

**ANÁLISE DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA E
FINGERPRINT EM CULTIVARES DE
MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duch)
USANDO MARCADORES RAPD E SSR**

CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS

2005

CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS

ANÁLISE DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA E *FINGERPRINT* EM
CULTIVARES DE MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* Duch)
USANDO MARCADORES RAPD E SSR

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado em
Agronomia, área de concentração em Fisiologia
Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

 LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Cíntia Guimarães dos

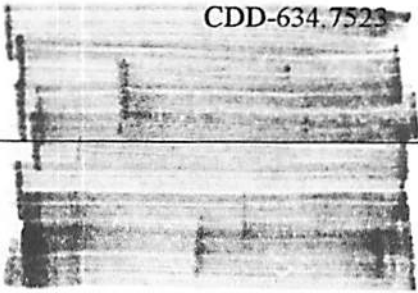
Análise de divergência genética e fingerprint em cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) usando marcadores RAPD e SSR / Cíntia Guimarães dos Santos. -- Lavras : UFLA, 2005.

57 p. : il.

Orientador: Renato Paiva
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

I. Morango. 2. Diversidade genética. 3. Marcador molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.7523



CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS

**ANÁLISE DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA E *FINGERPRINT* EM
CULTIVARES DE MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* Duch) USANDO
MARCADORES RAPD E SSR**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Doutorado em Agronomia, área
de concentração em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de “Doutor”

APROVADA EM 29 DE JULHO DE 2005

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Edilson Paiva	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA



Prof Renato Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À memória dos meus avós paternos João e Angélica e maternos René e Veneranda

Exemplos de vida.

HOMENAGEM

Aos meus pais, Márcio e Vera,
pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao CNPq, pela minha formação acadêmica e concessão da bolsa de estudos.

Ao programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo e ao Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela infraestrutura disponibilizada para a execução dos trabalhos.

À empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda, nas pessoas do Dr. Marcos Paiva e Dr. Márcio de Assis, pela parceria e fornecimento dos cultivares de morangueiro.

Ao professor, orientador e amigo Dr. Renato Paiva, pela confiança em mim depositada, ensinamentos, incentivo na minha formação profissional e exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao Dr. Edilson Paiva, pelo apoio dado durante toda a minha vida acadêmica, desde a especialização até o doutorado, além da confiança e da oportunidade de compartilhar da sua experiência.

A Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, pelas valiosas colaborações, sugestões e ensinamentos constantes, dando uma grande contribuição para a elaboração deste trabalho.

Aos professores da Fisiologia Vegetal: Luiz Edson, Donizeti, Ângela e Amauri que, de forma ampla e irrestrita, compartilharam dos seus conhecimentos.

Aos pesquisadores do NBA da Embrapa Milho e Sorgo, pela calorosa recepção e alegre convivência. A Dra. Lilian Padilha, pelas orientações nas análises estatísticas.

Aos colegas do NBA: Lili, Silvia, Flávia, Bira, Nati, Mariana, Grazielle, Edna, Miguel, Raimundo, Célio, Caroline, Fernanda, Rose, Edimilson, Denise, Jaciara, Martinele, Ivana, Wanderson pela agradável convivência e bons momentos vivenciados, tornando melhores todas as etapas desse trabalho.

A Miguel e Bira, pela colaboração, ensinamento e apoio durante os experimentos de laboratório e ao Wanderson pela grande contribuição nas confecções dos géis.

Aos funcionários da UFLA, Izonel, Lena, Odorêncio, Joel, Evaristo e Tanhan pela agradável convivência durante todos esses anos. E, principalmente, ao Izonel, sempre pronto para ajudar nos assuntos burocráticas.

Aos colegas da Fisiologia Vegetal, Andrea, Paulo, Rairys, Cristiano, Patrícia Lígia, Grécia, Aurélio, Cristina, Teresa, Daniela, João Peterson, Soami e Breno, pelos bons e maus momentos vivenciados juntos.

Ao Hugo por querer fazer de mim uma pessoa melhor.

Aos meus sobrinhos, Gustavo, Guilherme, Izadora, Iuri e Ingrid, meus constantes momentos de alegria.

Aos meus irmãos, Marcelo e Patricia e familiares que me incentivam em todos os momentos.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

CINTIA GUIMARÃES DOS SANTOS, filha de Márcio Vicente da Silveira Santos e Vera Lúcia Guimarães dos Santos. Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa em 1992, concluindo-o em setembro de 1996. Após a conclusão da graduação, especializou-se na área de Biologia Aplicada, na Embrapa Milho e Sorgo, sob orientação do Dr. Edilson Paiva, concluindo-o em 1999. Iniciou o curso de Mestrado, em Agronomia - Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras em 1999, sob orientação do Prof. Renato Paiva, concluindo-o em 2001. Após a conclusão do curso de mestrado prestou auxílio técnico no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do setor Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, com o auxílio de bolsa BAT, fornecida pela FAPEMIG. Iniciou o curso de doutorado em 2002, sob orientação do Prof. Renato Paiva, na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em 2005.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO	02
2.1. Importância econômica do morangueiro	02
2.2. Morangueiro: descrição botânica, produção de matrizes e cultivares comercializados em Minas Gerais	03
2.3. Métodos utilizados para identificação de cultivares de morangueiro e estudo da diversidade genética	07
2.4. Marcadores RAPD	10
2.5. Marcadores SSR	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Cultivares de morangueiro estudados	14
3.2. Extração e quantificação do DNA	15
3.3. Marcadores RAPD	16
3.4. Marcadores SSR fluorescentes	16
3.5. Avaliação dos dados moleculares	17
3.6. Identificação genética de 10 genótipos desconhecidos de morangueiro	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Estudo da divergência genética entre cultivares de morangueiro	20
4.2. Identificação de cultivares de morangueiro	36
4.3. Identificação genética de 10 genótipos desconhecidos de morangueiro	42
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7. ANEXOS	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Matrizes de morangueiro produzidas pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda (Andradas, MG)	14
TABELA 2. <i>Primers</i> RAPD, suas respectivas seqüências de bases, PIC (<i>Polymorphic Index Content</i>) e número de bandas polimórficas obtidas em oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	20
TABELA 3. Matriz de distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro utilizando marcadores RAPD. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005 ...	25
TABELA 4. <i>Primers</i> SSR com seus respectivos valores de PIC (<i>Polymorphic Index Content</i>), número de alelos polimórficos e faixa de tamanho dos alelos Obtidos em oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	29
TABELA 5. Matriz de distâncias genéticas, utilizando <i>primers</i> SSR, entre oito cultivares de morangueiro analisados dois a dois. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	31
TABELA 6. Matriz de distâncias genéticas, utilizando marcadores RAPD e SSR agrupados, entre oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	34
TABELA 7. Possíveis combinações de dois <i>primers</i> RAPD utilizados para identificar oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005 ...	36

TABELA 8. Possíveis combinações de dois <i>primers</i> SSR utilizados para identificar oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005 ...	39
TABELA 9. Interpretação do padrão molecular obtido com <i>primers</i> RAPD, por meio de 0 e 1, entre os oito cultivares de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	43
TABELA 10. Interpretação do padrão molecular obtido com <i>primers</i> RAPD, por meio de 0 e 1, entre 10 genótipos desconhecidos de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	44
TABELA 11. Interpretação do padrão molecular obtido com <i>primers</i> SSR, por meio de 0 e 1, entre os oito cultivares de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	46
TABELA 12. Interpretação do padrão molecular obtido com <i>primers</i> SSR, por meio de 0 e 1, entre 10 genótipos desconhecidos de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Padrões de amplificação obtidos com o <i>primer</i> OPG05, em gel de agarose 1,2 %	23
FIGURA 2. Análise do número mínimo de marcadores RAPD para a estimativa das distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro, utilizando números crescentes de bandas polimórficas	24
FIGURA 3. Dendrograma representando as distâncias genéticas obtidas com base em marcadores RAPD, entre os cultivares de morangueiro, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de <i>bootstrap</i>	26
FIGURA 4. Padrões de amplificação obtidos em oito cultivares de morangueiro, utilizando os <i>primers</i> MOR1 (amarelo), MOR5 (azul) e EMFv10 (verde), em gel de poliacrilamida 5 % desnaturante	27
FIGURA 5. Padrões moleculares obtidos em oito cultivares de morangueiro, utilizando os <i>primers</i> MOR2 e MOR7, em gel de poliacrilamida 5 % desnaturante	28
FIGURA 6. Análise do número mínimo de marcadores SSR para a estimativa das distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro, utilizando números crescentes de bandas polimórficas	30
FIGURA 7. Dendrograma representando as distâncias genéticas obtidas com base em marcadores SSR, entre oito cultivares de morangueiro, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de <i>bootstrap</i>	32
FIGURA 8. Análise do número mínimo de marcadores RAPD e SSR agrupados, para a estimativa das distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro, utilizando números crescentes de bandas polimórficas ..	33

FIGURA 9. Dendrograma das distâncias genéticas, utilizando os marcadores RAPD e SSR agrupados, entre oito cultivares de morangueiro, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de <i>bootstrap</i>	35
FIGURA 10. Fluxograma para identificação dos oito cultivares de morangueiro em estudo, utilizando marcadores RAPD	37
FIGURA 11. Padrões de amplificação obtidos pelos <i>primers</i> OPJ10 e OPB19, em gel de agarose 1,2 %	38
FIGURA 12. Fluxograma para identificação dos oito cultivares de morangueiro em estudo, utilizando marcadores SSR	40
FIGURA 13. Padrões de amplificação obtidos utilizando o <i>primer</i> MOR3 e MOR8, em gel de poliacrilamida 5 % desnaturante	40
FIGURA 14. Padrões de amplificação obtidos com o <i>primer</i> OPG10, em gel de agarose 1,2 %	41
FIGURA 15. Padrões de amplificação obtidos com o <i>primer</i> OPG18, em gel de agarose 1,2 %	42
FIGURA 16. Padrões de amplificação obtidos com os <i>primers</i> MOR3 (azul) e MOR8 (verde) em 10 genótipos desconhecidos de morangueiro, gel de poliacrilamida 5 % desnaturante	45

RESUMO

SANTOS, C. G. **Análise de divergência genética e *fingerprint* em cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) usando marcadores RAPD e SSR.** 2005. 58p. (Tese de Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG¹.

A introdução de novos cultivares de morangueiro, visando resistência a doenças e adaptação climática, vem sendo uma das estratégias adotadas para o aumento da produtividade da cultura. Para isso, há uma necessidade premente de desenvolver métodos confiáveis que possam identificar corretamente esses cultivares e avaliar a diversidade genética do germoplasma existente. Tradicionalmente têm sido utilizado descritores morfológicos para a caracterização de cultivares, no entanto, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de buscar outras alternativas. Os avanços nas técnicas moleculares têm possibilitado o estudo da variabilidade genética a nível de DNA, aumentando significativamente a precisão na avaliação da diversidade genética e na identificação de cultivares. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da divergência genética e a identificação de cultivares de morangueiro, utilizando marcadores RAPD e SSR. Foram avaliados oito cultivares comercializados no Estado de Minas Gerais pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda: ‘Camarosa’, ‘Campinas (IAC 2712)’, ‘Dover’, ‘Oso Grande’, ‘Seascape’, ‘Sweet Charlie’, ‘Toyonoka’ e ‘Tudla’ (Milsei). Dos 160 *primers* RAPD e 10 *primers* SSR testados, 63 e 7, respectivamente, foram selecionados, com base na quantidade e qualidade dos polimorfismos obtidos entre os cultivares. Os 63 *primers* RAPD geraram 231 bandas polimórficas e os 7 *primers* SSR geraram 36, que foram suficientes para uma adequada avaliação da divergência genética entre os cultivares. Para análise de diversidade genética três dendogramas foram gerados, um com os dados moleculares RAPD, outro com dados moleculares SSR e o terceiro com ambos em conjunto. Observou-se que os cultivares originários da Califórnia (‘Camarosa’, ‘Oso Grande’ e ‘Seascape’) agruparam-se a uma distância genética de 46, 48 e 40 %, segundo os três dendogramas, respectivamente. Os cultivares originários da Flórida (‘Dover’ e ‘Sweet Charlie’) foram agrupados a 60 % de distância genética utilizando os marcadores SSR e a 49 % utilizando ambos os marcadores em conjunto. Tais resultados indicam que a divergência genética foi coerente com o local de origem dos cultivares de morangueiro. Para a identificação do morangueiro, vários conjuntos de dois *primers* RAPD ou SSR mostram-se eficientes para identificar os oito cultivares avaliados neste estudo.

Comitê de Orientação: Orientador: Prof. Renato Paiva – UFLA; Co-orientadores: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo; Luciano Vilela Paiva – UFLA

ABSTRACT

SANTOS, C. G. Genetic divergence analysis and fingerprint of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivars using RAPD and SSR markers. 2005. 58p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG¹.

The introduction of new strawberry cultivars to improve resistance to diseases and climatic adaptations has been used as a strategy to increase crop productivity. Therefore, there is a huge need to develop reliable methods that can identify these cultivars and evaluate the genetic diversity of the existing germplasm. Morphological descriptors have been used to characterize cultivars but their limitation has induced a search for alternatives. Advances in molecular biology techniques have enabled the study of genetic variability at DNA level increasing significantly the precision in the evaluation of the genetic diversity and cultivar identification. The objective of this work was to evaluate the genetic divergence and identify strawberry cultivars, using RAPD and SSR molecular markers. Eight cultivars commercialized in the state of Minas Gerais by Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda were evaluated: 'Camarosa', 'Campinas (IAC 2712)', 'Dover', 'Oso Grande', 'Seascape', 'Sweet Charlie', 'Toyonoka' and 'Tudla (Milsei)'. From the total of 160 RAPD and 10 SSR tested primers, 63 and 7, respectively, were chosen based in the amount and quality of the polymorphisms obtained among the cultivars. The 63 RAPD primers led to 231 polymorphic bands and the 7 SSR primers produced 36 that were sufficient to an adequate evaluation of the genetic divergence among the cultivars. For the analysis of the genetic diversity three dendrograms were generated, one with the molecular data obtained using RAPD primers, other with the SSR molecular data and a third with both data. It was observed that the cultivars from California ('Camarosa', 'Oso Grande' and 'Seascape') grouped at genetic distance of 46, 48 and 40% according to the three dendrograms, respectively. The cultivars from Florida ('Dover' and 'Sweet Charlie') grouped at 60% of the genetic distance using the SSR molecular marker data and at 49% using both SSR and RAPD. These results indicated that the genetic divergence was coherent with the origin of the strawberry cultivars. Several sets of two RAPD or SSR primers were efficient to identify the eight cultivars evaluated in this study.

Guidance Committee: Adviser: Prof. Renato Paiva – UFPA; Co-Advisers: Edilson Parva – Embrapa Milho e Sorgo; Luciano Vilela Paiva - UFPA

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de morangos se expande a cada ano, predominando o cultivo em pequenas propriedades rurais, com mão-de-obra familiar, mercado garantido e excelente fonte de renda para o produtor.

Dentre os fatores que comprometem a sua produção estão a presença de doenças e a sensibilidade às variações climáticas. Uma das estratégias de manejo adotada para proporcionar sustentabilidade a essa cultura é a introdução de genótipos que apresentem resistência a pragas e doenças e que sejam adaptados às diferentes regiões produtoras. Com isso, novos cultivares de morangueiro são lançados no mercado, sem serem devidamente caracterizados. Para evitar que cultivares geneticamente semelhantes sejam comercializados com denominações diferentes, faz-se necessário uma caracterização detalhada dos cultivares comercializados, auxiliando assim toda a cadeia produtiva do morangueiro. Além disso, as informações existentes sobre a diversidade genética do germoplasma do morangueiro comercial são pouco elucidadas, tornando-se importante uma avaliação prévia dessa diversidade. Em programa de melhoramento, o conhecimento da diversidade genética entre os genótipos permite a organização da variabilidade desses materiais, auxiliando assim a seleção de progenitores e potencializando a obtenção dos ganhos genéticos.

Dentre as várias aplicações atribuídas aos marcadores moleculares, pode ser destacado seu uso na diferenciação e/ou identificação de cultivares e nos estudos da diversidade genética. Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) apresentam como vantagem a capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido; já os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat* ou *Microssatélites*) apresentam alta reprodutibilidade, são bem distribuídos dentro do genoma e possuem elevada informatividade genética. Este trabalho teve por objetivo identificar e avaliar a divergência genética entre oito

cultivares de morangueiro comercializados em Minas Gerais, cujas matrizes foram cedidas pela empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda (Andradas, MG): ‘Camarosa’, ‘Campinas (IAC 2712)’, ‘Dover’, ‘Oso Grande’, ‘Seascape’, ‘Sweet Charlie’, ‘Toyonoka’, ‘Tudla (Milsei)’, utilizando marcadores RAPD e SSR.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância econômica do morangueiro

A cultura do morangueiro apresentou grande expansão no Brasil depois da década de 60, graças à introdução do cultivar Campinas (Passos, 1997) e as novas técnicas de cultivo, que passaram a fazer parte da rotina dos produtores de morango. A partir daí, a utilização de novos cultivares, com característica de menor sensibilidade ao fotoperíodo e às temperaturas baixas para frutificação e com maior durabilidade pós-colheita, fez com que o cultivo se popularizasse (Marin et al., 1999).

A área cultivada no Brasil é estimada em 3.500 hectares, sendo que o tamanho médio da maior parte das propriedades é de 0,5 a 1 ha, gerando uma taxa de três empregos/ha/ano. Tais dados caracterizam essa cultura como própria da agricultura familiar (Pagot & Hoffmann, 2003). A produção atual em torno de 90.000 t/ano coloca o país em posição de destaque entre os principais produtores mundiais, embora ainda distante dos Estados Unidos da América que lideram com mais de 7000.000 t (Reichert, 2003).

O morangueiro é cultivado em quase todas regiões do território brasileiro, como Sul, Sudeste, Nordeste e Centro Oeste, principalmente em função da sua elevada rentabilidade (Duarte Filho et al., 1999; Vieira, 2001), no entanto sua produção concentra-se principalmente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Segundo dados da Embrapa Clima Temperado

(<http://www.cpact.embrapa.br>, dez 2004) o Estado de Minas Gerais gera uma produção anual de cerca de 30 mil toneladas, equivalente a mais de R\$ 23 milhões por safra. O Estado de São Paulo produz 29 mil toneladas e o Rio Grande do Sul com 11 mil toneladas. Esses três Estados, juntos, são responsáveis por mais de 80 % da produção nacional.

Em Minas Gerais, o morangueiro é cultivado principalmente em áreas de meia encosta ou em áreas de maior altitude como os planaltos serranos do Sul do Estado, ou ainda na região da serra da Mantiqueira, na Zona da Mata (Botelho, 1999).

2.2. Morangueiro: descrição botânica, produção de matrizes e cultivares comercializados em Minas Gerais

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma espécie octaplóide ($2n=8x=56$), originária da hibridização entre duas espécies americanas ($x = 7$, $2n = 56$), *Fragaria chiloensis* (L.) Duch e *F. virigiana* Duch (Hancock et al., 1996). Pertencem à família Rosaceae, gênero *Fragaria* (Queiroz-Voltan et al., 1996), é uma planta rasteira, propagada vegetativamente por estolhos. De acordo com Groppo et al. (1997), os estolhos possuem internódios maiores, nos quais se desenvolvem as raízes e folhas. As flores, de pétalas brancas, se reúnem em inflorescências do tipo racimo, completas e auto-férteis, nos cultivares comerciais. O sistema radicular é fasciculado e superficial e a parte central da planta, denominada coroa, é formada por entre-nós bem curtos e circundada pelas folhas que, segundo Lemaitre & Linden (1968), se dispõem aos pares ao longo do tufo principal e são constituídas de um pecíolo longo com três folíolos, um mediano e dois laterais, sendo o mediano simétrico, maior e regular e os laterais assimétricos. O morango é um pseudofruto originário do desenvolvimento do receptáculo da inflorescência. Segundo Camargo (1963), a parte comestível, carnosa e suculenta do morango é um receptáculo dos

verdadeiros frutos que são os aquênios, pequeninos, duros e superficiais. Entretanto, para fins comerciais, denomina-se fruto ao conjunto do receptáculo carnoso mais os aquênios.

Sendo uma espécie de propagação vegetativa, favorece muito a disseminação de parasitas, como vírus, bactérias, nematóides e fungos, o que resulta na diminuição do seu vigor e produtividade. A utilização de mudas sadias pode minimizar consideravelmente as perdas por doenças, além da economia com defensivos e redução do impacto ambiental.

Para fins comerciais ou para uso próprio, o produtor de mudas tem duas possibilidades de obtenção de matrizes: a) produzir as suas próprias matrizes em telado ou estufa, a partir de plantas básicas sadias ou b) adquirir matrizes de laboratório que são produzidas *in vitro*. A propagação *in vitro* possibilita a eliminação de viroses, por meio da cultura de meristemas, permitindo, assim, a obtenção de mudas livres de vírus, mesmo utilizando matrizes contaminadas (Minami, 1991). Portanto, a propagação *in vitro* de morangueiros tornou-se uma prática eficaz para a produção em larga escala de plantas com sanidade controlada (Boxus et al., 1977). Atualmente grande parte das mudas de morangueiro produzidas no Brasil resulta de matrizes produzidas *in vitro* (Betti, 2000).

No Estado de Minas Gerais, os cultivares mais comercializados são: ‘Camarosa’ - Originado na Universidade da Califórnia, Estados Unidos, em 1988, como resultado do cruzamento entre ‘Douglas’ e o clone ‘Cal 85.218-605’ (Degani et al., 2001). Esse cultivar é selecionado para consumo *in natura* utilizado para mesa. Os frutos são resistentes ao transporte, grandes, formato cônico-achatado, coloração interna vermelho intenso, polpa de textura firme, sabor doce e aroma agradável. É sensível a fungos de solo, mancha de micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), antracnose (*Colletotrichum fragariae* e

Colletotrichum acutatum) e ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*). E tolerante ao oídio (*Sphaeroteca macularis*) e a viroses (Daubeny, 1994).

‘Campinas (IAC 2712)’ - Desenvolvido em 1955 pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, Brasil, como resultado do cruzamento entre os cultivares norte-americanos ‘Donner’ e ‘Tahoe’ (Camargo, 1960). O fruto apresenta-se doce, com formato cônico-alongado, coloração vermelho-rosado, brilhante externamente e rosa internamente, sendo selecionado para consumo *in natura*. Susceptível à murcha de verticillium (*Verticillium alboatrum*), rizoctoniose (*Rhizoctonia*), antracnose (*Colletotrichum* sp.). É tolerante a mancha de diplocarpon (*Diplocarpon earlianum*), oídio (*Sphaeroteca macularis*), mancha angular (*Xanthomonas fragariae*). Proporcionou um salto na produtividade e qualidade dos morangos produzidos no país. (Camargo & Passos, 1993).

‘Dover’ - Desenvolvido na Universidade da Flórida, Estados Unidos, este cultivar foi selecionado para a característica de resistência a antracnose nas condições da Flórida, resultado do cruzamento realizado em 1973 entre o cultivar ‘Florida Belle’ e o clone ‘Fla 71-189’ (Howard & Albregts, 1980). Este clone é resultado do seguinte cruzamento: ‘69-130’ (‘Florida 90’ x ‘Tioga’) e ‘Tioga’. Frutos firmes com boa conservação pós-colheita, sendo adequado para mercados distantes das áreas de produção. Porém, apresentam sabor ácido, sendo selecionado para indústria. É tolerante a fungos de solo. No Brasil, diversas introduções desse cultivar ocorreram a partir da década de 90 e hoje é considerado o segundo cultivar mais plantado do Brasil (Passos, 1999).

‘Oso Grande’ - Desenvolvido na Universidade da Califórnia, Estados Unidos, em 1987, resultado do cruzamento entre os cultivares ‘Parker’ e o clone ‘Cal. 77.3-603’ (‘Tioga’ x ‘Pajaro’) (USA, Regents of the University of California, 1996). Os frutos são grandes com formato cônico e coloração vermelho-brilhante externamente e mais clara internamente e resistente ao transporte.

Cultivar de sabor doce selecionado para consumo *in natura* ou congelado. É sensível a fungos de solo, suscetível à mancha de micoserela (*Mycosphaerella fragariae*) e antracnose (*Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum acutatum*). É tolerante ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e a viroses (Daubeny, 1994).

‘Seascape’ – Desenvolvido na Universidade da Califórnia, Estados Unidos em 1991, resultado do cruzamento entre os cultivares ‘Selva’ e ‘Douglas’ (USA, Regents of the University of California, 1996). Esse cultivar, selecionado para o consumo *in natura*, apresenta frutos grandes e firmes, com coloração vermelha externa e interna, sendo sensível a fungos do solo. Seu cultivo é mais indicado para regiões serranas do sul do Brasil, durante o cultivo de verão (Gusmão, 2000).

‘Sweet Charlie’ – Originário da Universidade da Florida, Estados Unidos, em 1994, resultado do cruzamento entre o clone ‘FL 80-456’ e ‘Pajaro’. Apresenta frutos grandes com formato cônico, coloração vermelho-alaranjada externamente e alaranjado internamente, moderadamente firmes e sabor doce. É utilizado para consumo *in natura* e tolerante à antracnose (Daubeny, 1995).

‘Toyonoka’ – Desenvolvido no Japão, em 1975, resultado do cruzamento entre os cultivares ‘Himiko’ e ‘Harunoka’ (Sakai, 1984). Planta adaptada a regiões quentes, com frutos grandes, firmes, formato globular e sabor doce. É suscetível a oídio (*Sphaeroteca macularis*) e à fusariose (Daubeny, 1995).

‘Tudla (Milsei)’ – Origem na Tudela, Espanha, em 1992, como resultado do cruzamento entre ‘Parker’ e ‘Chandler’. Cultivar utilizado para consumo *in natura*, apresentando frutos grandes, de formato cônico, coloração vermelho-brilhante e polpa de textura firme. Tolerante ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), susceptível a mancha de micoserela (*Mycosphaerella fragariae*) e a antracnose (*Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum*) e sensível aos fungos do solo.

2.3. Métodos utilizados para identificação de cultivares de morangueiro e estudo da diversidade genética

A identificação de cultivares tem sido utilizada com os propósitos de detectar rotulagens incorretas de cultivares comercializados (Kunihisa et al., 2003) e de proteção de cultivares (Rajapakse et al., 1992; Staub & Meglic, 1993).

Como é freqüente a introdução de novos cultivares de morangueiro pelos produtores visando superar as doenças que afetam a cultura e sejam adaptados as diferentes condições climáticas, existe hoje um grande número de cultivares introduzidos no mercado. A comercialização desses cultivares, que não são devidamente caracterizados, é baseado numa estreita relação de confiança entre o produtor, o vendedor de mudas e seus clientes (Gomes, 2002). Devido a isso, torna-se importante estabelecer uma identificação prévia das matrizes cultivadas, sendo necessário desenvolver métodos confiáveis que possibilitem identificar/distinguir esses cultivares. Essa identificação pode-se basear nas diferenças morfológicas, nos métodos bioquímicos e nas diferenças moleculares a nível de proteínas ou de DNA (Conti et al., 2002b).

A aprovação da Lei de Proteção de Cultivares (Lei Nº 9.456 de 25 de abril de 1997, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento) estimulou o uso de técnicas que possam garantir uma identificação precisa dos cultivares de plantas, assegurando, dessa forma, a propriedade intelectual do material genético desenvolvido. Para que um novo cultivar ou cultivar essencialmente derivado seja submetido ao processo de proteção, ele deve passar pelos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, cujos descritores sejam conhecidos, homogêneos quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estáveis ao longo de sucessivas gerações (Brasil, 1997).

Para o morangueiro, os 41 descritores considerados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares são: forma, densidade e vigor da planta; cor

da página superior, forma da secção transversal, ondulação, brilho da folha; relação comprimento/largura, forma da base e do recorte no folíolo terminal; posição dos pêlos no folíolo; pigmentação antociânica na estípula; número, pigmentação antociânica e pubescência nos estolões; posição da inflorescência em relação a folhagem; tamanho da flor; tamanho do cálice em relação à corola; posição relativa das pétalas da flor primária (observado em flores com 5 ou 6 pétalas); relação comprimento/largura das pétalas e dos frutos; tamanho e formato mais frequentes do fruto; diferença entre a forma dos frutos primários e secundários; zona sem aquênios; irregularidade da superfície, regularidade da cor e distribuição da cor vermelha da polpa, brilho, implantação dos aquênios, inserção do cálice, cavidade central, firmeza e posição das sépalas nos frutos, tamanho do cálice em relação ao diâmetro do fruto; aderência do fruto ao cálice; cor do fruto e da polpa; época da floração (50 % das plantas com pelo menos uma flor); época de maturação (50 % das plantas com frutos maduros) e refloração (Ministério da Agricultura e do Abastecimento, disponibilizado no endereço <http://www.agricultura.gov.br>, 2005).

No entanto, os métodos baseados nas características morfológicas das folhas, flores e frutos para identificação de cultivares de morango são limitados. Muitos cultivares não são distinguidos apenas pelo seu índice morfológico e, em muitos casos, não se tem a planta inteira, mas apenas o fruto, do qual, sozinho, não é possível identificar-se o cultivar. Ferreira & Grattapaglia (1998) comentam que “marcadores” morfológicos são específicos para um determinado tecido, o que impede a sua determinação quando há apenas alguma parte vegetativa da planta disponível e existem em menor número, o que limita a cobertura do genoma. Além disso, a expressão das características morfológicas são frequentemente afetadas pelo ambiente no qual estão inseridos, incluindo o método de cultivo. Assim, existe a necessidade da identificação de um grande número de descritores, em sua maioria na planta inteira ou adulta, sendo

necessário que seja realizada observações em, pelo menos, duas colheitas satisfatórias de frutos na mesma planta, em dois anos consecutivos. Isso necessita de grande espaço físico e acarreta longo tempo para a avaliação do material (Conti et al., 2002b; Kuniyama et al., 2003; Nielsen & Lovell, 2000), o que caracteriza uma situação inócua quando se pretende a comercialização do morangueiro, pois uma vez que se obtêm os dados de identificação do cultivar, a sua comercialização já ocorreu.

Métodos bioquímicos também podem ser influenciados pelos fatores externos. Khanizadeh & Bélanger (1997), classificando 92 genótipos de morangueiro com base na composição de óleos essenciais das folhas, mostraram que esses óleos essenciais variaram devido a interação específica do cultivar com os fatores ambientais.

Existem também restrições no uso da caracterização molecular por análise de isoenzimas para o estudo da variedade genética. O padrão de isoenzimas depende do ambiente de cultivo e da idade da planta, o número de alelos detectados é relativamente baixo (Bell & Simpson, 1994; Nehra et al., 1991b) e é limitado a poucos locos no genoma (Williams et al., 1990). Os trabalhos de Bringham et al. (1981) e Nehra et al. (1991a) demonstraram que o número de possíveis marcadores isoenzimáticos foi pequeno para cultivares de morangueiro. Greco et al. (1993), estudando a caracterização isoenzimática de clones de morangueiro, identificaram apenas 9 clones em um total de 23, mostrando que essa técnica não foi eficiente. Ferreira & Grattapaglia (1998) observaram que o pequeno número de locos isoenzimáticos disponíveis limita o poder dessa técnica.

Técnicas moleculares utilizando o DNA, na obtenção de *fingerprint* para a caracterização de cultivares é um processo atual, ainda não reconhecido como metodologia oficial para a determinação de descritores em morangueiro. Tais técnicas são muito precisas, pois acessam a variabilidade diretamente a nível de

DNA e permitem a geração de grande número de descritores estáveis, que não são influenciados pelo ambiente e podem ser detectados em qualquer tipo de tecido e fase de desenvolvimento da planta (Cheng et al., 1997).

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados para caracterização genética em várias espécies vegetais, incluindo os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Fragmento de DNA Amplificado ao Acaso) e SSR (*Simple Sequence Repeat* ou Microssatélites). A utilização dos marcadores moleculares poderá contribuir de maneira expressiva para o aumento da precisão das informações relacionadas aos genótipos de interesse, podendo ser utilizados na identificação de cultivares, garantindo o direito da proteção intelectual dos mesmos.

Em qualquer programa de melhoramento, a introdução de cultivares divergentes tem sido reconhecida como estratégia importante para evitar a endogamia (Luby et al., 1991; Sjulín & Dale, 1987), a qual, freqüentemente, resulta na perda de vigor e redução da produtividade (Conti et al., 2002a; Hancock et al., 1996). As informações existentes sobre o nível de relacionamento genético entre os cultivares de morangueiro são pouco elucidativas (Graham et al., 1996), o que limita o sucesso de novas combinações alélicas. Portanto, torna-se necessário um estudo prévio do germoplasma do morangueiro visando a futuros trabalhos em melhoramento.

2.4. Marcadores RAPD

O RAPD é uma variação da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza um único *primer* com 10 nucleotídeos de seqüência arbitrária, que se anelam em regiões aleatórias do genoma e geram uma amplificação de fragmentos distribuídos ao acaso. O polimorfismo é detectado pela ausência ou presença dos fragmentos de DNA amplificados (Welsh & McClelland, 1990; Willians et al., 1990).

O uso dos marcadores RAPD para o estudo da variabilidade genética oferece vantagens, uma vez que apresentam um número quase ilimitado de *primers* que podem ser utilizados na amplificação do DNA genômico sem o conhecimento prévio de informações sobre sondas ou seqüências de DNA e apresenta baixo custo (Cenis et al., 1993; Willians et al., 1990). Vários *primers* RAPD já foram descritos como eficientes para gerar polimorfismo em morangueiro (Conti et al., 2002b; Gidoni et al., 1994; Degani et al., 1998; Degani et al., 2001; Parent & Pagé, 1995). Conti et al. (2002a) selecionaram cinco *primers* RAPD (OPB06, OPB08, OPB19, OPG05 e OPG11) que geraram um total de 73 marcadores, os quais foram utilizados para estimar a diversidade genética e identificar 26 cultivares de morangueiro. Porebski & Catling (1998), estudando 35 subespécies de *Fragaria chiloensis* (L.) Duchesne, de 100 *primers* RAPD, selecionaram 12 que geraram 62 bandas polimórficas. Graham et al. (1996), estudando a diversidade genética entre oito cultivares de morangueiro usados em programas de melhoramento, observaram 160 bandas amplificadas por 10 *primers*, das quais 79 (68 %) foram polimórficas. Garcia et al. (2002) selecionaram 16 *primers* RAPD para amplificação de DNA, sendo suficientes para identificar oito cultivares de morangueiro, entre eles os cultivares Camarosa, Tudla e Sweet Charlie, estudados neste trabalho.

Ferreira & Grattapaglia (1998) enumeram a aplicação dos marcadores RAPD na obtenção de *fingerprints* genômicos, na análise da divergência genética, no estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies, na construção de mapas genéticos e na localização de genes de interesse econômico. Para o morangueiro, os marcadores RAPD têm sido utilizados para identificação de cultivares, mapeamento e estudo de diversidade (Congiu et al., 2000; Degani et al., 1998; Gidoni et al., 1994; Graham et al., 1996; Hancock et al., 1994; Haymes et al., 1997; Harrison et al., 1997; Landry et al., 1997; Parent & Pagé, 1995). Análise da diversidade genética entre

morangueiros cultivados no Brasil, utilizando-se marcadores RAPD, foram concordantes com base nas características morfológicas e agrônômicas (Conti et al., 2002b). Hancock et al. (1994) examinaram a diversidade genética entre oito cultivares de morangueiro selecionados do Programa de Melhoramento da Universidade da Califórnia, utilizando marcadores RAPD. No entanto, existe uma carência de informação quanto a utilização dos marcadores RAPD em cultivares de morangueiro comercializados em Minas Gerais.

2.5. Marcadores SSR

Os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências curtas com um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA, conhecidos como microssatélites (Rafalski et al., 1996). Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998), mostrando estabilidade ao longo de várias gerações (Russel et al., 1997). As regiões que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre diferentes espécies de um mesmo gênero permitindo a transferência de locos microssatélites entre espécies.

A identificação dos SSR é um processo trabalhoso e de elevado custo, envolvendo a construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones contendo os microssatélites, o seqüenciamento em larga escala desses clones, desenho dos *primers* específicos e sua confirmação por PCR (Rafalski et al., 1996). Após essa fase, a utilização dessa técnica caracteriza-se pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos. Além disso, os marcadores SSR possuem elevado poder discriminatório e, normalmente, poucos locos garantem a completa identificação de genótipos, o que os tornam úteis para a identificação de cultivares. As variações nas regiões SSR resultam nos diferentes números de

alelos detectados por loco genético, que podem ser amplificados por PCR e resolvidos em géis de poliacrilamida ou de agarose (Smulders et al., 1997).

Para o morangueiro, marcadores SSR já foram isolados e caracterizados. James et al. (2003) desenvolveram 10 pares de *primers* polimórficos de microssatélites em morangueiro selvagem (*Fragaria vesca* L.) para estudo de mapeamento, diversidade e identificação de clones, no qual mostraram polimorfismo em nove acessos de *F. vesca*, sendo detectados de 2 a 6 alelos por locos. Sargent et al. (2003) caracterizaram 22 marcadores SSR desenvolvidos para a espécie diplóide de *Fragaria viridis*. No entanto, existe uma carência de informação quanto a utilização desses marcadores em morangueiro comercial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivares de morangueiro estudados

Para a realização desse trabalho, foi utilizada uma coleção contendo oito cultivares de morangueiro (Tabela 1), produzidos no Estado de Minas Gerais e comercializados como matrizes pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda (Andradas, MG).

TABELA 1. Matrizes de morangueiro propagadas pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda (Andradas, MG).

CULTIVARES	PARENTAIS	ORIGEM
Camarosa	'Douglas' x 'Cal 85.218-605'	Universidade da Califórnia, EUA, 1988
Campinas	'Donner' x 'Tahoe'	IAC, Campinas, Brasil, 1955
Dover	'Florida Belle' x 'Fla.71-189'	Universidade da Flórida, EUA, 1973
Oso Grande	'Parker' x 'Cal 77.3-603'	Universidade da Califórnia, EUA, 1987
Seascape	'Selva' x 'Douglas'	Universidade da Califórnia, EUA, 1991
Sweet Charlie	'Fl 80-456' x 'Pajaro'	Universidade da Flórida, EUA, 1994
Toyonoka	'Himiko' x 'Harunoka'	Japão, 1975
Tudla (Milsei)	'Parker' x 'Chandler'	Tudela, Espanha, 1992

Cinco mudas dos oito cultivares de morangueiro, propagadas *in vitro*, foram enviadas pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda (Andradas, MG) em bandejas embaladas em caixa de papelão, para o Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, onde foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 10 L contendo substrato comercial, das quais as folhas foram utilizadas como tecido para extração de DNA.

3.2. Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA, 1 g de tecido foliar fresco foi triturado em N₂ líquido com 10 mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, 3 % CTAB, 1 % PVP, 5 % β-Mercaptoetanol) e incubado a 65 °C por 1 hora, sendo homogeneizado a cada 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 10 mL de clorofórmio:octanol (24:1), homogeneizados por 15 minutos. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 12.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifuga e repetiram-se as etapas da adição do clorofórmio:octanol e centrifugação. O DNA foi precipitado com isopropanol 99 % (-20 °C), removido com anzol de vidro e transferido para tubo contendo etanol 70 % (-20 °C), onde permaneceu durante 10 minutos. Após esse período, o DNA foi solubilizado em 300 µL de TE pH 8,0 (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA).

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8 % por comparação com padrões de DNA de concentração conhecida. A eletroforese foi realizada a 150 V em tampão TAE (1 mM EDTA pH 8,0, 40 mM TRIS pH 8,0, 20 mM ácido acético) e o gel tratado com brometo de etídio (1 µg. mL⁻¹) durante 30 minutos. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e a sua imagem foi captada pelo sistema de documentação "Eagle Eye" (Stratagene).

3.3. Marcadores RAPD

As reações de amplificações foram realizadas em um volume final de 25 μL , contendo 50 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 2 mM Mg^{2+} , 100 μM de cada um dos dNTPs, 1 U da enzima Taq polimerase e 0,16 μM *primer*. Foram utilizados 160 *primers* RAPD, citados na literatura e escolhidos ao acaso da Operon Technologies (Alameda, CA, EUA).

As reações foram submetidas ao termociclador GeneAmp PCR 9600 (Applied Biosystems) programado com uma temperatura de desnaturação inicial de 92 °C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificação compostos por 3 etapas: 95 °C por 45 segundos, 42 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Após os 45 ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa final de 2 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 150 V, sob tampão TAE (1 mM EDTA pH 8,0, 40 mM TRIS pH 8,0, 20 mM ácido acético), em gel de agarose 1,2 %. Após a eletroforese, o gel foi tratado em solução de brometo de etídio (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 30 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo sistema de fotodocumentação “Eagle Eye” (Stratagene).

3.4. Marcadores SSR fluorescentes

Para reação de amplificação foram utilizados 10 pares de *primers* SSR denominados MOR1, MOR2, MOR3, MOR4, MOR5, MOR6, MOR7, MOR8, MOR9 e MOR10. Os *primers* SSR foram marcados com fluorescência, sendo os *primers* MOR3, MOR4, MOR5 e MOR7 marcados com a molécula 6-FAM que confere fluorescência azul, os *primers* MOR6, MOR8 e MOR10 marcados com HEX de fluorescência verde e os *primers* MOR1, MOR2 e MOR9 marcados com NED de fluorescência amarela (Applied Biosystems).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR 9600 (Applied Biosystems), isoladamente para cada fluorescência em um volume final de 10 μ L, contendo 30 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 125 μ M de cada um dos dNTPs, 0,2 μ M de cada um dos *primers* e 0,25 U da enzima Taq DNA polimerase.

Os ciclos das reações de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos. Ao final, a reação foi submetida a um período de extensão a 72 °C por seis minutos.

Os produtos finais da reação de PCR foram diluídos nas proporções de 1:20 para 6-FAM e 1:10 para HEX e NED. Após a diluição, os produtos de PCR marcados com fluorescências diferentes foram agrupados em volumes iguais e de cada grupo foram retirados 3,0 μ L que foram misturados a 0,5 μ L de formamida, 0,5 μ L do corante *blue dextran* e 0,5 μ L do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems). As amostras foram desnaturadas a 95 °C durante três minutos e mantidas no gelo até sua aplicação no gel desnaturante de poli-acrilamida 5 %. Foram aplicados 2 μ L das amostras desnaturadas no gel e os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 2000 V durante três horas no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.5. Avaliação dos dados moleculares

Para avaliação dos resultados moleculares obtidos por marcadores SSR cada fragmento amplificado foi considerado como um loco. Assim, as bandas polimórficas resultantes, obtidas por marcadores RAPD e SSR, foram analisadas visualmente e foi construída uma matriz considerando os dados binários, onde o

valor 1 (um) foi atribuído para presença do alelo e o valor 0 (zero) para sua ausência. Esses dados foram utilizados na construção de uma matriz binária.

A partir dos dados binários foi calculada a matriz de dissimilaridade entre os oito cultivares utilizando o complemento do coeficiente de Jaccard, para os marcadores RAPD e SSR, segundo a fórmula:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

a = presença da banda nos genótipos i e j;

b = presença da banda no genótipo i e ausência no genótipo j;

c = ausência da banda no genótipo i e presença no genótipo j.

O agrupamento dos cultivares foi realizado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Average*) utilizando o programa Statistica versão 4.3. Cada agrupamento do dendrograma foi avaliado pela análise de bootstrap utilizando 10.000 amostragens pelo programa BOOD 3.2 (Coelho, 2000). A técnica de *bootstrap* realiza a repetição da experiência, o que seria desejável na prática, se tal fosse possível. As observações são escolhidas de forma aleatória e as estimativas calculadas novamente.

Para verificar o número mínimo de marcadores polimórficos necessários para gerar uma matriz de distância genética, foi utilizada a metodologia descrita por Efron (1981) e implementado pelo programa GQMol (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm). Seja $X = (X_1, \dots, X_n)$ a amostra contendo N observações. Constrói-se B amostras $X^{*(1)}, \dots, X^{*(B)}$ de comprimento N cada, construídas a partir da população finita (X_1, \dots, X_n) que corresponde a amostrar com substituição a partir do conjunto X .

A diversidade genética do loco ou PIC (*Polymorphic Index Content*) é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A maior informatividade de uma classe de marcadores define sua maior eficiência em detectar polimorfismos entre dois indivíduos (Rafalski et al.,

1996). O PIC, para marcadores SSR, pode ser calculado pela fórmula de Weir (1996); como o morangueiro é uma espécie octapólida, as bandas geradas pelos marcadores SSR não foram consideradas alélicas, sendo avaliadas como marcadores dominantes, assim como o RAPD, foi determinado por meio da equação: $PIC = 1 - \sum_i \sum_j p_{ij}^2$. Sendo que p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no *primer* j .

3.6 Identificação genética de 10 genótipos desconhecidos de morangueiro

A empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal (Andradas, MG) disponibilizou um lote contendo 10 amostras, em três repetições, de mudas de matrizes de morangueiro para serem identificadas. As amostras foram recebidas sem as respectivas identificações, sendo apenas enumeradas de 1 a 10. Portanto, coube a este estudo a identificação genética dessas amostras, utilizando marcadores RAPD e SSR.

Os processos de extração, quantificação e amplificação do DNA foram realizados conforme descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da divergência genética entre cultivares morangueiro

4.1.1. Marcadores RAPD.

De um total de 160 *primers* testados, 63 foram capazes de amplificar fragmentos bem definidos e apresentar um padrão de bandas polimórficas entre os cultivares analisados. Os 63 *primers* selecionados geraram 277 bandas das quais 231 foram polimórficas (83 %). A informatividade desses *primers* variou de 0,92 para o *primers* OPG05 e OPW06 a 0,22 para os *primers* OPG19 e OPJ17 (Tabela 2).

TABELA 2. *Primers* RAPD, suas respectivas seqüências de bases, PIC (*Polymorphic Index Content*) e número de bandas polimórficas obtidas em oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

<i>PRIMER</i>	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PIC	Número de bandas polimórficas
OPB02	TGATCCCTGG	0,85	5
OPB04	GGACTGGAGT	0,82	4
OPB05	TGCGCCCTTC	0,61	2
OPB07	GGTGACGCAG	0,90	6
OPB08	GTCCACACGG	0,65	2
OPB10	CTGCTGGGAC	0,82	4
OPB11	GTAGACCCGT	0,84	4
OPB12	CCTTGACGCA	0,81	4
OPB13	TTCCCCCGCT	0,61	2

Tabela 2. Cont.

OPB14	TCCGCTCTGG	0,89	5
OPB15	GGAGGGTGTT	0,85	5
OPB16	TTTGCCCGGA	0,90	7
OPB18	CCACAGCAGT	0,90	7
OPB19	ACCCCCGAAG	0,67	2
OPB20	GGACCCTTAC	0,41	1
OPE06	AAGACCCCTC	0,86	5
OPE19	ACGGCGTATG	0,85	4
OPE20	AACGGTGACC	0,80	3
OPF01	ACGGATCCTG	0,90	7
OPF02	GAGGATCCCT	0,85	4
OPF07	CCGATATCCC	0,76	3
OPF08	GGGATATCGG	0,47	1
OPF09	CCAAGCTTCC	0,83	4
OPF10	GGAAGCTTGG	0,81	3
OPF12	ACGGTACCAG	0,38	1
OPF13	GGCTGCAGAA	0,80	3
OPF14	TGCTGCAGGT	0,84	4
OPF16	GGAGTACTGG	0,84	4
OPG02	GGCACTGAGG	0,47	1
OPG04	AGCGTGTCTG	0,87	5
OPG05	CTGAGACGGA	0,92	8
OPG06	GTGCCTAACC	0,71	2
OPG08	TCACGTCCAC	0,74	2
OPG09	CTGACGTCAC	0,82	3
OPG10	AGGGCCGTCT	0,88	5
OPG11	TGCCCCGTCGT	0,90	6

Tabela 2. Cont.

OPG12	CAGCTCACGA	0,83	4
OPG13	CTCTCCGCCA	0,86	5
OPG14	GGATGAGACC	0,78	3
OPG15	ACTGGGACTC	0,65	2
OPG16	AGCGTCCTCC	0,82	4
OPG17	ACGACCGACA	0,90	5
OPG18	GGCTCATGTG	0,73	2
OPG19	GTCAGGCAA	0,22	1
OPI03	CAGAAGCCCA	0,61	2
OPJ10	AAGCCCGAGG	0,88	4
OPJ12	GTCCCGTGGT	0,84	4
OPJ13	CCACACTACC	0,65	2
OPJ14	CACCCGATG	0,84	4
OPJ16	CTGCTTAGGG	0,71	2
OPJ17	ACGCCAGTTC	0,22	1
OPJ18	TGGTCGCAGA	0,65	2
OPJ19	GAACACCACT	0,84	4
OPW02	ACCCCGCCAA	0,85	4
OPW04	CAGAAGCGGA	0,90	6
OPW06	AGGCCCGATG	0,92	7
OPW11	CTGATGCGTG	0,91	7
OPW13	CACAGCGACA	0,68	2
OPW15	ACACCGGAAC	0,83	4
OPW16	CAGCCTACCA	0,89	5
OPW19	CAAAGCGCTC	0,81	4
OPY06	AAGGCTCACC	0,65	2
OPY15	AGTCGCCCTT	0,47	1

O número de bandas polimórficas amplificadas pelos *primers* variou de um para os *primers* OPB20, OPF08, OPF12, OPG02, OPG19, OPJ17 e OPY15 a oito para o *primer* OPG05, cujo padrão de amplificação está representado na figura 1,

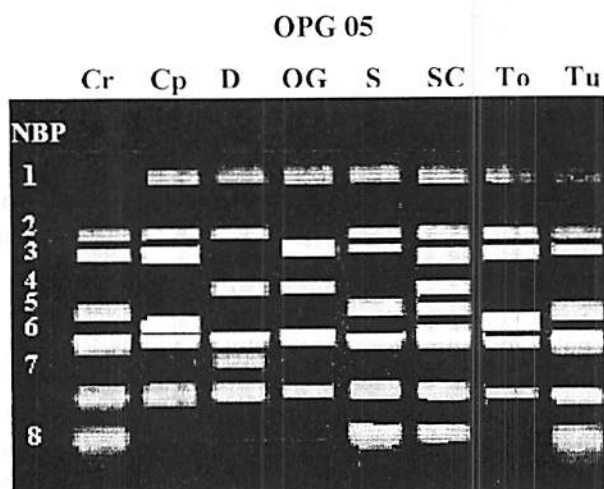


FIGURA 1. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* OPG05, em gel de agarose 1.2 %. Cultivares de morangueiro: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. NBP: Número de Bandas Polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

As 231 bandas polimórficas foram consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência, uma vez que nas análises de número ótimo de marcadores realizadas verificou-se que a correlação entre as matrizes de distância aproximou-se de 1 e a soma dos quadrados dos desvios foi reduzida para 0,10, a partir da utilização de 80 bandas polimórficas (Figura 2). Assim, o

aumento do número de bandas não alterou significativamente a estimativa da distância genética entre os indivíduos estudados.

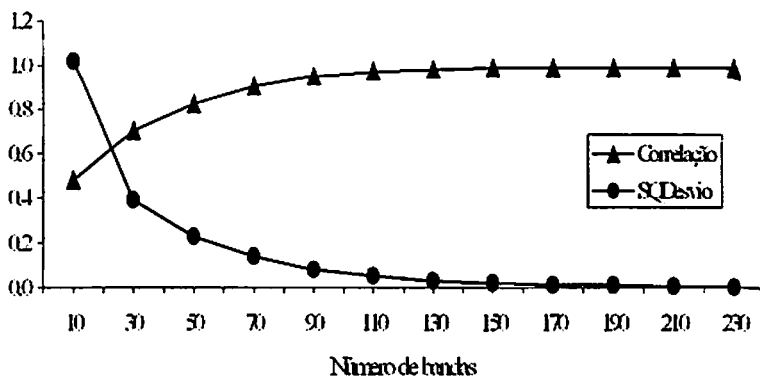


FIGURA 2. Análise do número mínimo de marcadores RAPD para a estimativa das distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Com base nas 231 bandas polimórficas RAPD obtidas, foi construída uma matriz de distância genética, utilizando o coeficiente de Jaccard, entre pares de cultivares (Tabela 3).

TABELA 3. Matriz de distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro utilizando marcadores RAPD. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

	Cr	Cp	D	OG	S	SC	To	Tu
Cr	0							
Cp	0,49	0						
D	0,51	0,59	0					
OG	0,34	0,38	0,49	0				
S	0,42	0,46	0,47	0,35	0			
SC	0,47	0,54	0,58	0,45	0,42	0		
To	0,78	0,72	0,81	0,75	0,76	0,76	0	
Tu	0,42	0,51	0,58	0,42	0,43	0,41	0,76	0

Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla.

A distância genética média entre os oito cultivares foi de 0,43, com uma amplitude de 0,81 a 0,34. A maior distância foi obtida entre os cultivares Dover e Toyonoka, que apresentam origens distintas, uma vez que o cultivar Dover foi desenvolvido na Universidade da Flórida, Estados Unidos e o cultivar Toyonoka foi desenvolvido no Japão. A menor distância foi observada entre os cultivares Camarosa e Oso Grande, ambos desenvolvidos na Universidade da Califórnia, Estados Unidos.

O dendrograma obtido com marcadores RAPD e a porcentagem de frequência pela análise de *bootstraps* estão representados na figura 3.

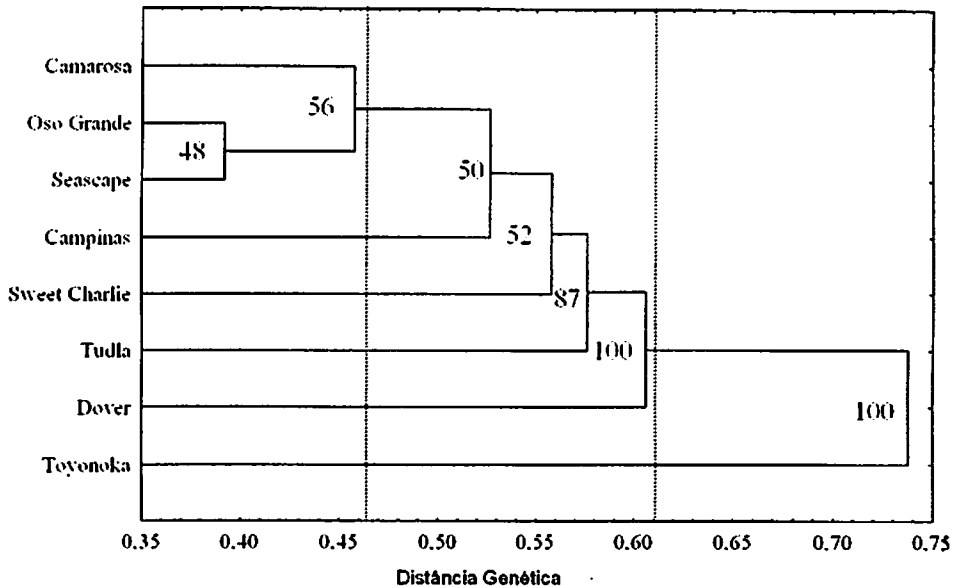


FIGURA 3. Dendrograma representando as distâncias genéticas obtidas com base em marcadores RAPD, entre os cultivares de morangueiro, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de *bootstrap*. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Pelo resultado da matriz de dissimilaridade genética obtida com o índice de Jaccard, pode-se observar que houve a formação de apenas um grupo a uma distância de 61 %, separando o cultivar Toyonoka, desenvolvido no Japão, dos demais cultivares. A consistência de cada agrupamento foi avaliada por reamostragens dos dados, por meio de 10.000 amostras, revelando uma consistência de 100 % desse agrupamento.

Dentro do grupo formado, foi observada a formação de um subgrupo, a uma distância de 46 %, contendo os cultivares Camarosa, Oso Grande e Seascape. Esse agrupamento pode ser explicado pela origem comum dos

cultivares, Universidade da Califórnia, EUA, além do fato de que os cultivares Camarosa e Seascape possuem em comum o genótipo 'Douglas' como parental.

4.1.2. Marcadores SSR

Dos 10 *primers* testados entre os oito cultivares de morangueiro, 3 (MOR1, MOR5 e MOR10) foram monomórficos (Figura 4).

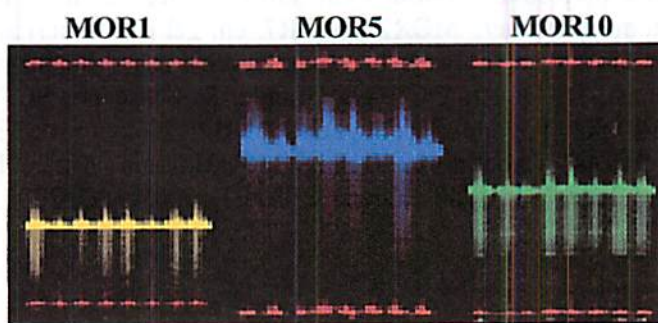


FIGURA 4. Padrões de amplificação obtidos em oito cultivares de morangueiro, utilizando os *primers* MOR1 (amarelo), MOR5 (azul) e MOR10 (verde), em gel de poliacrilamida 5 % desnaturante. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Os outros sete *primers* revelaram polimorfismos entre os cultivares analisados produzindo bandas bem definidas e reproduzíveis. Foram amplificados 44 alelos, dos quais 36 foram polimórficos (82 %). O número de alelos polimórficos variou de um para o *primer* MOR2 a 11 para o *primer* MOR7 (Figura 5).

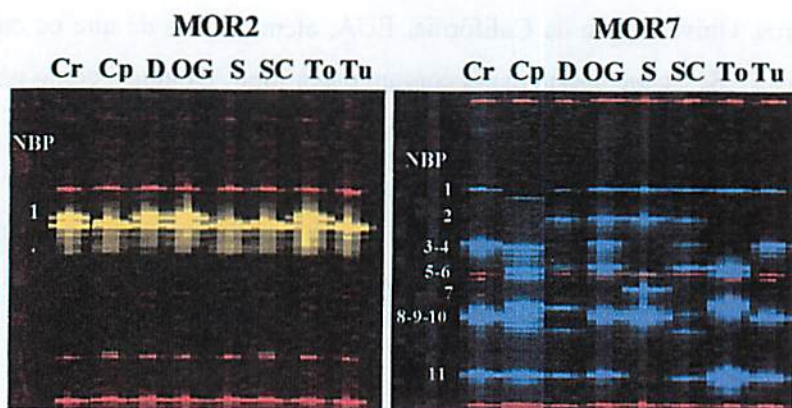


FIGURA 5. Padrões moleculares obtidos em oito cultivares de morangueiro, utilizando os *primers* MOR2 e MOR7, em gel de poliacrilamida 5 % desnaturante. Cultivares de morangueiro: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. NBP: Número de Bandas Polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

A informatividade dos sete *primers* SSR utilizados variou de 0,94 (MOR7) a 0,50 (MOR2) (Tabela 4).

TABELA 4. *Primers* SSR com seus respectivos valores de PIC (*Polymorphic Index Content*), número de alelos polimórficos e faixa de tamanho dos alelos obtidos em oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

<i>Primers</i>	PIC	Número de alelos Polimórficos	Faixa de tamanho dos alelos
MOR2	0,50	1	193-195
MOR3	0,91	7	211-243
MOR4	0,86	5	231-255
MOR6	0,86	4	201-209
MOR7	0,94	11	127-223
MOR8	0,90	6	177-209
MOR9	0,69	2	195-209

As 36 bandas polimórficas foram consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência genética, uma vez que as análises de número ótimo de marcadores indicaram que a correlação entre as matrizes de distância aproximou-se de 1 e a soma dos quadrados dos desvios foi reduzida para 0,10, a partir da utilização de 26 bandas polimórficas (Figura 6).

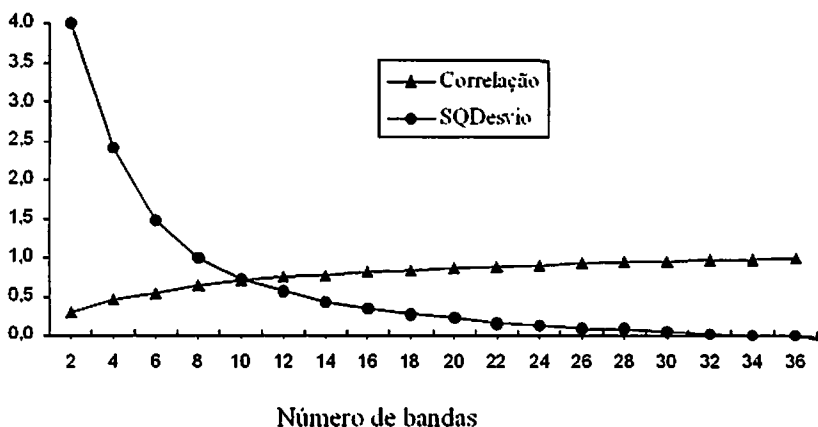


FIGURA 6. Análise do número mínimo de marcadores SSR para a estimativa das distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Com base nas 36 bandas polimórficas SSR foi construída uma matriz de distância genética, obtidas com o índice de Jaccard, relacionando todos os pares de cultivares (Tabela 5). A distância genética média entre os cultivares foi de 0,48, com uma amplitude de 0,83 a 0,26. A maior distância foi obtida entre os cultivares Dover e Campinas, de origens distinta, uma vez que o cultivar Dover foi desenvolvido na Universidade da Flórida, e que o cultivar Campinas foi desenvolvido no IAC, Brasil. A menor distância foi observada entre os cultivares Camarosa e Oso Grande, sendo ambos desenvolvidos na Universidade da Califórnia, concordando com os resultados dos marcadores RAPD.

TABELA 5. Matriz de distâncias genéticas, utilizando *primers* SSR, entre oito cultivares de morangueiro analisados dois a dois. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

	Cr	Cp	D	OG	S	SC	To	Tu
Cr	0							
Cp	0,67	0						
D	0,74	0,83	0					
OG	0,26	0,56	0,65	0				
S	0,43	0,73	0,75	0,45	0			
SC	0,69	0,74	0,61	0,65	0,70	0		
To	0,54	0,60	0,45	0,50	0,56	0,58	0	
Tu	0,28	0,65	0,82	0,48	0,54	0,73	0,69	0

Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla.

O dendrograma obtido com marcadores SSR e a porcentagem de frequência pela análise de *bootstraps* estão representados na figura 7. Pelo resultado da matriz de distância genética pode-se observar que houve a formação de dois grupos a 60 % de distância. A análise de *bootstrap* revelaram uma consistência de 100 % desse agrupamento. O primeiro grupo apresentou os cultivares Camarosa, Oso Grande, Seascape e Tudla, sendo os três primeiros originários da Universidade da Califórnia, e o último originário da Espanha. O segundo grupo foi composto pelos cultivares Dover, Sweet Charlie e Toyonoka, sendo os dois primeiros desenvolvidos na Universidade da Flórida e o cultivar Toyonoka, originário do Japão. O cultivar Campinas, originário do Brasil, ficou isolado, se agrupando com os cultivares da Califórnia a uma distância genética de 68 %.

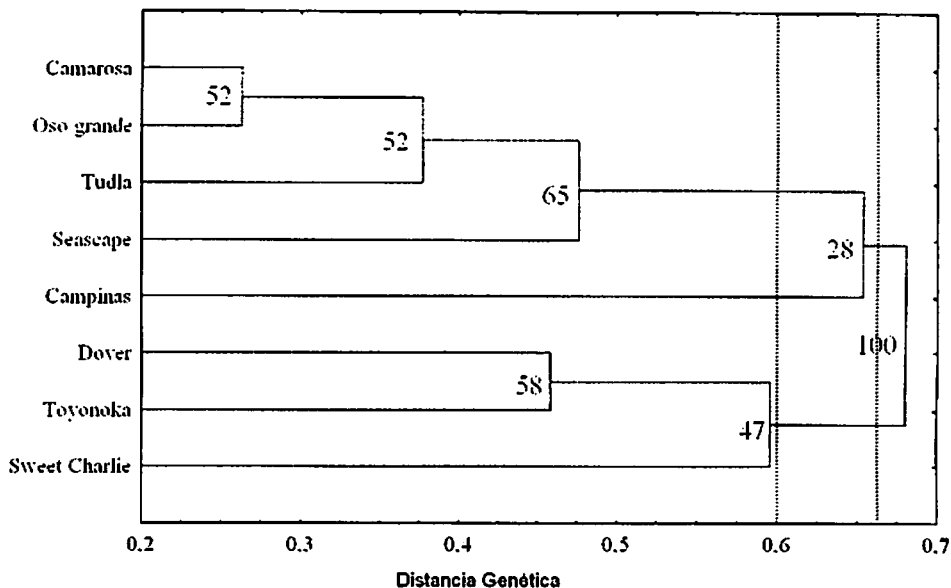


FIGURA 7. Dendrograma representando as distâncias genéticas obtidas com base em marcadores SSR, entre oito cultivares de morango, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de bootstrap. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

4.1.3. Marcadores RAPD e SSR agrupados

Um terceiro dendrograma foi construído utilizando as informações de 10 *primers* de RAPD (OPB07, OPB16, OPB18, OPF01, OPG05, OPG11, OPG17, OPW04, OPW06 e OPW11) que apresentaram maiores valores de PIC (entre 0,92 a 0,90) e 7 *primers* SSR polimórficos (MOR2, MOR3, MOR4, MOR6, MOR7, MOR8, MOR9).

Esses 17 *primers* geraram 113 bandas, das quais 102 foram polimórficas (90 %). Os polimorfismos foram considerados suficientes para a avaliação da divergência, uma vez que a correlação entre as matrizes de distância aproximou-

se de 1 e a soma dos quadrados dos desvios foi reduzida para 0,10, a partir da utilização de 50 bandas polimórficas (Figura 8).

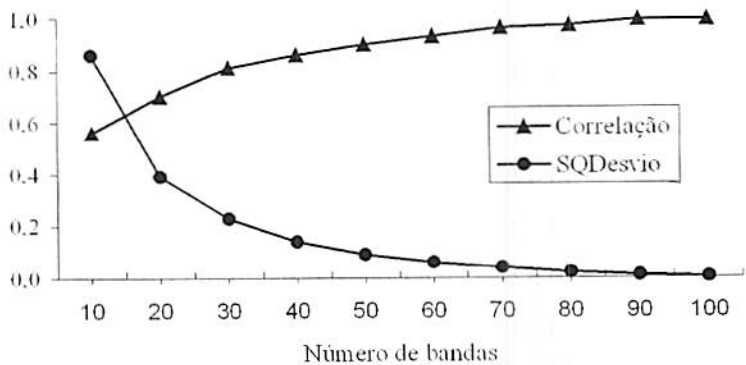


FIGURA 8. Análise do número mínimo de marcadores RAPD e SSR agrupados, para a estimativa das distâncias genéticas entre oito cultivares de morangueiro, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Com base nas 102 bandas polimórficas obtidas foi construída uma matriz de distância genética utilizando o índice de Jaccard entre os pares de cultivares (Tabela 6). A distância genética média entre os cultivares foi de 0,41 com uma amplitude de 0,34 a 0,68. A maior distância foi obtida entre os cultivares Toyonoka e Tudla, que apresentam origem distintas, uma vez que o cultivar Toyonoka foi desenvolvido no Japão e o cultivar Tudla na Espanha. A menor distância foi observada entre os cultivares Oso Grande e Seascape, originários da Universidade da Califórnia.

TABELA 6. Matriz de distâncias genéticas, utilizando marcadores RAPD e SSR agrupados, entre oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

	Cr	Cp	D	OG	S	SC	To	Tu
Cr	0							
Cp	0,54	0						
D	0,58	0,58	0					
OG	0,36	0,38	0,44	0				
S	0,43	0,47	0,47	0,34	0			
SC	0,57	0,52	0,49	0,43	0,43	0		
To	0,65	0,62	0,63	0,60	0,65	0,64	0	
Tu	0,46	0,54	0,63	0,46	0,48	0,54	0,68	0

Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla.

O dendrograma obtido com os marcadores RAPD e SSR agrupados apresentou uma tendência em agrupar os cultivares em função do local de origem dos mesmos (Figura 9).

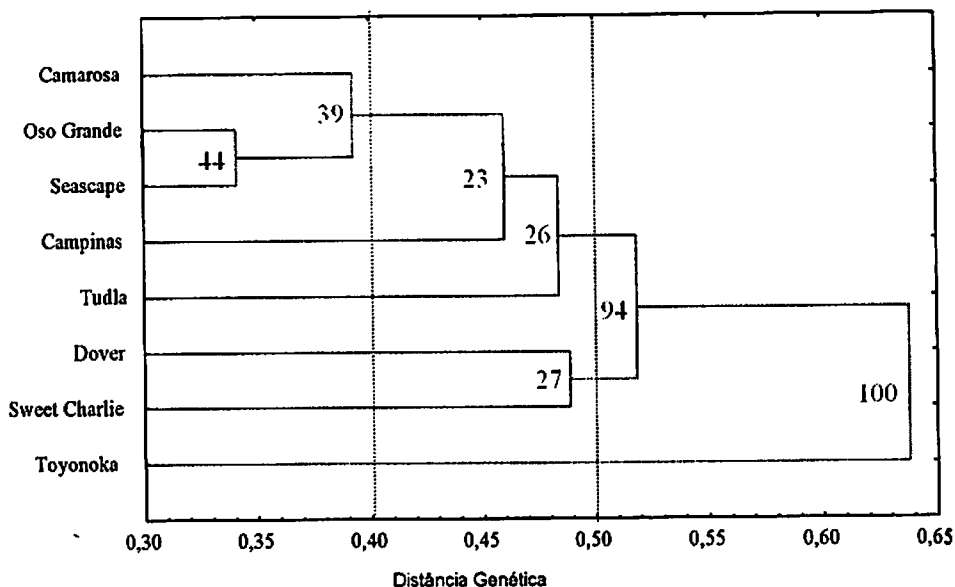


FIGURA 9. Dendrograma das distâncias genéticas, utilizando os marcadores RAPD e SSR agrupados, entre oito cultivares de morangueiro, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de *bootstrap*. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Pelo resultado do dendrograma pode-se observar a formação de um subgrupo, a 40 % de distância genética, contendo os cultivares desenvolvidos na Califórnia ('Camarosa', 'Oso Grande' e 'Seascape'). A esse subgrupo foram adicionados os cultivares Campinas e Tudla, originários do Brasil e da Espanha, respectivamente, formando um grupo maior a 50 % de distância genética. Além disso, na mesma distância foi formado outro grupo contendo os cultivares originário da Flórida ('Dover' e 'Sweet Charlie'). A análise de *bootstrap* revelaram uma consistência de 94 % dos dois grupos formados. O cultivar 'Toyonoka', originário do Japão, não se agrupou com os demais cultivares.

4.2. Identificação de cultivares de morangueiro

4.2.1. Marcadores RAPD

Foi possível estabelecer a identificação dos oito cultivares de morangueiro avaliados utilizando dois *primers* RAPD. Para isso, várias combinações de dois *primers* podem ser utilizados (Tabela 7 e Tabela 1A, Anexo).

TABELA 7. Possíveis combinações de dois *primers* RAPD utilizados para identificar oito cultivares de morangueiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>
OPB07	OPB10, OPB11, OPE19, OPG05, OPG10, OPG18, OPJ10, OPW06
OPB10	OPB07, OPB19, OPE19, OPG05, OPG10, OPG18, OPW06
OPB11	OPB07, OPB19, OPG05, OPG10, OPJ10
OPB12	OPJ10
OPB15	OPG10, OPJ10, OPW06
OPB19	OPB10, OPB11, OPG18, OPJ10, OPW06
OPE19	OPB07, OPB10, OPG10, OPJ10, OPW06
OPF07	OPW06
OPG05	OPB07, OPB10, OPB11, OPG18, OPJ10, OPW06
OPG10	OPB07, OPB10, OPB11, OPB15, OPE19, OPG18, OPJ10, OPW06
OPG18	OPB07, OPB10, OPB19, OPG05, OPG10
OPJ10	OPB07, OPB11, OPB12, OPB15, OPB19, OPE19, OPG05, OPG10, OPW06
OPW06	OPB07, OPB10, OPB15, OPB19, OPE19, OPF07, OPG05, OPG10, OPJ10

Como exemplo, utilizando os *primers* OPJ10 e OPB19, foi possível identificar todos os cultivares de morangueiro avaliados no presente estudo (Figura 10).

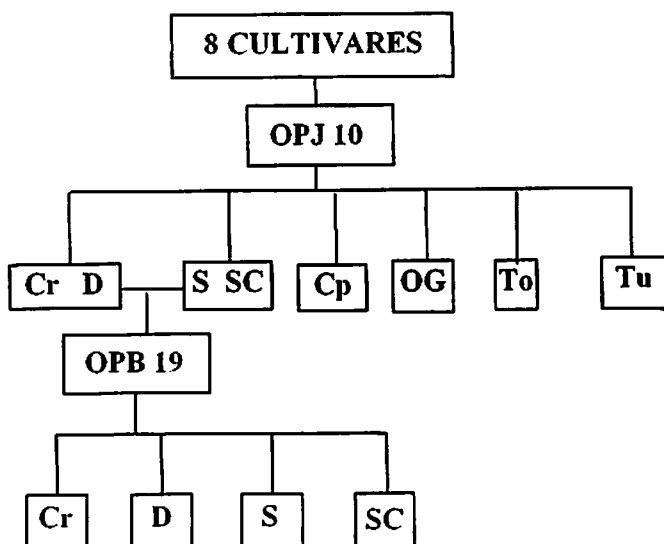


FIGURA 10. Fluxograma para identificação dos oito cultivares de morangueiro em estudo, utilizando marcadores RAPD. Cultivares de morangueiro: Cr: Camarosa. Cp: Campinas. D: Dover. OG: Oso Grande. S: Seascap. SC: Sweet Charlie. To: Toyonoka. Tu: Tudla. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

A reação com o *primer* OPJ10 gerou quatro padrões únicos de amplificação, permitindo a identificação dos cultivares Campinas, Oso Grande, Toyonoka e Tudla. Os cultivares Camarosa e Dover e os cultivares Seascap e Sweet Charlie, que apresentaram o mesmo padrão de bandas pelo *primer* OPJ10,

foram diferenciados pelo padrão de amplificação obtido como o *primer* OPB19 (Figura 11).

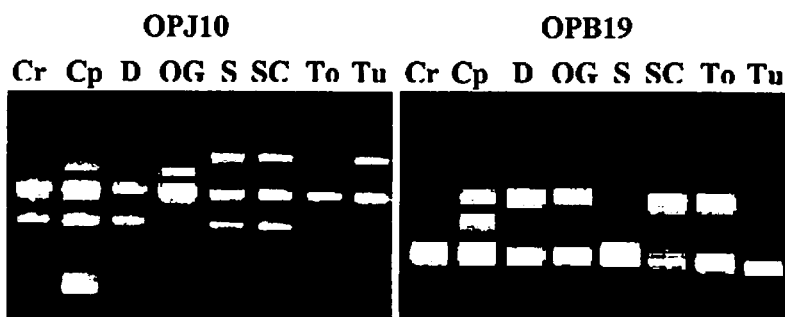


FIGURA 11. Padrões de amplificação obtidos pelos *primers* OPJ10 e OPB19, em gel de agarose 1.2 %. Cultivares de morangueiro: Cr: Camarosa. Cp: Campinas. D: Dover. OG: Oso Grande. S: Seascape. SC: Sweet Charlie. To: Toyonoka. Tu: Tudla. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Conti et al. (2002a) também conseguiram identificar 26 cultivares de morangueiro utilizando três marcadores RAPD e Degani *et al.* (1998) identificaram 41 cultivares de morangueiro utilizando 10 *primers* RAPD.

4.2.2. Marcadores SSR

Foi possível estabelecer a identificação dos oito cultivares de morangueiro avaliados utilizando dois *primers* RAPD. Para isso, várias combinações de dois *primers* podem ser utilizados (Tabela 8 e Tabela 2A, Anexo).

TABELA 8. Possíveis combinações de dois *primers* SSR utilizados para identificar oito cultivares de moranguiro. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras – MG, 2005.

<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>
MOR2	MOR7
MOR3	MOR6, MOR8, MOR9
MOR4	MOR8
MOR6	MOR3, MOR7
MOR7	MOR2, MOR6, MOR8, MOR9
MOR8	MOR3, MOR4, MOR7, MOR9
MOR9	MOR3, MOR7, MOR8

Como exemplo, utilizando os *primers* MOR3 e MOR8, foi possível identificar todos os cultivares de moranguiro avaliados neste estudo (Figura 12). A reação com o *primer* MOR8 gerou seis padrões de amplificação diferentes permitindo identificar os cultivares Camarosa, Campinas, Sweet Charlie e Tudla e a separação dos cultivares restantes em dois grupos distintos. Em um grupo formado, foram incluídos os cultivares Dover e Toyonoka, e no outro os cultivares Oso Grande e Seascape, que foram diferenciados pelo *primer* MOR3 (Figura 13).

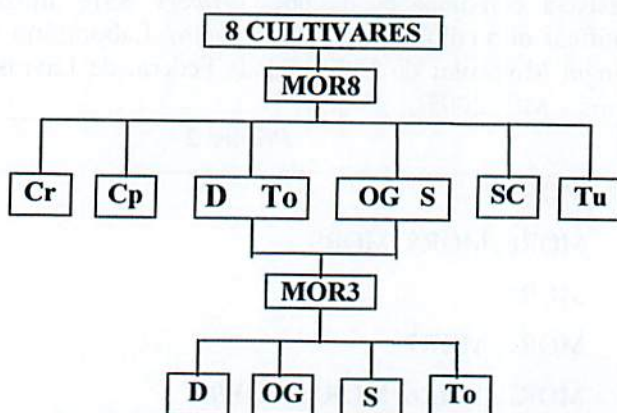


FIGURA 12. Fluxograma para identificação dos oito cultivares de morangueiro em estudo, utilizando marcadores SSR. Cultivares: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

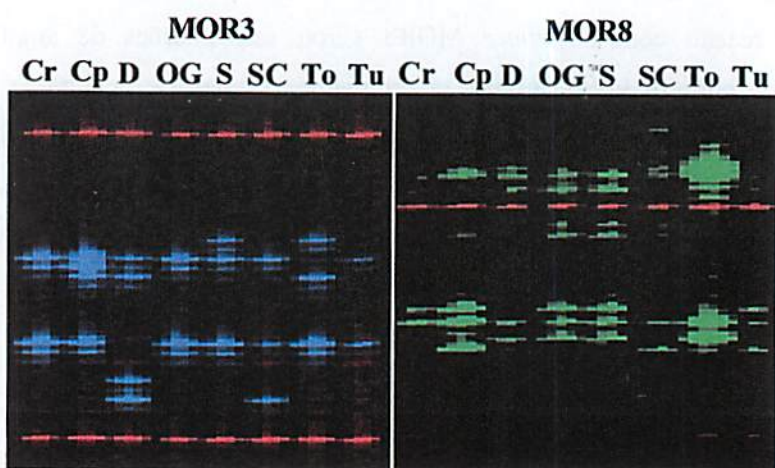


FIGURA 13. Padrões de amplificação obtidos utilizando os *primers* MOR3 e MOR8, em gel de poliacrilamida 5 % desnaturante. Cultivares: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

4.3. Identificação genética de 10 genótipos desconhecidos de morangueiro

4.3.1. Marcadores RAPD

Para identificação dos 10 genótipos desconhecidos de morangueiro foram usados os *primers* OPB07, OPB10, OPB19, OPE19, OPG10, OPG18, OPJ10 e OPW06. Desses, os que apresentaram um padrão confiável de amplificação foram os *primers* OPB19, OPG10 e OPG18. A reprodução de bandas amplificadas é um pré-requisito para caracterização de marcadores moleculares exclusivos para cada cultivar, sendo que a reprodução de bandas geradas por marcadores RAPD é uma das principais limitações dessa técnica.

Utilizando os *primers* OPG10 (Figura 14) e OPG18 (Figura 15) foi possível caracterizar todos os materiais enviados para identificação.

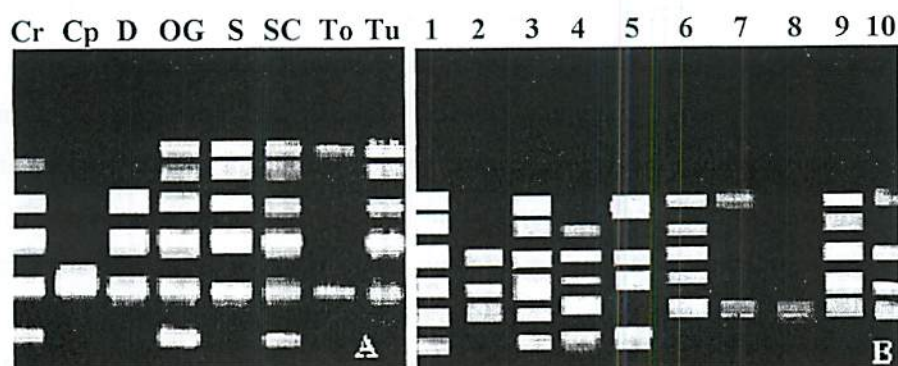


FIGURA 14. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* OPG10, em gel de agarose 1,2 %. (A) Cultivares de morangueiro: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. (B) Amostras para serem identificadas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

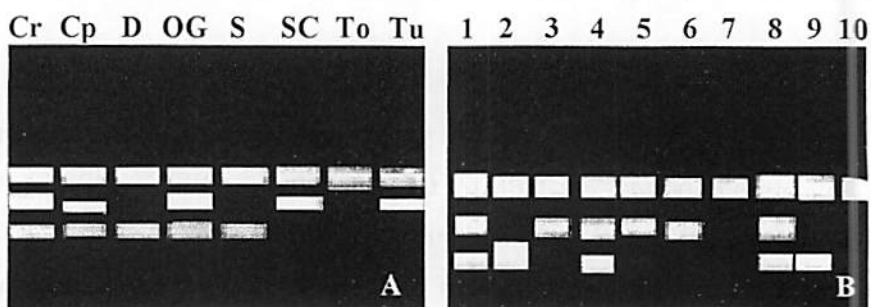


FIGURA 15. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* OPG18, em gel de agarose 1.2 %. (A) Cultivares de morangueiro: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. (B) Amostras para serem identificadas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Os padrões moleculares do *primer* OPG10 nos oito cultivares de morangueiro (Tabela 9), quando comparados com o padrão das amostras desconhecidas (Tabela 10), permitiu a identificação das amostras 2, 4, 7 e 8 como sendo os cultivares Dover, Camarosa, Toyonoka e Campinas, respectivamente, uma vez que este *primer* gerou um padrão molecular único para cada um desses cultivares. Em seguida, utilizando o *primer* OPG18 foi possível identificar a amostra 1 como sendo ‘Oso Grande’, a 3 amostra como ‘Sweet Charlie’, a 6 como ‘Tudla’ e a 9 como ‘Seascape’.

As amostras 5 e 10 não apresentaram padrão de amplificação semelhante a nenhum dos cultivares previamente caracterizados. Tais resultados confirmaram a informação de que esses cultivares eram ‘Aleluia’ e ‘CampDover’, respectivamente.

TABELA 9. Interpretação do padrão molecular obtido com *primers* RAPD, por meio de 0 e 1, entre os oito cultivares de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Cultivar	OPG10	OPG18
Camarosa	011111	111
Campinas	000010	111
Dover	001110	101
Oso Grande	111111	111
Seascape	111110	101
Sweet Charlie	111111	110
Toyonoka	100010	100
Tudla	111110	110

TABELA 10. Interpretação do padrão molecular obtido com *primers* RAPD, por meio de 0 e 1, entre 10 genótipos desconhecidos de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Amostra	<i>Primer</i> OPG10	Identificação <i>Primer</i> OPG10	<i>Primer</i> OPG18	Identificação <i>Primer</i> OPG18	Identificação do cultivar
1	111111	OG, SC	111	Cr, Cp, OG	OG
2	001110	D	101	D, S	D
3	111111	OG, SC	110	SC, Tu	SC
4	011111	Cr	111	Cr, Cp, OG	Cr
5	101101	NI	110	SC, Tu	NI
6	111110	S, Tu	110	SC, Tu	Tu
7	100010	To	100	To	To
8	000010	Cp	111	Cr, Cp, OG	Cp
9	111110	S, Tu	101	D, S	S
10	101110	NI	100	To	NI

Cultivares: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. NI = Não identificado

4.3.2. Marcadores SSR

Utilizando os *primers* MOR3 e MOR8 foi possível identificar todas as amostras enviadas para análise. Os padrões moleculares previamente obtidos com o *primer* MOR8 nos oito cultivares de morangueiro (Figura 13, Tabela 11), quando comparados com as amostras desconhecidas (Figura 16, Tabela 12), permitiram identificar as amostras 3, 4, 6 e 8 como sendo os cultivares Sweet Charlie, Camarosa, Tudla e Campinas, respectivamente. Esses cultivares apresentaram padrões moleculares diferenciados com o referido *primer*, não

possibilitando diferenciar as amostras 1 e 9, nem as amostras 2 e 7. No entanto, utilizando o *primer* MOR3 foi possível identificar a amostra 1 como sendo o cultivar Oso Grande, a 2 como Dover, a 7 como Toyonoka e a 9 como Seascape. Da mesma forma que pra os marcadores RAPD, as amostras 5 e 10 não apresentaram padrões de amplificação comparáveis aos cultivares previamente caracterizados.

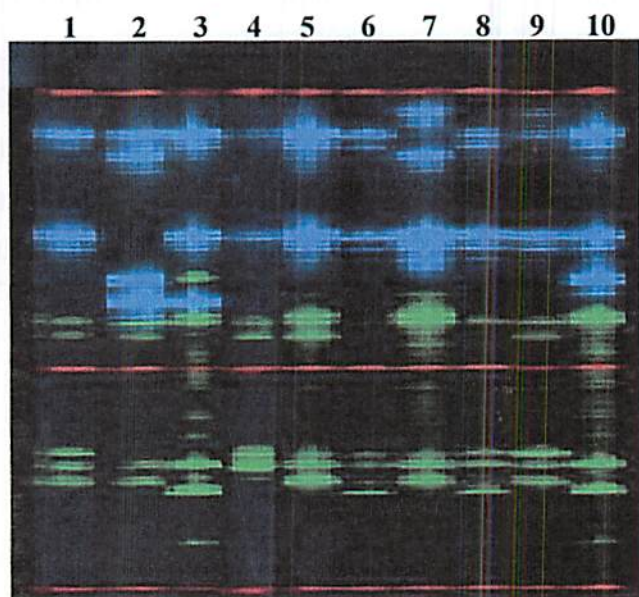


FIGURA 16. Padrões de amplificação obtidos com os *primers* MOR3 (azul) e MOR8 (verde) em 10 genótipos desconhecidos de morangueiro, gel de poliacrilamida 5 % desnaturante. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

TABELA 11. Interpretação do padrão molecular obtido com *primers* SSR, por meio de 0 e 1, entre os oito cultivares de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Cultivar	MOR3	MOR8
Camarosa	00110110	0011110
Campinas	00111110	0111000
Dover	11001010	0110111
Oso Grande	00110110	0111110
Seascape	00110011	0111110
Sweet Charlie	10010110	1010011
Toyonoka	00111011	0110111
Tudla	00110110	1011110

TABELA 12. Interpretação do padrão molecular obtido com *primers* SSR, por meio de 0 e 1, entre 10 genótipos desconhecidos de morangueiro. Cada coluna representa um loco, sendo considerado 0 a ausência de banda e 1 a presença. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Amostra	<i>Primer</i> MOR3	Identificação <i>Primer</i> MOR3	<i>Primer</i> MOR8	Identificação <i>Primer</i> MOR8	Identificação do cultivar
1	00110110	Cr, OG, Tu	0111110	OG, S	OG
2	11001010	D	0110111	D, To	D
3	10010110	SC	1010011	SC	SC
4	00110110	Cr, OG, Tu	0011110	Cr	Cr
5	00111110	Cp	1111111	NI	NI
6	00110110	Cr, OG, Tu	1011110	Tu	Tu
7	00111011	To	0110111	D, To	To
8	00111110	Cp	0111000	Cp	Cp
9	00110011	S	0111110	OG, S	S
10	11110110	NI	1010111	NI	NI

Cultivares: Cr: Camarosa, Cp: Campinas, D: Dover, OG: Oso Grande, S: Seascape, SC: Sweet Charlie, To: Toyonoka, Tu: Tudla. NI = Não identificado

Assim pode-se concluir que os marcadores SSR e RAPD foram coerentes na identificação molecular dos oito cultivares de morangueiro caracterizados neste trabalho. Além disso as amostras 5 e 10 que apresentaram padrões de amplificação diferenciado quando comparado com os oito cultivares de morangueiro caracterizados com ambos os marcadores. Essas foram apenas caracterizadas como não sendo semelhantes aos oito cultivares avaliados nesse estudo, sendo posteriormente informado pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda (Andradas, MG) que tais amostras eram os cultivares Aleluia e CampDover, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELL, J. A.; SIMPSON, D. W. The use of isoenzymes polymorphisms as an aid for cultivar identification in strawberry. *Euphytica*, Dordrecht, v. 77, n. 1/2, p. 113-117, 1994.

BETTI, J. A. Matrizes básicas IAC de morangueiro. *O Agrônomo*, Campinas, v. 52, n. 1, p. 28-29, 2000.

BOTELHO, J. S. A situação da cultura do morangueiro no estado de Minas Gerais. In: *Morango, tecnologia de produção e processamento*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 1., 1999, Pouso Alegre, MG. *Anais...* Pouso Alegre, 1999. p. 125-127.

BOXUS, P.; QUOIRIN, M.; LAINE, J. M. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Berlin: Springer-Verlag, 1977. Cap. 7, p. 130-143.

BRASIL. Lei n. 9. 456, 25 abr. 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1997. p. 15-30.

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

CAMARGO, L. S. *Novas variedades de morangueiro no estado de São Paulo*. 1960. 48 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba.

CAMARGO, L. S. Resultados experimentais obtidos com o morangueiro. *O Agrônomo*, Campinas, v. 15, n. 3/4, p. 1-6, mar./abr. 1963.

CAMARGO, L. S.; PASSOS, F. A. Morango. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. (Ed.) *O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo*. Campinas: IAC, 1993. v. 1, p. 412-432.

CENIS, J. L.; PEREZ, P.; FERERES, A. Identification of aphid (Homóptera; Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores RAPD e SSR mostraram-se eficientes para detectar polimorfismo entre os cultivares de morangueiro, podendo ser utilizados na análise de diversidade genética e na identificação dos cultivares comerciais.

A divergência genética detectada por meio de marcadores RAPD e SSR é coerente com o local de origem dos cultivares de morangueiro avaliados no presente estudo.

Para identificação dos oito cultivares são necessários apenas dois *primers* RAPD ou dois *primers* SSR, porém em função da maior confiabilidade e da existência de marcadores SSR, esses são mais indicados para os processos de identificação de cultivares de morangueiro.

Os marcadores SSR e RAPD foram coerentes na identificação molecular de oito cultivares desconhecidos de morangueiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELL, J. A.; SIMPSON, D. W. The use of isoenzymes polymorphisms as an aid for cultivar identification in strawberry. *Euphytica*, Dordrecht, v. 77, n. 1/2, p. 113-117, 1994.

BETTI, J. A. Matrizes básicas IAC de morangueiro. *O Agrônomo*, Campinas, v. 52, n. 1, p. 28-29, 2000.

BOTELHO, J. S. A situação da cultura do morangueiro no estado de Minas Gerais. In: *Morango, tecnologia de produção e processamento*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 1., 1999, Pouso Alegre, MG. *Anais...* Pouso Alegre, 1999. p. 125-127.

BOXUS, P.; QUOIRIN, M.; LAINE, J. M. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Berlin: Springer-Verlag, 1977. Cap. 7, p. 130-143.

BRASIL. Lei n. 9. 456, 25 abr. 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1997. p. 15-30.

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

CAMARGO, L. S. *Novas variedades de morangueiro no estado de São Paulo*. 1960. 48 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba.

CAMARGO, L. S. Resultados experimentais obtidos com o morangueiro. *O Agrônomo*, Campinas, v. 15, n. 3/4, p. 1-6, mar./abr. 1963.

CAMARGO, L. S.; PASSOS, F. A. Morango. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. (Ed.) *O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo*. Campinas: IAC, 1993. v. 1, p. 412-432.

CENIS, J. L.; PEREZ, P.; FERERES, A. Identification of aphid (Homóptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA.

Annals of the Entomological Society of America, Lanham, v. 85, n. 5, p. 545-550, Sept. 1993.

CHENG, F. S.; BROW, S. K.; WEEDEN, N. F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n. 5, p. 921-922, Aug. 1997.

COELHO, A. S. G. **BOOT**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2000. (Software).

CONGIU, L.; CHICCA, M.; CELLA, R.; ROSSI, R.; BERNACCHIA, G. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 229-232, Feb. 2000.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Estimativa de similaridade genética e identificação de cultivares do morangueiro por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 145-152, Mar. 2002a.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agrônômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 419-423, set. 2002b.

DAUBENY, H. Register of new fruit and nut varieties: strawberries. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 9, p. 960-964, Sept. 1994.

DAUBENY, H. Register of new fruit and nut varieties: strawberries. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 6, p. 1147-1148, Dec. 1995.

DEGANI, C.; ROWLAND, L. J.; LEVI, A.; HORTYNSKI, G. J.; GALLETTA, J. A. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 247-253, 1998.

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**, Dordrecht, v. 117, n. 1, p. 1-12, 2001.

DUARTE FILHO, J.; CUNHA, R. J. P.; ALVARENGA, D. A.; PEREIRA, G. E.; ANTUNES, L. E. C. Aspectos do florescimento e técnicas empregadas objetivando a produção precoce em morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 198, p. 30-35, maio/jun. 1999.

EFRON, B. **The bootstrap, the jackknife, and other resampling plants.** Philadelphia: Society of Indian Applied Mathematics, 1981. 138 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas.** 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA – CERNAGEN, 1998. 220 p.

GARCIA, M. G.; ONTIVERO, M.; DIAZ RICCI, J. C.; CASTAGNARO, A. Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. **Plant Breeding**, New York, v. 121, n. 1, p. 76-80, Feb. 2002.

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**, New York, v. 113, n. 4, p. 339-342, Dec. 1994.

GOMES, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeira.** 2002. 127 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 402-406, Aug. 1996.

GRECO, I.; MARTELLI, G.; SIMPSON, D. W. Isoenzymatic characterization of strawberry clones in southern Italy. **Acta Horticultural**, Wageningen, v. 345, p. 21-27, 1993.

GROPPO, G. A.; TESSAROLI NETO, J.; BLANCO, M. C. S. G. **A cultura do morangueiro.** Campinas: CATI, 1997. 27 p. (CATI. Boletim Técnico, 201).

GUSMÃO, M. T. A. **Análise do comportamento da cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) em condições de cultivo hidropônico.** 2000. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

HANCOCK, J. F.; CALLOW, P. A.; SHAW, D. V. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry, *Fragaria x ananassa*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 4, p. 862-864, July 1994.

HANCOCK, J. F.; SCOTT, D. H.; LAWRENCE, F. J. Strawberries. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding: vine and small fruits**. New York: John Wiley, 1996. v. 2, p. 419-470.

HARRISON, R. E.; LUBY, J. J.; FURNIER G. R.; HANCOCK, J. F. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (*Rosaceae*) from North America. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 84, n. 5, p. 612-620, May 1997.

HAYMES, K. M.; HENKEN, B.; DAVIS, T. M.; VAN DE WEG, W. E. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpfl) in the cultivated strawberry. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, n. 8, p. 1097-1101, Dec. 1997.

HOWARD, C. M.; ALBREGTS, E. E. 'Dover' Strawberry. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 4, p. 540, Aug. 1980.

JAMES, C. M.; WILSON, F.; HADONOU, A. M.; TOBUTT, K. R. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) for mapping, diversity studies and clone identification. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 171-173, June 2003.

KHANIZADEH, S.; BÉLANGER, A. Classification of 92 strawberry genotypes based on their leaf essential oil composition. **Acta Horticultural**, Wageningen, v. 439, n. 1, p. 205-209. 1997.

KUNIHISA, M.; FUKINO, N.; MATSUMOTO. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. **Euphytica**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 209-215, 2003.

LANDRY, B. S.; RONGQI, L.; KHANIZADEH, S. DIJKSTRA, J. Classification of 75 strawberry cultivars and breeding lines using RAPD markers. **Acta Horticultural**, Wageningen, v. 439, p. 101-105, 1997.

LEMAITRE, R.; LINDEN, R. **Le fraisier à gros fruits. Description et identification de variétés**. Gembloux: J. Duculot, 1968. 234 p.

LUBY, J. J.; HANCOCK, J. F.; CAMERON, J. S. Expansion of the strawberry germplasm base in North America. In: DALE, A.; LUBY, J. (Ed.). **The Strawberry into the 21st Century**. Portland, Oregon: Timber Press, 1991. p. 66-75.

MARIN, A. J.; COSTA, H.; BALBINO, J. M. S. Situação da cultura do morangueiro no Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO: morango: tecnologia de produção e processamento, 1., 1999, Pouso alegre. Anais... Caldas: EPAMIG, 1999. p. 131-133.

MINAMI, K. Biotecnologia e otimização da produtividade dos produtos hortícolas. In: CROCOMO (Ed.). **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: ESALQ/USP: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 173-187.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo – Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Instruções para Execução dos Ensaios de distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade de Cultivares de Morangueiro (*Fragaria* L.)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: maio 2005.

NEHRA, N. S.; KARTHA, K. K.; STUSHNOFF, C. Isozymes as markers for identification of tissue culture and greenhouse-grown strawberry cultivars. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 71, n. 4, p. 1195-1201, Oct. 1991a.

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**, Ottawa, v. 69, n. 2, p. 239-244, Feb. 1991b.

NIELSEN, J. A.; LOVELL, P. H. Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Fragaria x ananassa*). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 28, n. 2, p. 89-96, June 2000.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 9-18 (Embrapa Uva e Vinho. Documentos 37).

PARENT, J. G.; PAGÉ, D. Authentification des 13 cultivars de fraisier du programme de certification du Québec par l'analyse d'ADN polymorphe

amplifié au hasard (RAPD). *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 221-224, Jan. 1995.

PASSOS, F. A. **Influência de sistemas de cultivo na cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 1997. 105 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PASSOS, F. A. Melhoramento do morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO: Morango: tecnologia de produção e processamento 1., 1999, Pouso Alegre. **Anais...** Caldas: EPAMIG, 1999. p. 259-264.

POREBSKI, S.; CATLING, P. M. RAPD analysis of the relationship of North and South American subspecies of *Fragaria chiloensis*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 76, n. 10, p. 1812-1817, Oct. 1998.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; PASSOS, F. A.; SANTOS, R. R. Caracterização botânica de cultivares de morangueiro. *Bragantia*, Campinas, v. 55, n. 1, p. 29-44, 1996.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plant. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York, 1996. p. 75-134.

RAJAPAKSE, S.; HUBBARD, M.; KELLY, J. W.; ABBOTT, A. G.; BALLARD, R. E. Identification of rose cultivars by restriction fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 237-245, Nov. 1992.

REICHERT, L. J.; MADAIL, J. C. M. Aspectos sócio econômicos, In: SANTOS, A. M.; MEDIEROS, A. R. M. (Ed). **Morango – Produção**. Embrapa Informações Tecnológica, Brasília, p. 12-15, 2003.

RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 442-450, Aug. 1997.

SAKAI, K. New summer crop cultivars (II) – new cultivars registered by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in 1983. Strawberry. *Japanese Journal of Breeding*, Tokyo, v. 34, n. 1, p. 123-124, 1984.

SARGENT, D. J.; HADONOU, A. M.; SIMPSON, D. W. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v. 3, n. 4, p. 550-552, Dec. 2003.

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

SMULDERS, M. J. M.; BREDEMEIJER, G.; RUS-KORTEKAAS, W.; ARENS, A.; VOSMAN, B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 94, n. 2, p. 264-272, Feb. 1997.

STAUB, J. E.; MEGLIC, V. Molecular genetic markers and their legal for cultivar discrimination: a case study in cucumber. *HortTechnology*, Alexandria, v. 3, p. 291-300, 1993.

VIEIRA, F. C. A Cultura do Morangueiro. *Preços Agrícolas*, Piracicaba, v. 15, n. 183, p. 40-41, fev. 2001.

WEIR, B. S. *Genetic data analysis II*. 2. ed. and Exp. Sunderland: SINAUER ASSOCIATES, 1996. 445 p.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

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

www.cpact.embrapa.br Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 5 ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica Dez/2003. MADAIL, J. C. M.; REICHERT, L. J.; MIGLIORINI, L. C.

7. ANEXOS

Tabela 1A. Possíveis primers RAPD utilizados para diferenciar dois a dois, dos oito cultivares estudados. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Primer/	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
CV	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
	2	3	4	5	6	7	8	3	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	5	6	7	8	6	7	8	8
OPB07	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPB10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPB11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPB12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPB15	-	X	-	-	X	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPB19	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPE19	X	X	X	X	-	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPF07	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPG05	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPG10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPG18	-	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabela 1A Cont.

OPJ10	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
OPW06	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabela 2A. Possíveis *primers* SSR utilizados para diferenciar dois a dois, dos oito cultivares estudados. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2005.

Primer/	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	6	6	7	
CV	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	2	3	4	5	6	7	8	3	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	5	6	7	8	6	7	8	7	8	8	
MOR2	X	-	-	X	X	-	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	-	X	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	
MOR3	X	X	-	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	
MOR4	X	X	-	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X	X	
MOR6	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X
MOR7	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MOR8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
MOR9	X	X	X	-	-	-	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	-	-	X	-	X	X	

Quadro para diferenciar cultivares dois a dois, individualmente, onde "X" indica que o *primer* diferencia os cultivares e "-" não diferencia. Cultivares de morangueiro: 1) Camarosa, 2) Campinas, 3) Dover, 4) Oso Grande, 5) Seascape, 6) Sweet Charlie, 7) Toyonoka, 8) Tudla (Milsei).