (-)
15	'Mantiqueira'	São Paulo/Brasil	B19E(-),B8I (+),B8O(+),B8B (+),B19I (-),G5N (-), B19F (-)
22	'Toyonoka'	Japão	G5D (+)
18	'Fern'	Califórnia/EUA	B19E (-), B8I (+), B8O (-), G5A (-)
21	'Oso Grande'	Califórnia/EUA	B19E (+), B19M (-), B8I (+), G5A (-)
20	'Korona'	Holanda	B8L (+)

nio líquido. As folhas foram maceradas com pistilo até a formação de um pó bem fino. Deste material colocou-se 100 a 150 mg em tubo de Eppendorf. Em um dos tubos foi adicionado 650 ml do tampão de extração (3% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris Hcl pH 8,0, 1% polivinilpirrolidone) contendo 40 ml (6,0%) de 2-mercaptoetanol adicionado imediatamente antes do uso. Os tubos restantes, com material extraído, foram armazenados em freezer à temperatura de -70°C. Os tubos foram incubados em banho Maria a 60-65°C por 30 minutos. Durante a incubação, os tubos foram agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. Após a incubação foi adicionado 650 ml de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitando-se os tubos a cada 5 minutos e invertendo-os até

formar emulsão homogênea. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 10 minutos. A face superior foi pipetada para outro tubo, onde foi adicionada novamente solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitado e centrifugado novamente. Posteriormente adicionou-se 150 ml de solução de acetato de amônia 5 M e em seguida adicionou-se 1000 ml de etanol 96°GL à temperatura de -20°C para precipitar os ácidos nucléicos no fundo do tubo. O tubo de Eppendorf foi invertido e mantido nesta posição por aproximadamente 20 minutos, até evaporar o etanol. Foram realizadas duas lavagens dos ácidos nucléicos adicionando, em cada uma delas, 300 ml de etanol 70%. O tubo foi invertido e aguardado o tempo necessário para que o “pellet” e o tubo ficassem completamente secos. O “pellet” foi

ressuspendido, dependendo do tamanho, em 50 a 100 ml de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1,0 mM EDTA), até ficar completamente dissolvido.

Para a eliminação do ácido ribonucleico adicionou-se aos tubos 2 ml de solução de RNase (10 mg/ml) para cada 100 ml de solução de TE contendo os ácidos nucléicos. Em seguida os tubos foram incubados a 37°C por uma hora para a digestão do RNA. Para a eliminação da RNase foi necessária nova extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), outra precipitação, agora sim de DNA (ácido desoxirribonucleico) puro, com etanol e ressuspensão em TE. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho GENE-QUANT Pharmacia.

As amplificações foram feitas em volume de 25 µl contendo 20 mM de Tris HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 100 mM de cada um dos 4 desoxinucleotídeos, 20 ng (2mM) de "primer" (10 pares de bases), 0,1% Triton X-100, 1,8 mM de MgCl₂, 25 ng de DNA molde de morango, 1,5 U da enzima Taq DNA Polimerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador PTC-100 da M. J. RESEARCH INC. O programa iniciava-se com a pré-denaturação a 92°C, por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 72°C, com extensão final de 2 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,6% em tampão TBE (50 mM de Tris base, 50 mM de ácido bórico e 2,5 mM de EDTA sódico) à corrente elétrica de 100 mA. O gel foi corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) por 20 minutos, descorado em água corrente por 40 minutos e fotografado com filme polaroide 667 com filtro laranja em transiluminador de ultra violeta Macro Vue de 302 nm.

Os "primers" utilizados foram escolhidos buscando-se procurar os que apresentavam capacidade de gerar número médio de fragmentos de DNA amplificados polimórficos (bandas), de alto peso e maior polimorfismo. Foram avaliados sessenta "primers" adquiridos da Operon Technologies INC, sendo vinte do Kit B, vinte do Kit G e vinte do Kit J. Baseado nestes resultados foram escolhidos os "primers" B 6, B 8, B 19, B 20, J 12 e J 16. Os "primers" G 2, G 5, G 11 e F 7 foram escolhidos porque apresentavam bom polimorfismo no trabalho de Gidoni *et al.* (1994) e os "primers" F 7 e G 11 porque deram bons resultados no trabalho de Parent & Pagé (1995). Cada "primer" escolhido foi avaliado duas vezes com as vinte e seis cultivares. Dentre estes, foram escolhidos aqueles com melhor definição e com repetibilidade de resultados, que são os da Operon Technologies B 6 (TGCTCTGCCC), B 19 (ACCCCGAAG), B 8 (GTCCACACGG), G 5 (CTGAGACGGA) e G 11 (TGCCCGTCGT). Estes "primers" geraram um total de setenta e três

"marcadores" que foram utilizados na obtenção dos resultados deste trabalho. A partir destes "marcadores" foi possível construir um dendograma, onde é estimado o grau de similaridade entre as cultivares e o mapa de bandas que mostra a posição deles em cada cultivar, respeitando a mesma disposição de cultivares do dendograma. Entre os setenta e três "marcadores" gerados, foram escolhidas vinte com maior poder de discriminação dos "primers" B8, B19 e G5) com maior poder de discriminação. Com estes construiu-se o quadro de identificação e a chave dicotômica. Esta metodologia foi escolhida pois a utilização de poucos "marcadores" com capacidade de separar muitas cultivares facilita o trabalho de identificação. O dendograma e o mapa de bandas são úteis para obter o grau de similaridade entre cultivares e o quadro de identificação e a chave dicotômica são recursos para identificar cultivares.

A estimativa dos pesos moleculares dos fragmentos amplificados, utilizados como "marcadores", expressos em número de pares de bases, foi obtida diretamente nas fotografias das eletroforeses por comparação com o padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder. A estimativa foi feita no software DNAFRAG (Schaffer & Sederoff, 1981). Para a identificação das vinte e seis cultivares foram utilizados vinte "marcadores". Estes foram identificados por uma primeira letra e um número, que é a designação do "primer" que deu origem e por uma última letra que é a identificação do "marcador" e se refere ao número de pares de bases dos fragmentos amplificados. A descrição destes "marcadores" com o respectivo número de pares de bases, pode ser vista no quadro de identificação (Figura 1).

A análise dos dados moleculares foi baseada na presença ou ausência de bandas (1 ou 0 respectivamente) com o mesmo peso molecular. A partir dos géis obtidos foi construída uma matriz binária que originou a matriz de coeficientes de similaridade pelo método da similaridade qualitativa com o coeficiente de Jaccard. Para a formação dos dendogramas, as matrizes de coeficientes de similaridade foram analisadas pelo método do desempenho seqüencial de aglomeração hierárquica de

grupos ("Sahn Clustering"), com o coeficiente do método do agrupamento pareado sem peso com significado aritmético (Rolph, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O dendograma formado, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard resultou em seis grupos de cultivares. Comparando-se as informações de origem das vinte e seis cultivares estudadas com o dendograma obtido, notamos que existe uma relação entre a origem das cultivares e o grau de similaridade exposto no dendograma. Podemos inferir que foram coerentes com a origem os grupos formados pelas cultivares Campinas, Agf 80, Jundiá, Piedade e Monte Alegre, pois estas (Camargo & Passos, 1993) foram selecionadas no Instituto Agrônomo de Campinas, com exceção de 'Agf 80' da qual se desconhece a origem, mas apresentou similaridade 100% com a cultivar 'Campinas'. O grupo formado pelas cultivares Lassen, Reiko, Chandler, Pajaro, Blackmore e Seascape só não é coerente com a origem porque a cultivar Reiko foi selecionada no Japão e não na Califórnia, como as demais (Thomas & Goldsmith, 1945; Faedi *et al.*, 1988 e Estados Unidos, Regents of the University of California, 1996a). O grupo formado pelas cultivares Obaira e Mantiqueira é coerente com os dados de origem pois ambas foram selecionadas no IAC, assim como o grupo formado pelas cultivares Fern e Oso Grande, ambas selecionadas na Califórnia (Faedi *et al.*, 1988 e Estados Unidos, Regents of the University of California, 1996b). O grupo formado pelas cultivares Dover, Princesa Isabel e Dabreak não é coerente com a origem pois a cultivar 'Dover' foi selecionada na Flórida (Howard & Albregts, 1980), a cultivar Princesa Isabel foi selecionada no IAC (Camargo & Passos, 1993) e 'Dabreak' foi selecionada na Califórnia. O grupo formado pelas cultivares 'Flórida Belle' e 'Selva' também não tem coerência com os dados de origem, pois a primeira foi selecionada na Flórida (Howard & Albregts, 1976), e a segunda na Califórnia (Faedi *et al.*, 1988).

Inicialmente proposto por Powell *et*

Pr.	pb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
B8B	1793	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
B8G	886	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8I	752	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
B8J	657	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
B8L	593	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B8O	468	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
B19E	1255	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
B19F	1179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
B19I	1062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B19J	1028	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B19L	990	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B19M	944	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B19P	855	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B19R	763	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B19V	564	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B19W	522	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5A	976	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
G5C	899	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5D	843	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
G5N	264	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Figura 1. Quadro de identificação que separa as 26 cultivares testadas individualmente, onde “+” indica a presença do “marcador” e “-” a ausência. Na primeira coluna está a denominação do “primer” (pr), seguida da letra identificativa do “marcador” e na segunda o número de pares de base (pb) do “marcador” e nas outras 26 colunas, as cultivares em ordem crescente. Piracicaba, ESALQ, 1999.

al. (1991), o mapa de bandas é uma alternativa para apresentar os dados de “marcadores” (fragmentos de DNA amplificados de determinado peso) e a disposição deles nas cultivares utilizadas. Este método permite uma visão ampla da disposição dos “marcadores” e com ele é possível identificar o número de “marcadores” por cultivar e o número de cultivares com um determinado “marcador”. Graham *et al.* (1996) utilizou este recurso em morangueiros. Neste trabalho foi construído este quadro com as vinte e seis cultivares e os mesmos setenta e três “marcadores” utilizados no dendograma. Neste quadro são colocadas as cultivares e a respectiva disposição de bandas começando de baixo para cima, com os “marcadores” que possuem somente uma banda nas vinte e seis cultivares, em seguida aqueles que possuem bandas em duas cultivares e assim por diante até, no final, aqueles “marcadores” que possuem bandas em todas as cultivares. A presença de produtos de amplificação está representada por espaços cheios e a ordem

das cultivares é indicada exatamente como a gerada pelo dendograma. As designações da margem direita indicam a denominação dos “marcadores”. O mapa de bandas deu indicações da disposição dos “marcadores” nas cultivares. A maior parte dos “marcadores” apresentou poucas bandas, pois 23,29% dos “marcadores” apresentou uma banda e 68,50% apresentou até seis bandas.

Outra maneira de apresentar os dados de “marcadores” moleculares de RAPD é através de um quadro com o número suficiente de “marcadores” para identificar as cultivares. Gidoni *et al.* (1994) montaram um quadro de identificação para oito cultivares de morangueiro com os resultados da análise de RAPD e identificaram os fragmentos polimórficos de DNA (“marcadores”) pelo número de pares de bases e pelo “primer” que deu origem. O quadro foi composto de oito cultivares e dez “marcadores”. Neste trabalho foi possível montar este quadro de identificação (Figura 1) com as vinte e seis cultivares e vinte fragmentos polimórficos utiliza-

dos como “marcadores”, sendo seis do “primer” B 8, dez do “primer” B 19 e quatro do “primer” G 5. O quadro dá a disposição de todas as bandas de cada “marcador” em cada cultivar. No entanto, algumas cultivares podem ser identificadas por apenas alguns “marcadores”. Assim, na tabela 1, descrevemos as cultivares e os respectivos “marcadores” seguidos do símbolo “+” quando a banda esta presente e do símbolo “-” quando está ausente.

Parent & Pagé (1995) propuseram uma chave dicotômica para identificar treze cultivares de morango do programa de certificação do Estado de Quebec, Canada, com resultados obtidos da análise de RAPD. Os autores montaram a chave dicotômica baseando-se em dez “marcadores” pertencentes a dois “primers”. Neste trabalho, baseando-se nos mesmos “marcadores” utilizadas no quadro de identificação, construímos uma chave dicotômica para a identificação das vinte e seis cultivares analisadas (Figura 2). Alguns “marcadores” se destacaram nesta chave dicotômica,

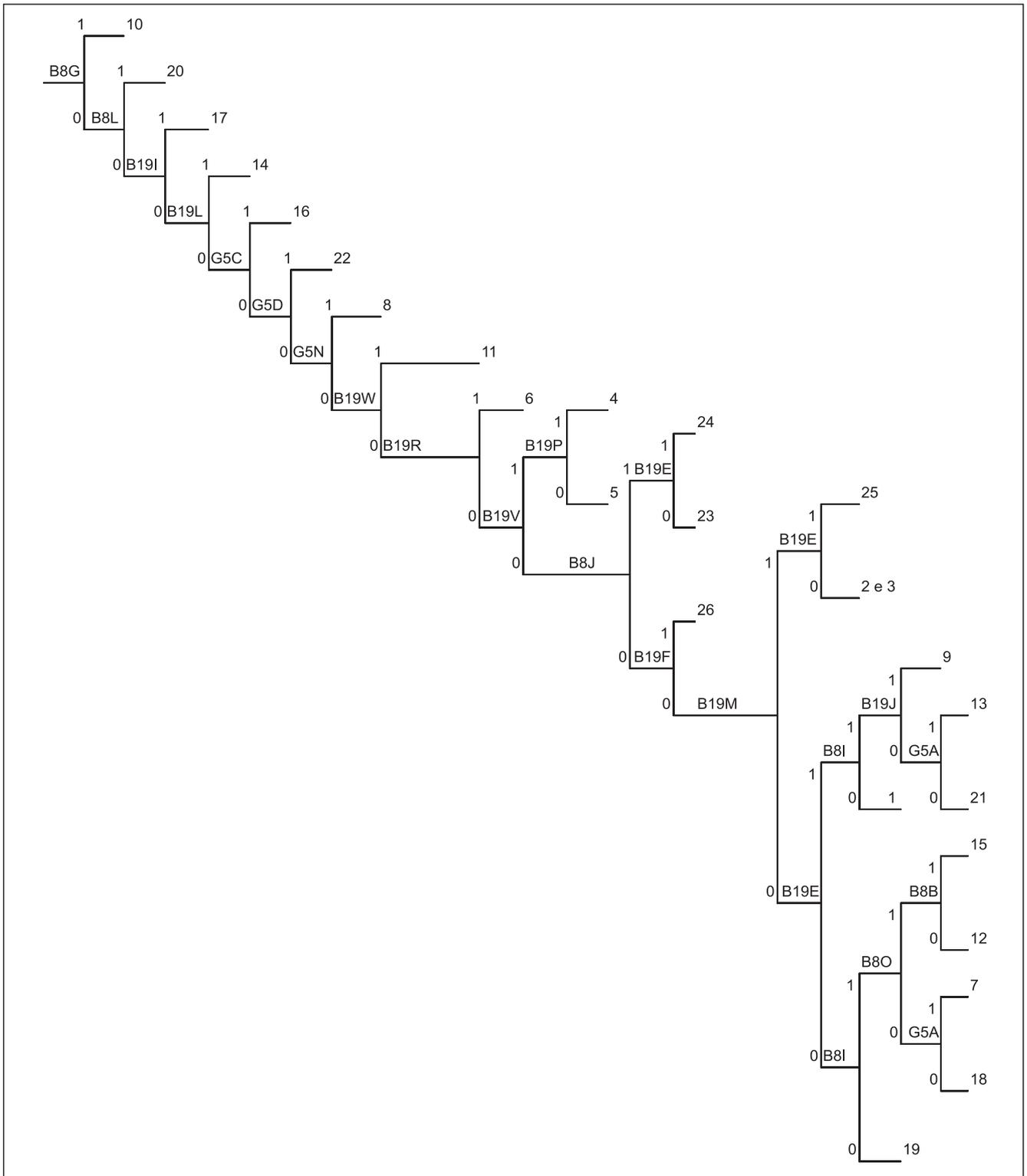


Figura 2. Chave dicotômica de identificação das cultivares expressos pelos números inteiros de 1 a 26. O número “1” indica a presença da banda e o número “0” a ausência. As denominações com letras intercaladas de números são os “marcadores”. Piracicaba, ESALQ, 1999.

pela importância na separação de cultivares. A banda do “marcador” B19M separa as cultivares Blackmore, Campinas e Agf 80 das demais, quando presente. A banda do “marcador” B19E, se presente, separa as cultivares Lassen, Dover, Reiko

e Oso Grande de Mantiqueira, Obaira, Jundiaí, Fern e Selva e, o mesmo “marcador” também separa Chandler de Pajaro e Blackmore de Campinas e Agf80. Outro “marcador” que se destaca é o B8O pois a presença da banda separa as cultiva-

res Mantiqueira e Obaira de Jundiaí e Fern.

A caracterização de cultivares pode se basear nas diferenças de morfologia ou em diferenças nas moléculas de proteínas ou DNA. Esta última, denominada molecular, quando utiliza o DNA,

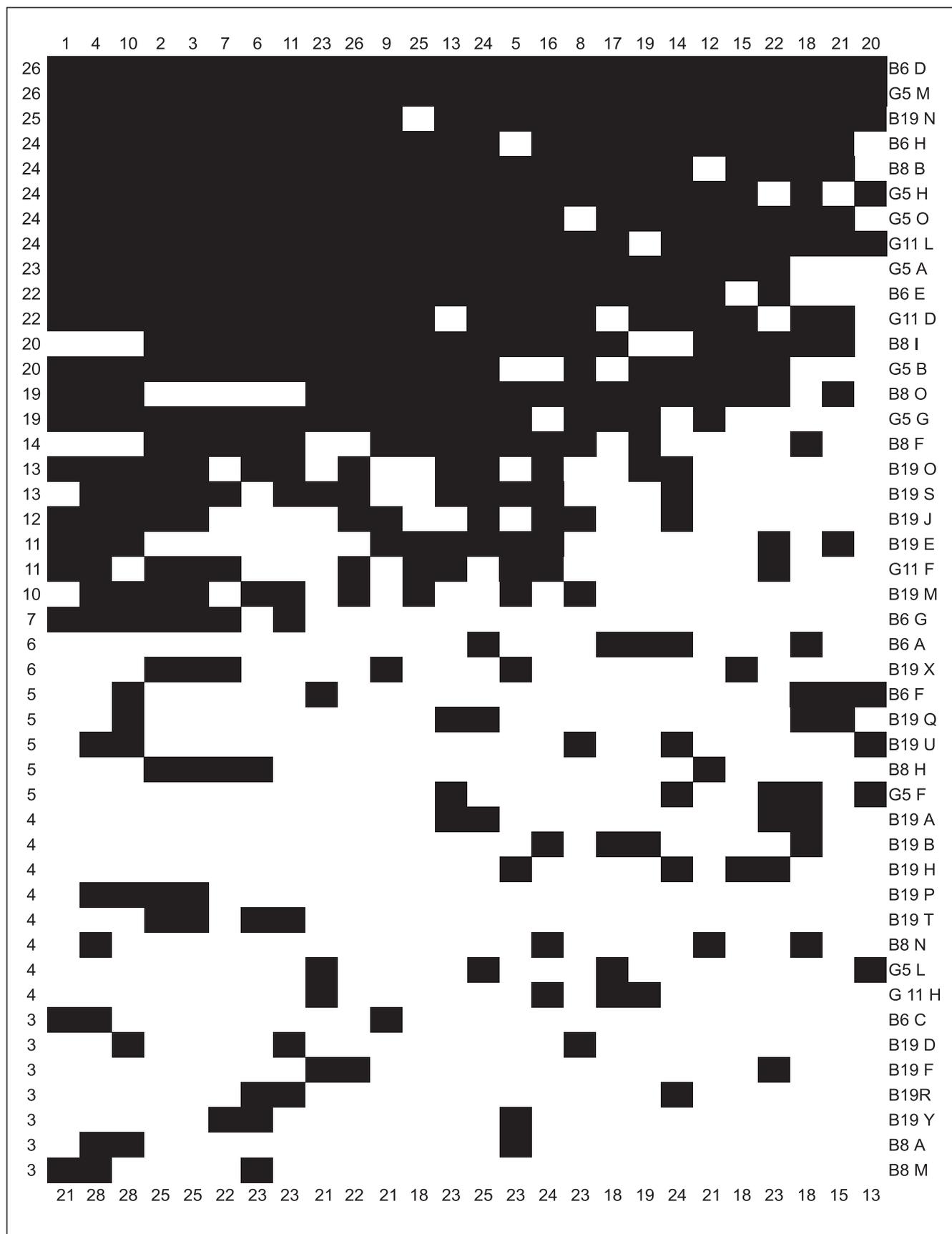


Figura 3. Mapa de bandas obtido com os dados de RAPD nas 26 cultivares com o índice de Jaccard. Os números acima do mapa indicam as cultivares, abaixo a quantidade de bandas da cultivar, na margem esquerda o número de bandas de cada “marcador” e na margem direita a denominação do “marcador”. Piracicaba, ESALQ, 1999.

justifica o uso da técnica de microsatélite e AFLP em espécies com elevado nível de diversidade genética, detectável por outros métodos. A *Fragaria X ananassa* é uma dessas espécies, como ficou comprovado neste trabalho pela diversidade genética apresentada no dendograma. Por estas razões e pelos resultados obtidos através da análise de RAPD, que forneceu “marcadores” polimórficos para a identificação e formação de grupos de afinidade, esta técnica pode ser considerada a mais viável para a caracterização de cultivares de morango. Neste trabalho as cultivares Dabreak, Korona, Florida Belle, Dr Morère, Sequoia e Toyonoka apresentaram um “marcador” específico, demonstrando como “marcadores” RAPD podem ser aplicados com o propósito de discriminação.

Entre os mecanismos utilizados para ajudar a interpretar os resultados obtidos com marcadores de RAPD, verificamos que o dendograma é interessante para podermos propor o grau de similaridade entre as cultivares e a formação de grupos de cultivares semelhantes. O mapa de bandas é interessante quando se quer detectar quais os marcadores que ajudam na identificação destes grupos. O quadro de identificação pode ser utilizado quando o propósito é a identificação de cultivares, pois ele dá a disposição das bandas dos “marcadores” que realmente identificam as cultivares. A chave dicotômica tem a mesma função de uma chave dicotômica com base em dados morfológicos, ou seja, identificar cultivares com o mínimo de marcas possíveis e necessárias.

Passos (1982) verificou que havia ampla variabilidade entre as cultivares estudadas em seu trabalho e comentou que provavelmente grande parte era de origem genética. Neste trabalho foi demonstrado, pelos valores de similaridade obtidos nas análises moleculares, que há variabilidade entre as cultivares e, por estas análises terem como base o DNA, estas diferenças são de origem genética. Neste trabalho foram utilizados materiais com origem de programas de melhoramento de diversos países e o resultado não foi uma diversidade genética estreita como propunham Scott & Lawrence (1975) e Sjulín & Dale (1987). Esta maior diversidade genética pode ser consequência do fato do

moranguero, segundo Camargo & Passos (1993), ter uma estrutura genética altamente heterozigota, devido aos vários níveis de ploidia e a origem híbrida da maioria das espécies, condição esta mantida pelo sistema de propagação vegetativa do moranguero cultivado.

Estes resultados indicam que o moranguero cultivado atualmente, apresenta diversidade genética, o que pode ser útil em programas de melhoramento e que, com o método de RAPD utilizando-se o dendograma e o mapa de bandas, é possível fazer inferências quanto a similaridade entre cultivares. Também é possível, utilizando-se do quadro de identificação e da chave dicotômica, identificar cultivares. No entanto, é interessante que trabalhos posteriores, com um número maior de “primers”, determinem a absoluta especificidade dos “marcadores” para cada cultivar e uma análise mais abrangente e precisa do germoplasma do moranguero cultivado e selvagem.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado graças ao apoio da FAPESP, processo 96/1606-2, do CNPq e dos Departamentos de Horticultura e Genética da ESALQ/USP.

LITERATURA CITADA

BRINGHURST, R.S.; ARULSEKAR, S.; HANCOCK, J.F.; VOTH, V. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 106, n. 5, p. 684-687, 1981.

CAMARGO, L.S.; PASSOS, F.A. Morango. In: FURLANI, A.M.C.; VIEGAS, G.P. (Ed.) *O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo*. Campinas: Instituto Agrônomo, 1993, v. 1, cap. 11, p. 411-432.

ESTADOS UNIDOS. Regents of the University of California. Variety: ‘Seascape’ syn CN 49. Application n: 90/082. *Plant Varieties Journal*, v. 9, n. 4, p. 42, 1996a. /Resumo em *CAB Abstracts on CD-ROM*, 1996-4/98/

ESTADOS UNIDOS. Regents of the University of California. Variety: ‘Oso Grande’ syn C 43. Application n: 89/071. *Plant Varieties Journal*, v. 9, n. 4, p. 42, 1996b. /Resumo em *CAB Abstracts on CD-ROM*, 1996-4/98/

FAEDI, W.; ARCUTI, P.; LOVATTI, L.; RECUPERO, S.; TURCI, P. *Monografia di cultivar di fragola*. Roma: Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, 1988. 36 p. (ISF, publicações, 296).

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em aná-*

lise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. p. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).

GIDONI, D.; ROM, M.; KUNIK, T.; ZUR, M.; IZSAK, E.; IZHAR, S.; FIRON, N. Strawberry-cultivar identification using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Plant Breeding*, v. 113, n. 4, p. 339-342, 1994.

GRAHAM, J.; McNICOL, R.J.; McNICOL, J.W. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, n. 3 p. 402-406, 1996.

HOWARD, C.M.; ALBREGTS, E.E. ‘Florida Belle’ Strawberry. *HortScience*, v. 11, n. 5, p. 519-520, 1976.

HOWARD, C.M.; ALBREGTS, E.E. ‘Dover’ Strawberry. *HortScience*, v. 15, n. 4, p. 540, 1980.

LEVI, A.; ROWLAND, L.J.; HARTUNG, J.S. Production of Reliable Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers from DNA of Woody Plants. *HortScience*, v. 28, n. 12, p. 1188-1190, 1993.

NEHRA, N.S.; KARTHA, K.K.; STUSHNOFF, C. Nuclear DNA content and isozyme variation in relation to morphogenic potential of strawberry (*Fragaria X ananassa*) callus cultures. *Canadian Journal of Botany*, v. 69, n. 2, p. 239-244, 1991.

PARENT, J.G.; PAGÉ, D. Authentification des 13 cultivars de fraiser du programme de certification du Québec par l’analyse d’ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD). *Canadian Journal of Plant Science*, v. 75, n. 1, p. 221-224, 1995.

PASSOS, F.A. Caracterização de clones nacionais e introduzidos de moranguero (*Fragaria X ananassa* Duch.), visando o uso imediato na horticultura e o melhoramento genético. Piracicaba, 1982. 116 p. (Dissertação mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP.

PASSOS, F.A.; GRIDI-PAPP, I.L.; CAMARGO, C.E.O.; CHIAVEGATO, E.J.; DALL’ORTO, F.A.C.; NAGAI, H.; GODOY, I.J.; FAZUOLI, L.C.; VEIGA, R.F.A. *Descritores mínimos para o registro institucional de cultivares: MORANGO*. Campinas: IAC, 1994. 8 p. (IAC Documentos, 40).

POWELL, W.; PHILLIPS, M.S.; McNICOL, J.W.; WAUGH, R. The use of DNA markers to estimate the extent and nature of genetic variability in *Solanum tuberosum* cultivar. *Annals of Applied Biology*, v. 118, n. 2, p. 423-432, 1991.

ROHLF, F.J. *NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.7*. Setanket, N.Y.: Exeter Software Publisher, 1992.

SANTOS, J.B. Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 2, p. 282-286, 1994.

SCHAFFER, H.E.; SEDEROFF, R.R. Least squares fit of fragment size to gel mobility. *Analytical Biochemistry*, v. 115, p. 113-122, 1981.

SCOTT, D.H.; LAWRENCE, F.J. Strawberries. In: JANICK, J. & MOORE, N.M. *Advances in fruit breeding*. Indiana: Purdue University Press. 1975. p. 71-92.

SJULIN, T.; DALE, A. Genetic diversity of North American strawberry cultivar. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 112, n. 2, p. 375-385, 1987.

THOMAS, H.E.; GOLDSMITH, E.V. *The Shasta, Sierra, Lassen, Tahoe and Donner strawberries*. Berkeley: University of California, 1945. 90 p. (University of California. Bulletin, 690).

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