

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO – PR

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES
COMERCIAIS, CRIOULAS E HÍBRIDOS DE
MORANGUEIRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JESSICA VANESSA WOSNIAK CORRÊA

GUARAPUAVA-PR

2019

JESSICA VANESSA WOSNIAK CORRÊA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES COMERCIAIS, CRIOULAS E
HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Professor. Dr. Paulo Roberto Da Silva

Orientador

Professor. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende

Coorientador

GUARAPUAVA-PR

2019

Jéssica Vanessa Wosniak Corrêa

"DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES COMERCIAIS, CRIOULAS E HÍBRIDOS
DE MORANGUEIRO"

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual do Centro-Oeste, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração em Produção
Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 6 de dezembro de 2019.



Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Bruna Saviatto Fagundes
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Renata Mussoi Giacomini
(UEL)

GUARAPUAVA-PR

2019

Aos meus pais

Moizés Balhs Corrêa

Jaqueline Leandro Wosniak

Dedico

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de mestrado, de muito estudo, esforço e dedicação, quero agradecer algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais essa conquista. Por isso, expresso aqui, por meio de palavras sinceras, minha eterna gratidão

Primeiramente quero agradecer a Deus por me conceder sabedoria e força para a realização desse sonho;

Agradeço também a minha família por todo amor, apoio e compreensão, ao serem privados em muitos momentos da minha companhia;

Minha gratidão ao Prof. Dr Paulo Roberto Da Silva, meu orientador, que se dedicou, e que por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e orientar e também por ser esse exemplo de pessoa e profissional a seguir;

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende, ao qual tenho grande admiração, por todo ensinamento passado e por sua amizade;

Aos membros do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal da Universidade Estadual do Centro Oeste, em especial as minhas colegas e amigas Léia Corrêa, Laura Pilati e Bruna Santos, e também a técnica Gabriela Gomes Weber, pela ajuda nas análises e na execução do trabalho e também pela grande amizade construída nesse tempo;

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Hortaliças, em especial ao Engenheiro Agrônomo Ricardo Antônio Zeist, Daniele Nascimento, Israel Lustoza e Renato Barros de Lima Filho, por toda ajuda, no manejo e pelas trocas de informações e também pela amizade construída, o meu muito obrigada.

E por fim, e não menos importante, agradeço ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), por todo suporte e apoio durante o mestrado, e também a todos os meus colegas de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Gerais	3
2.2 Específicos	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. Cultura do morangueiro	4
3.1.1 Origem e domesticação do morangueiro	4
3.3 Importância econômica.....	5
3.1.2 Taxonomia e características morfológicas	6
3.1.3 Aspectos fenológicos da cultura do morangueiro	9
1.2.1 Temperatura	9
1.2.2 Fotoperíodo.....	10
3.3 Melhoramento genético de morangueiro	11
3.4 Marcadores moleculares no melhoramento genético	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Genótipos avaliados	15
4.2 Extrações do DNA	18
4.3 Reação de amplificação dos marcadores ISSR e Eletroforese.....	19
4.4 Análise dos dados	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

Jessica Vanessa Wosniak Corrêa. **DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES COMERCIAIS, CRIOULAS E HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO.**

O cultivo do morangueiro vem ganhando importância na produção agrícola brasileira. Entretanto, ainda há entraves que limitam a maior produção da hortaliça no país. As mudas que são comumente utilizadas pelos agricultores têm pouca adaptabilidade as condições edafoclimáticas do país, o que influencia diretamente no desenvolvimento da cultura. Diante disso, os programas de melhoramento genético têm desenvolvido genótipos nacionais de maior adaptabilidade para as mais diversas regiões do país. A maioria destes materiais desenvolvidos no país ainda não foram caracterizados geneticamente. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular de 64 genótipos de morangueiro (cultivares comerciais, cultivares crioulas, híbridos simples, híbridos triplos de dia curto - HDC e híbridos triplos de fotoperíodo neutro HFN) mantidos e/ou desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento de Morangueiro da UNICENTRO (PMMU) e mostrar a relação genética entre os mesmo. Para as análises moleculares, o DNA de cada genótipo foi avaliado utilizando 10 *primers* ISSR (*Inter-simple sequence repeat*). Os *primers* ISSR amplificaram 147 bandas as quais foram utilizadas nas análises. A porcentagem de polimorfismo (100%) e os índices de diversidade de Nei ($h = 0,34$) e de Shannon ($I = 0,51$) evidenciaram alta variabilidade e diversidade, respectivamente, nos genótipos avaliados. As cultivares comerciais obtiveram o maior índice de diversidade ($h = 0,30$, $I = 0,46$), seguido dos HFNs ($h=0,27$, $I=0,41$). O dendrograma, obtido por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*, dividiu os genótipos em três grupos (Cultivares comerciais, crioulas e híbridos simples; HDC; HFN) evidenciando estruturação nos grupos de cultivares. Esta estruturação foi confirmada pela análise de coordenadas principais (PCoA) e análise Bayesiana. Na PCoA foi possível agrupar os indivíduos em três grupos e na análise Bayesiana a diversidade presente mostrou-se melhor explicada quando do agrupamento dos genótipos em dois grupos genéticos ($K = 2$). A análise conjunta dos dados evidencia alta variabilidade, diversidade e estruturação genética dos genótipo avaliados e indicam eficácia do PMMU no desenvolvimento de genótipos com características genéticas diferenciadas em relação às cultivares disponíveis no mercado.

Palavras-Chave: ISSR, Marcadores moleculares, Melhoramento, Morango.

ABSTRACT

Jessica Vanessa Wosniak Corrêa. **GENETIC DIVERSITY OF COMMERCIAL CULTIVARS, CREOLA CULTIVARS AND STRAWBERRY HYBRID**

The strawberry has been increasing its importance in Brazilian agricultural production. However, there are still entries that delimit the largest fruit production in the country. As the seedlings that are commonly used by farmers have little adaptability to the photoperiod and temperature of the country, which directly influences the crop development. Given this, the breeding programs develop national genotypes of greater adaptability for the most diverse regions of the country. Most of these materials produced in the country have not yet been genetically characterized. Therefore, the objective of this work was the molecular characterization of 64 strawberry genotypes (commercial cultivars, creole cultivars, single hybrids, short day triple hybrids - HDC and triple neutral day hybrids - HFN) maintained and / or developed by the Strawberry Breeding Program from UNICENTRO (PMMU). For molecular analysis, DNA from each genotype was amplified using nine ISSR (Inter-simple sequence repeat) primers. ISSR primers amplified 147 bands as which were used in the analyzes. A percentage of polymorphism (100%) and diversity indexes of Nei ($h = 0.32$) and Shannon ($I = 0.48$) show high variability and diversity, respectively, in the genotypes. As commercial cultivars, they shown the highest diversity index ($h = 0.30$, $I = 0.47$), followed by HFNs ($h = 0.29$, $I = 0.44$). The dendrograma divided the genotypes into three groups (commercial cultivars and creole cultivars and simple hybrids; HDC; HFN) shows the structuring in the genotypes. This structure was confirmed by the principal coordinate analysis (PCoA) and Bayesian analysis. In PCoA it was possible to group the genotypes into three groups and to analyze Bayesian the present diversity was better explained by grouping the genotypes in two genetic groups ($K = 2$). A joint analysis of the data shows high variability, diversity and genetic structure of the strawberry genotypes from PMMU and in the development of hybrid lines with different genetic characteristics compared to commercially available cultivars.

Keywords: ISSR, Molecular markers, Breeding, Strawberry

1. INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) atualmente cultivado é um híbrido das espécies *Fragaria chiloensis* (L.) Mill com *Fragaria virginiana* Duch. Apreciado por seu gosto e aroma o morango se destaca no mercado para consumo *in natura*, como geleias, sucos ou em iogurtes. Em função desta excelente aceitação, este pseudofruto conquistou um espaço importante no setor agrícola no mundo, especificamente, no setor de horticultura.

Pertencente à família Rosaceae, o morangueiro origina um pseudofruto succulento por meio de uma flor com vários ovários. Cada ovário forma um fruto verdadeiro, formando assim, vários pontos pequenos conhecidos como aquênios (ANTUNES, 2011). Apesar das flores monoclinas, em geral, serem auto polinizadas, necessitam das abelhas na área de produção para polinização (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2016). O morangueiro é considerado planta perene, tem caule rizoma estolhoso, cilíndrico que se ramifica e emite as folhas trifoliadas, formando as coroas (PALHA *et al.*, 2005).

O morangueiro passou por inúmeras modificações genéticas pelo melhoramento, até chegar nas cultivares que atualmente são comercializadas. No princípio, na Europa, a principal finalidade do morangueiro era ornamental sendo cultivada no jardim de Louvre na França (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2019). No decorrer do tempo, os botânicos e médicos da época encontraram no morango algumas características medicinais impulsionando o cultivo dessa hortaliça. Com o consumo em alta, primeiramente a Inglaterra investiu em melhoramento genético, seguida de França, Alemanha e Estados Unidos (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2019).

A produção mundial do morangueiro está em torno de nove milhões de toneladas (t) e tem a China como maior produtora do mundo (quatro milhões t), seguido dos EUA (1,5 milhões t) e México (660 mil t) (FAO, 2017). A área cultivada de morango no Brasil é de aproximadamente 4300 ha, chegando a uma produção de 155 mil toneladas, com produção média de 36, 1 toneladas/ha (FAGHERAZZI, 2017). Apesar de nos últimos 12 anos, a área cultivada ter aumentado em 50%, a baixa produtividade no país, se comparada aos grandes produtores mundiais, se deve à escassez de programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares adaptadas as condições edafoclimáticas do Brasil. O uso na maioria da vezes, de cultivares importadas com baixa adaptabilidade as condições edafoclimáticas do país tem mantido a baixa produtividade do morangueiro no Brasil (FAGHERAZZI, 2017).

Um programa de melhoramento genético de morangueiro atua no desenvolvimento de novas cultivares que atendam a demanda de produtores e de mercado, podendo aumentar a produtividade e a importância da cultura no país (ZEIST; RESENDE, 2019). Atualmente as cultivares utilizadas pelos produtores brasileiros provêm de programas de melhoramento genético americano, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de genótipos nacionais para diminuição dos custos de produção e maior produtividade (ZEIST; RESENDE, 2019). Neste sentido, no Brasil o principal objetivo dos programas de melhoramento é o desenvolvimento de cultivares que tenham adaptabilidade as condições edafoclimáticas do país e resistência a pragas e doenças (ZEIST; RESENDE, 2019).

O conhecimento da variabilidade genética existente em um banco de germoplasma é de grande importância para o melhorista planejar cruzamentos. Neste sentido, os programas de melhoramento contam com ferramentas biotecnológicas, como os marcadores moleculares, que podem auxiliar na caracterização genética dos genótipos disponíveis (BONOW; OLIVEIRA, 2016). A grande vantagem dos marcadores moleculares baseados na análise do DNA é a capacidade de analisar o germoplasma de interesse sem interferência do ambiente (FALEIRO, 2007). Atualmente, existem vários marcadores moleculares que tem sido utilizados para o estudo da variação genética do morangueiro, e dentre estes os *Inter-simple sequence repeat* (ISSR) merecem destaque pela alta confiabilidade, polimorfismo e simplicidade na execução (BONOW; OLIVEIRA, 2016).

O Programa de Melhoramento de Morangueiro da UNICENTRO (PMMU) desenvolveu uma série de híbridos simples e triplos, oriundos de diferentes cruzamentos, que ainda não foram caracterizados quanto a sua diversidade e relação genética com cultivares comerciais e crioulas. Neste sentido o uso de marcadores moleculares ISSR torna-se uma ferramenta importante para responder perguntas como: 1. Existe variabilidade e diversidade genética no germoplasma de morangueiro do PMMU? 2. Os híbridos triplos desenvolvidos pelo PMMU são geneticamente distintos das cultivares disponíveis atualmente no mercado? 3. Os híbridos triplos de dia curto desenvolvidos pelo PMMU são geneticamente distintos dos híbridos triplos de fotoperíodo neutro também desenvolvidos por este programa? Neste sentido, este trabalho procurou responder estas perguntas para auxiliar na obtenção de novas cultivares brasileiras de morangueiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Avaliar a relação genética de cultivares comerciais, genótipos crioulos e de híbridos de morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch.).

2.2 Específicos

- Estimar a relação genética, por meio da variabilidade e diversidade genética, de 64 genótipos de morangueiro do programa de melhoramento da UNICENTRO;
- Estabelecer a divergência genética de dois grupos de híbridos triplos de morangueiro, desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento da UNICENTRO, com cultivares comerciais e crioulas e híbridos simples;
- Avaliar a estrutura genética de cultivares comerciais, crioulas e híbridos de morangueiro mantidas no PMMU.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Cultura do morangueiro

3.1.1 Origem e domesticação do morangueiro

A origem do morangueiro é incerta, pois não há relato da espécie em escrituras antigas sobre espécies vegetais como as de Teofrasto, Hipócrates, Dioscórides e Galeno (DUCHESNE, 1766). Porém, alguns materiais arqueológicos evidenciam que os morangos estão sendo consumidos desde a idade da pedra (VERGAUWEN; SMET, 2019). Os primeiros relatos da cultura apareceram em 1300 na Europa. Nessa época, o morango era conhecido como *fraise* de boi, sua inflorescência era tão admirada que foi considerada inicialmente ornamental. Assim, em 1368 o rei Carlos V começou o cultivo do morangueiro no jardim de Louvre, em Paris, que continham mais de 1200 plantas (DARROW *et al.*, 1966). O consumo do fruto começou quando perceberam que eram saborosos, isso agradou paladares europeus e ingleses. Com isso, em 1500, a cultura se expandiu e isso atraiu interesse de botânicos e médicos que descobriram que o morango possuía características medicinais, fazendo aumentar a demanda pelo produto, impulsionando assim o cultivo da espécie na Inglaterra (DARROW *et al.*, 1966).

A etapa mais importante da história do morango cultivado atualmente, ocorreu no século XVII, quando a espécie de morangueiro *Fragaria virginiana*, foi inserida na Europa. No mesmo período, o clone de *Fragaria chiloensis* foi desenvolvido por produtores rurais, que descobriram que a espécie apresentava inúmeras variações que, mais tarde, seriam importantes para o desenvolvimento de novas cultivares. Posteriormente a esse período, essas espécies foram cruzadas e originaram, por meio do melhoramento casual, o híbrido *Fragaria* × *ananassa*. Este híbrido tinha uma característica marcante que era o cheiro e aroma de abacaxi (*ananassa*), por isso foi denominado de morango ananás. A partir desse período, o melhoramento genético realizado pelos ingleses, deu origem as primeiras cultivares na Europa. Com o sucesso comercial da espécie na Europa, países como a França e Estados Unidos iniciaram os primeiros programas de melhoramento genético do morangueiro o que permitiu a cultivo da espécie em diversas regiões do mundo (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2016).

3.3 Importância econômica

O morangueiro é consumido pelo homem desde a antiguidade, e atualmente é consumido *in natura*, e também como processados. Em sua composição estão descritos mais de 360 produtos fitoquímicos voláteis como furanonas, ésteres, terpenóides, compostos de enxofre e benzenóides e também antocianinas que são benéficos para a saúde humana (VERGAUWEN; SMET, 2019).

A produção de frutos no mundo é bastante diversificada devido ao melhoramento genético, que permitiu o cultivo de algumas espécies em várias regiões do mundo. Sendo que, o morangueiro é cultivado em 76 países com produção mundial de nove milhões de toneladas. A China detém o título de maior produtor com produção de aproximadamente quatro milhões de toneladas, seguida dos EUA com cerca de 1,5 milhões de toneladas e México com 660 mil toneladas (FAO, 2017).

No Brasil, a expansão do cultivo do morangueiro, começou em 1960 quando foi desenvolvida a cultivar Campinas. Os primeiros cultivos foram realizados em hortas caseiras, sua maior relevância foi a produção comercial no estado de São Paulo. Logo após, alguns estados como Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina, Distrito Federal e Rio de Janeiro, passaram a produzir e comercializar o fruto (ANTUNES, 2016).

A área cultivada de morango no Brasil é de aproximadamente 4300 ha, chegando a uma produção de 155 mil toneladas, gerando uma produção média de 36, 1 toneladas/ha (FAGHERAZZI, 2017). A baixa produtividade do país, se comparada aos grandes produtores mundiais, se deve à escassez de programas de melhoramento ativos para o desenvolvimento novas cultivares nacionais. Ainda assim, nos últimos 12 anos, a área cultivada do pseudofruto aumentou em torno de 50% (FAGHERAZZI, 2017).

Os maiores produtores de morango no Brasil são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Distrito Federal (FACHINELLO *et al.*, 2011). No Estado de Minas Gerais, as cidades mais produtivas são Pouso Alegre, Estiva e Cambuí, com área total plantada de 1500 ha. No estado de São Paulo, a produção fica concentrada nos municípios de Piedade, Campinas, Jundiaí e Atibaia e alguns municípios próximos que, juntos cultivam aproximadamente 800 ha de morango. No Rio Grande do Sul a principal região produtora de morango é o Vale do Rio Caí, seguido de Caxias do Sul e Farroupilha (ANTUNES; REISSER JUNIOR, 2007).

No Paraná, em 1999, a produtividade do estado chegou a 22,5 mil kg ha⁻¹, se compara com a produção de 2010, o aumento foi de 44% chegando a produzir 26,8 kg ha⁻¹ (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2016). Segundo a SEAB (2017) a área cultivada de morango no Paraná foi 725 ha com a produção de 26,1 mil toneladas. Já em 2018, o aumento da produção foi aproximadamente 15% chegando a 30,15 mil toneladas, em 861 ha produzidos (SEAB, 2018).

Na safra de 2017, a região metropolitana de Curitiba foi a maior produtora estadual de morango com 11,340 mil (43,4%) toneladas em 260 ha, seguida de Jacarezinho com 77,01 mil toneladas (29,5%) em 175 ha, e em terceiro lugar Ponta Grossa com 1,68 mil toneladas (6,4%) em 60 ha (SEAB, 2017). O município de Guarapuava ficou com 2,5% da produção estadual, com cerca de 670 toneladas (SEAB, 2017).

Apesar da cultura do morangueiro estar em ascensão no Brasil, o custo de cultivo do morangueiro é alto e a produção limitada devido ao preço das mudas, que são importadas, e a problemas de adaptação das cultivares estrangeiras as condições edafoclimáticas do país. Neste sentido, é necessário um esforço dos programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares nacionais adaptadas as diversas regiões do Brasil.

3.1.2 Taxonomia e características morfológicas

O morangueiro atualmente cultivado, *F. x ananassa*, é considerado um híbrido octaplóide e possui 56 cromossomos ($2n = 8x = 56$). Segundo o sistema de classificação APG IV, o morangueiro está inserido na divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Magnoliopsida, ordem Rosales, família Rosaceae e gênero *Fragaria* (CHASE *et al.*, 2016). Existem no mundo cerca de 20 espécies do gênero *Fragaria*, que compreende desde espécies diploides até octaplóides. A teoria do surgimento dos híbridos octaplóides seria uma combinação de outros diploides encontrados no continente europeu e asiático. Comumente as espécies octaplóides são geograficamente restritas ao Novo Mundo e estão distribuídas na região do continente norte americano, exceto a espécie *F. chiloensis* que fica mais próxima do Chile e das ilhas do Haváí (JOHNSON; GOVINDARAJULU; ASHMAN, 2014).

A espécie *F. virginiana* possui diversas variedades botânicas, e algumas características importantes desta espécie apareceram em vários clones. Caracteres morfológicos podem ser observados em cultivares norte americanas que são resistentes a

baixas ou elevadas temperaturas (DARROW *et al.*,1966). Nos Estados Unidos, são encontradas cultivares com adaptação a fotoperíodo longo e clima mais árido. Com relação a floração, tem-se cultivares mais suscetíveis e resistentes à temperaturas e frio extremo. Essa variabilidade genética permite selecionar características ideais de acordo com os objetivos do melhoramento genético (DARROW *et al.*,1966). A *F. chiloensis*, detém grande variação morfológica, e também é considerada octaplóide. Tem como característica importante a resistência a baixas temperaturas e fotoperíodo longo e curto, e também produzindo bem em regiões semiáridas. As flores toleram bem ao frio, e geram frutos firmes e grandes, com coloração vermelho-escuro e a polpa branca (HANCOCK *et al.*, 2010).

Considerada planta herbácea, o morangueiro cultivado apresenta caule semi-subterrâneo denominado coroa, que dará origem às folhas que é constituída por um pecíolo longo e três folíolos (Figura 1.A) (TIMM *et al.*, 2009). Estas, por sua vez, são do tipo helicoidais variando em cor e formato conforme a cultivar. Nas folhas existem de 300 a 400 estômatos, tornando-a sensível a falta de água, temperaturas extremamente altas e umidade relativa do ar baixa (TIMM *et al.*, 2009).

Os estolões são caules verdadeiros que permitem que a formação de outras plantas (Figura 1.B). Geralmente a emissão dos estolões ocorre em altas temperaturas (maior que 20°C), na fase vegetativa, num tempo de aproximadamente duas semanas após a formação inicial das folhas (RONQUE, 1998). Seu crescimento em direção ao solo emite raízes dando origem a novas plantas, sendo o mais utilizado para a multiplicação vegetativa do morango (TIMM *et al.*, 2009). Segundo Guimarães *et al.* (2015), entre Aromas, Camarosa, Campinas, Diamante, Dover, Festival, Oso Grande e Toyonoka, a maior emissão de estolões ocorre na cultivar Festival, seguida de Camarosa, com 21 e 20 estolões por planta, respectivamente. Já, a cultivar Diamante obteve menor número de estolão.

As raízes são fasciculadas e podem chegar a 20 cm do solo. Normalmente, uma planta adulta possui até 100 raízes primárias, que penetram no solo. As secundárias absorvem nutrientes e água, e atuam também como acumuladoras de reservas (PALHA *et al.*, 2005).

A transformação da fase floral para a fase reprodutiva passa por diversos estágios fisiológicos alterando a morfologia do meristema apical passando do estado vegetativo para o estado reprodutivo (NERI *et al.*, 2010). A flor do morangueiro apresenta pistilos (Figura 1C), sendo importante na polinização por inseto, sendo que podem não ser fecundados e geram frutos deformados (BUCCI *et al.*, 2010). As flores são andróginas e

possuem cálice geralmente pentâmero (Figura 1.C). Os estames podem apresentar filamentos longos e curtos e podem ter mais que 20, e estão localizados ao redor do receptáculo. Os pistilos pode chegar à 400 e são dispostos em forma de espiral (BORTOLOZZO *et al.*, 2007).

Considerado um pseudofruto (fruto com múltiplos aquênios), o morango é originado por meio de uma única flor (dialicárpico) (Figura 1D) (HOFFMANN; BERNARDI, 2006). Recentemente, alguns pesquisadores identificaram uma estrutura botânica hypsofilica na cultivar Albion e Camarosa que não está incluída nos catálogos morfológicos sugerindo uma proteção ao fruto (COSTA *et al.*, 2019).

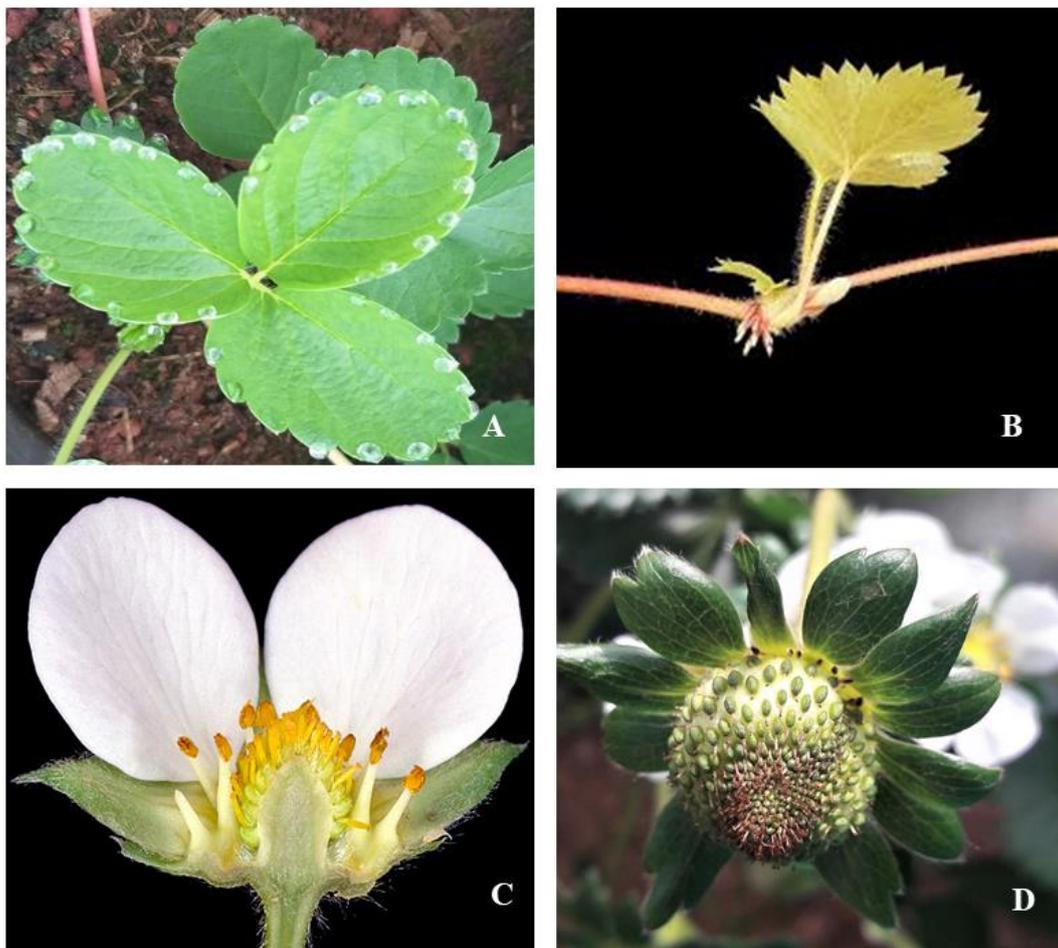


Figura 1. Aspectos fenológicos do morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch.). A) Folha trifoliada do morangueiro; B) estolão; C) Estrutura floral do morangueiro; D) Fruto jovem. Fonte: B e C adaptadas de Web e Vincentz, 2019; A e D da autora.

3.1.3 Aspectos fenológicos da cultura do morangueiro

O morangueiro é considerado um híbrido que tem adaptação em regiões com altitudes maiores que 3000 metros, com variações de temperatura como frio intenso a altas temperaturas. Assim, os fatores ambientais, como temperatura e fotoperíodo, são de extrema importância, pois determinam o desenvolvimento do pseudofruto e influenciam no armazenamento de carboidratos e síntese de hormônios (HOFFMANN, 2006; BERNARDI, 2006). Alterações climáticas levam a mudanças no aspecto reprodutivo do morangueiro. Ainda, a junção dos fatores ambientais (temperatura e fotoperíodo) aliado com o genótipo do híbrido, controlam processos fisiológicos da planta, como diferenciação celular, quebra da dormência, indução floral, formação de estolões e também causa modificações anatômicas na área foliar (MASSA *et al.*, 2008; NISHIYAMA; KANAHAMA, 2009).

1.2.1 Temperatura

O desenvolvimento da cultura de morangueiro, pode ser limitado pela temperatura, ao qual interfere na qualidade do fruto e na produção a (FILGUEIRA, 2003; COCCO, 2010). O efeito da temperatura do ar sobre as plantas é determinado com o método da soma térmica, que influencia os estágios de desenvolvimento do morangueiro (TAZZO *et al.*, 2015).. No morangueiro existe variação de resposta para a quantidade de horas de soma térmica, possibilitando pelo melhoramento genético, obter genótipos melhores adaptados a diferentes regiões com diferentes padrões de soma térmica (TAZZO *et al.*, 2015). A temperatura pode retardar ou parar a formação da flor ou induzir a formação de estolões. Para que o florescimento do morangueiro seja satisfatório, é necessário que a planta supra as horas de frio necessárias para a indução floral (MARTINS *et al.*, 2009). De modo geral, as exigências de frio varia de 380 horas á 700 horas acumuladas de temperatura (entre 2°C e 7°C) (RONQUE, 1998).

Em condições de temperaturas abaixo de 15 °C a produção de flores cessa e a planta começa a reservar substâncias, porém quando a temperatura é muito alta (acima de 25°C) ocorre o processo de crescimento vegetativo e emissão de estolões (RONQUE, 1998). Estudos relatam que determinadas cultivares quando submetidas a altas temperaturas apresentam modificações morfológicas como diferença no comprimento do pecíolo e área foliar expandida (BRADFORD; HANCOCK; WARNER, 2010). Levando

em consideração a temperatura se pode afirmar que a região ideal para o cultivo do morangueiro deve ter temperatura média abaixo de 25°C durante o verão o que ocorre em regiões com altitude acima de 900 metros (ALMEIDA *et al.*, 2009) ou em regiões temperadas.

1.2.2 Fotoperíodo

Além da temperatura, a quantidade recebida de luz também influencia a fisiologia do morangueiro. As Cultivares de fotoperíodo neutro independe da quantidade recebida de luz apresentam floração contínua em qualquer época do ano, desde que tenha temperaturas menores de 30°C (CASTRO *et al.*, 2002). Também, um híbrido classificado como fotoperíodo neutro, diminuirá sua produção em condições de altas temperaturas (acima de 22 °C).

Cultivares consideradas de dia curto florescem quando o comprimento do dia é menor que 14 horas, e a temperatura for menor que 15°C (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2016). Contudo o maior atraso na formação da flor ocorre quando as plantas de morango são submetidas à temperatura de 9°C (SONSTEBY; HEIDE, 2017). A elevação da temperatura pode interferir no acúmulo dos sólidos solúveis e no brix, tornando os morangos ácidos, com menor sabor e aroma. Portanto, a planta necessita de temperatura diurna amena (em torno de 20°C) e noturna mais baixa (em torno de 15°C) (FILGUEIRA, 2002). Esta condição é clara quando observado que os frutos produzidos em regiões de clima temperado são mais adocicados e com aroma mais agradável quando comparado ao produzidos em climas tropicais (KOHLENER, 2010)

A formação de estolões foi relatada como dependente do fotoperíodo, sendo favorecida por dias longos (DARROW, 1936; BRADFORD; HANCOCK; WARNER 2010). Strassburger *et al.* (2010), estudaram diferentes densidades de plantas de morangueiro, e observou que quanto maior a interferência sobre a radiação solar, menor será a área foliar, produção de fruto e formação de massa seca e como consequência, redução do tamanho da coroa. Estes dados reforçam a importância do fotoperíodo quanto à síntese de carboidrato. Durner *et al.* (2016), estudaram o florescimento de cultivares de dia curto e dia neutro. Neste estudo, as cultivares foram submetidas a diferentes fotoperíodos (9h, 16h) e diferentes temperaturas (18°C; 22°C; 26°C e 30°C). As plantas classificadas com dias curtos obteve floração superior quando submetidas à temperatura de 18°C.

Cultivares de fotoperíodo neutro, não sofreram o efeito do fotoperíodo a 18°C. A emissão de estolões foi favorecida em temperaturas mais altas e dia longo.

Com relação à resposta fotoperiódica, o morangueiro pode ser dividido em três grupos: cultivares de dia neutro, dia curto e dia longo (DURNER, 2016). No Brasil eram utilizadas somente cultivares de dia curto, no entanto, nos últimos 15 anos, cultivares de dia neutro foram incorporadas nos cultivos do país.

Atualmente, as mudanças abióticas geram uma demanda de novas cultivares com adaptabilidade para as mais variadas condições edafoclimáticas do mundo. Neste sentido, é necessário o investimento nos Programas de Melhoramento para desenvolvimento de novas cultivares que atendam as condições climáticas favoráveis da região que for inserida tanto no presente como em condições futuras (SIMPSON, 2018).

3.3 Melhoramento genético de morangueiro

O início do melhoramento genético surgiu de modo casual, quando os franceses começaram a cultivar *F. chiloensis* e *F. virginiana* lado a lado permitindo a polinização cruzada (VERGAUWEN; SMET, 2019). Mais tarde, em 1817, iniciou de modo formal na Inglaterra, por Thomas A. Knight, o cultivo melhorado de clones de *F. virginiana* e *F. chiloensis* obtidos em seus cruzamentos (DARROW *et al.*, 1966). Este melhorista foi o mais ativo da época, pois lançou várias cultivares importantes, dentre elas 'Noble' e 'Royal Sovereign'. Inúmeros países europeus incentivam o melhoramento do morangueiro por meio de programas de melhoramento genético, sendo os mais importantes localizados na França, Itália, Holanda, Espanha e Reino Unido. Já nos países americanos, os programas de melhoramento mais ativos estão localizados nos EUA, na Universidade da Califórnia em Davis e na Universidade da Flórida (MEZZETTI *et al.*, 2018)

O morangueiro ganhou espaço no setor agrícola brasileiro em 1920, nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Nesta época as mudas eram oriundas dos Estados Unidos e da Europa, o que limitava a produtividade e crescimento da área cultivada devido à baixa adaptação para solo e clima brasileiro. Em meados de 1941, teve início o programa de melhoramento de morangueiro do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, SP. Este programa lançou as primeiras cultivares melhores adaptadas as condições de solo e clima do Brasil, que conseqüentemente, elevou a produtividade e qualidade dos morangos colhidos em solo nacional. As primeiras cultivares lançadas por este programa foram Campinas, Guarani, Monte Alegre e Princesa Isabel. Também, no mesmo período

iniciou o programa de melhoramento da EMBRAPA que lançou as cultivares Santa Clara, Konvoy-Cascata e Vila Nova. Mais tarde, estas cultivares foram substituídas por cultivares americanas com melhores características comerciais (ZEIST; RESENDE, 2018). Atualmente, a maioria das cultivares utilizadas pelos produtores brasileiros vem de programas de melhoramento americanos, especialmente desenvolvidos na Universidade da Califórnia em Davis (BONOW; OLIVEIRA, 2016).

Os principais objetivos de um programa de melhoramento são maior produtividade, resistência a pragas e doenças, cor dos pseudofrutos, menor número de estolões bem como diminuir perdas pós-colheita (ZEIST; RESENDE, 2019). A maioria destas características está relacionada em aumentar a capacidade adaptativa do morangueiro às condições edafoclimáticas das diferentes regiões de cultivo da espécie (ZEIST; RESENDE, 2019). Neste sentido, o Programa de Melhoramento de morangueiro da UNICENTRO (PMMU), que é desenvolvido em parceria com a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Universidade Estadual de Londrina (UEL) têm como objetivo a disponibilização de cultivares adaptadas as diversas regiões de cultivo no Brasil, com ênfase na Região Centro-Sul do Paraná (ZEIST; RESENDE, 2019).

O sucesso de um programa de melhoramento depende de quão diverso é seu banco de germoplasma, pois é a partir destes que será possível, por meio de cruzamentos, a obtenção de cultivares com novas combinações gênicas com potencial de melhor adaptação a uma região específica (ZEIST; RESENDE, 2019). Ainda, um passo essencial para um programa de melhoramento é o entendimento da base genética disponível. O conhecimento desta base genética auxiliará no planejamento de cruzamentos, como também no posicionamento genético de genótipos já desenvolvidos frente as cultivares já disponíveis no mercado. Dentre as técnicas disponíveis para caracterização genética de um banco de germoplasma, o uso de marcadores moleculares tem sido a mais indicada e mais utilizada. O uso de marcadores moleculares possibilita estimar a variabilidade e relação entre genótipos avaliando diretamente o DNA, sem influência ambiental (MILACH, 1998).

3.4 Marcadores moleculares no melhoramento genético

Atualmente, existem vários marcadores moleculares que são utilizados para o estudo da variação genética do morangueiro, como o *Random Amplified Polimorphic DNA* (RAPD), *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *Inter simple sequence repeat* (ISSR) e microssatélites (*Simple Sequence Repeat – SSR*) (BONOW; OLIVEIRA, 2016).

Em estudos de genética molecular em morangueiro, primeiramente foi utilizado os marcadores RAPDs, que devido à baixa reprodutibilidade caiu em desuso com o desenvolvimento de outros marcadores mais robustos como AFLP, ISSR e microssatélites (WHITAKER, 2011). Dentre estes marcadores, os ISSR são considerados os mais práticos, pois os mesmos combinam a simplicidade do RAPD com a reprodutibilidade e alto polimorfismo dos microssatélites (WHITAKER, 2011).

Os marcadores ISSR são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando um único *primer* (16 - 20 pb), construídos a partir de sequências de microssatélites, entre duas regiões de repetição idênticas, porém em sentidos opostos (PRADEEP REDDY *et al.*, 2002). As vantagens desse marcador é de gerar grande número de bandas informativas e também não é necessário dados prévias da sequência de DNA da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007). Esse marcador foi eficiente na diferenciação de 82 híbridos de morangueiro possibilitando a seleção de grupos de híbridos para avaliação em campo (NUNES *et al.*, 2013). Também, este marcador foi utilizado para identificar a uniformidade genética de plantas de morangueiro micropropagadas e a relação destes com a planta matriz (SEN; DHAWAN, 2010). Ainda, os ISSR foram eficientes para agrupar cultivares de morangueiro de acordo com a genealogia (MORALES *et al.*, 2011). Atualmente os marcadores ISSR continuam sendo amplamente utilizados na caracterização genética de morangueiros.

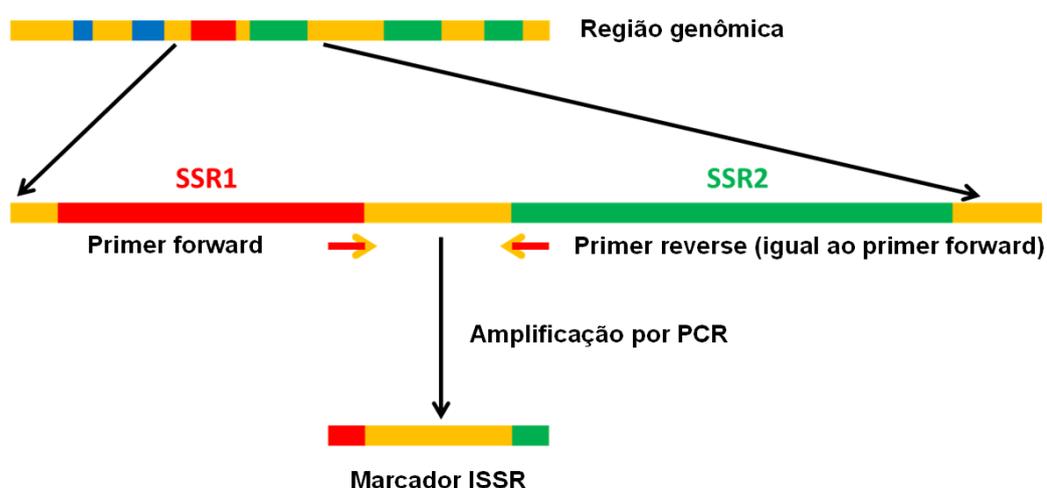


Figura 2. Esquemática da região amplificada por um *primer* ISSR. Adaptado de Plant Molecular Biology Lab, IPB, Bogor, 2019.

O PMMU mantém um banco de germoplasma formado por cultivares comerciais e crioulas de morangueiro e também híbridos simples e triplos desenvolvidos pelo próprio programa. O objetivo do PMMU é o desenvolvimento de cultivares de morangueiro com melhor adaptação as condições edafoclimáticas da região Centro Sul do Paraná bem como para outras regiões do Brasil com clima quente. Nesse sentido, os melhoristas do PMMU tem realizado diversos cruzamentos que originaram híbridos simples e triplos que ainda não foram caracterizados geneticamente utilizando marcadores moleculares. Diante disso, neste trabalho foi investigado a diversidade genética do banco de germoplasma do PPMU bem como investigada a relação genética entre as cultivares comerciais e crioulas com híbridos simples e triplos desenvolvidos e mantidos por este programa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Genótipos avaliados

Neste trabalho foram avaliados 64 genótipos de morangueiro pertencentes a cinco grupos sendo: cultivares comerciais, genótipos crioulos, híbridos simples, híbridos triplos para dia curto (HDC) e híbridos triplos para fotoperíodo neutro (HFN). As cultivares comerciais selecionadas para o trabalho são, atualmente, cultivadas no Brasil e possuem alto potencial de produção. Os genótipos crioulos foram coletados de produtores no estado de Minas Gerais e foram obtidos a partir de cruzamentos aleatórios por estes produtores. Os híbridos simples foram obtidos por cruzamento e seleção pelo PMMU. Os HDC e HFN foram obtidos por Zeist (2019) da seguinte maneira: foram utilizados como genitores femininos as cultivares Camino Real, Monterey e Albion. Como genitores masculinos foram utilizados os híbridos simples: Híbrido 16 (cruzamento entre as cultivares Camarosa e Aromas), Híbrido 07 (cruzamento entre as cultivares Festival e Sweet Charlie), Híbrido 06 (cruzamento entre as cultivares Festival e Sweet Charlie), Híbrido 11 (cruzamento entre as cultivares Dover e Aromas), Híbrido 44 (cruzamento entre as cultivares Camarosa e Sweet Charlie) (Tabela 1). Para o desenvolvimento destes híbridos o processo de hibridização ocorreu no período da antese. Após a formação do pseudofruto, os aquênios foram retirados, secos e armazenados em dessecador a 25 °C. Antes da germinação, para quebra da dormência, os aquênios passaram por escarificação ácida por imersão em H₂SO₄. Também, os aquênios foram submetidos ao processo de embebição com Indol-3-butírico (AIB), e logo após foram transferidos para câmara de crescimento. Após 40 dias, as plantas recém germinadas foram transplantadas em bandejas de 50 células contendo substrato. Após 30 dias, as mudas de morangos foram transferidas para câmara fria para o processo de vernalização. Após 30 dias, as mudas foram levadas para o campo e feito todos os manejos da cultura até a época da colheita. Ao total, foram levadas 1800 híbridos para o campo, porém somente 80 foram selecionados. A seleção de genótipos pelo programa de melhoramento genético ocorreu por seleção de frutos comerciais (≤ 35 mm) e não comerciais (< 35 mm). Com isso, calculou-se a massa total de frutos (MTF g planta⁻¹), massa de frutos comerciais (MFC g planta⁻¹), massa de frutos não comerciais (MFNC g planta⁻¹) e massa média de frutos (MMF g fruto⁻¹) de cada planta (Zeist, 2019). Desses 80

híbridos triplos foram selecionados os 40 melhores para as análises moleculares, sendo 20 classificados por Zeist (2018) como HDC e 20 como HFN.

Na Tabela 1 consta a relação de todos os genótipos utilizados neste trabalho e seus respectivos *pedigrees*. A representação do *pedigree* segue a regra da nomenclatura internacional para representação de cruzamentos: a esquerda está o doador de pólen, e a direita o receptor. O número de barras (/) representa a ordem dos cruzamentos, sendo uma barra (/) o primeiro cruzamento, duas barras (//) o segundo cruzamento e assim sucessivamente.

Tabela 1. Relação dos 64 genótipos de morangueiros (*Fragaria* × *ananassa*) utilizados para análise de variação genética utilizando marcadores ISSR com seus respectivos genitores e classificação fotoperiódica.

Cultivares comerciais	<i>Pedigree</i>	Fotoperíodo	Origem
Oso Grande	Parker / ‘Cal. 77.3-603’	Dia curto	Estados Unidos
P.R.A Estiva	Diamante/Aromas	Não definido	Brasil
Dover	Florida Belle / ‘Fla. 71-189’	Neutro	Estados Unidos
San Andreas	Albion / Cal 97.86-1	Neutro	Estados Unidos
Sabrina	9719 / 94.020	Dia curto	Espanha
Albion	Diamante/ Cal94.16-1	Neutro	Estados Unidos
Camino Real	‘Cal.89.230-7’/‘Cal.90.253-3’	Dia curto	Estados Unidos
Camarosa	Douglas / ‘Cal. 85.218-605’	Dia curto	Estados Unidos
Monterey	Albion / Cal 97.85-6	Neutro	Estados Unidos
Fronteiras	Cal 4.18-4 / Cal 5.165-1	Dia curto	Estados Unidos
Mercedes	Desconhecido	Dia curto	Espanha
Aromas	Cal 87.112-6 / Cal 99.270-1	Neutro	Estados Unidos
Sweet Charlie	FL 80-456 / Pajaro	Dia curto	Estados Unidos
Festival	Rosa Linda / Oso Grande	Neutro	Estados Unidos
Cultivares crioulas*	<i>Pedigree</i>	Fotoperíodo	Origem
Caximinas	Caxias/Minas	Não definido	Brasil
Saturno	Desconhecido ¹	Não definido	Brasil
Minas	Desconhecido ¹	Não definido	Brasil
NPH	Desconhecido ¹	Não definido	Brasil
Maju	Desconhecido ¹	Não definido	Brasil
Híbridos simples	<i>Pedigree</i>	Fotoperíodo	Origem
RVCS 44	Camarosa/Sweet Charlie	Não definido	Brasil
RVCA 16	Camarosa/Aromas	Não definido	Brasil
RVFS 07	Festival/Sweet Charlie	Não definido	Brasil
RVDA11	Dover/ Aromas	Não definido	Brasil

RVFS 06	Festival / Sweet Charlie	Não definido	Brasil
HDC	<i>Pedigree</i>	Fotoperiodo	Origem
CAM44R117	Camarosa/Sweet Charlie//Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R66	Camarosa/Sweet Charlie//Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM11R108	Dover /Aromas// Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM16R50	Camarosa/Aromas// Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM11R128	Dover/Aromas // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM16R39	Camarosa /Aromas // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM07R97	Festival/Sweet Charlie//Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM07R52	Festival/Sweet Charlie//Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM07R61	Festival/Sweet Charlie//Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM16R43	Camarosa/Aromas // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM16R143	Camarosa /Aromas // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM07R113	Festival/Sweet Charlie//Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM06R151	Festival/Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM06R55	Festival/Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R47	Camarosa /Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R28	Camarosa/ Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R110	Camarosa/ Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R124	Camarosa/ Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R78	Camarosa/ Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
CAM44R130	Camarosa/ Sweet Charlie // Camino Real	Dia curto	Brasil
HFN	<i>Pedigree</i>	Fotoperiodo	Origem
MONT07R16	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT11R25	Dover / Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R113	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT11R32	Dover /Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R30	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT16R1	Festival / Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT11R10	Dover / Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R42	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R80	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT11R3	Dover / Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
ALB06R36	Festival/Sweet Charlie//Albion	Dia neutro	Brasil
MONT07R124	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT11R4	Dover / Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R5	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R80	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT11R32	Dover /Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil

MONT07R24	Festival/Sweet Charlie // Monterey	Dia neutro	Brasil
ALB07R28	Festival/Sweet Charlie // Albion	Dia neutro	Brasil
MONT07R10	Festival /Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil
MONT07R5	Festival / Aromas // Monterey	Dia neutro	Brasil

* Genótipos desenvolvidas por produtores do Estado de Minas Gerais.

4.2 Extrações do DNA

Para as análises moleculares foram coletadas folhas jovens de cada genótipo e acondicionadas em papel alumínio e em caixas de isopor com nitrogênio líquido (-180 °C). Em seguida, foi realizada a trituração até as folhas ficarem com aparência de um pó bem fino. O DNA foi extraído do material utilizando o protocolo de extração baseado no detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) com PVP (Polivinilpirrolidona), seguindo a metodologia proposta por DOYLE & DOYLE (1987) com modificações. Para cada amostra foi pesado 100 mg de tecido vegetal triturado e colocado em microtubos de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados ao tecido 700 µL de tampão constituído: por 20 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 0,1 de Tris- HCl pH 8,0 [(hidroximetil) aminometano calibrado com ácido clorídrico]; 1,4 M NaCl (cloreto de sódio); 2% de CTAB; e 2% de PVP e 2% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram colocados em banho-maria e deixados por 45 min a 65 °C, e agitados por 10 minutos. Após esse período, foi acrescentado nas amostras 500 µL de clorofórmio-álcoolisoamílico (24:1) e por 10 minutos os tubos foram agitados delicadamente por inversão e então centrifugados por 10 minutos a 12.000 RPM. Cuidadosamente, os tubos foram retirados da centrifuga, transferido o sobrenadante para um novo tubo e acrescentado 700 µL de isopropanol gelado (-20°C). Os tubos foram agitados por inversão, para precipitação do DNA, e centrifugado por 10 minutos a 12.000 RPM. Nesse processo é possível ver a formação de grumos de cor clara (*pellet*). Em seguida, foram feitas várias lavagens com etanol 99% e 75% para purificação do DNA. Nesse processo, o DNA ficou depositado no fundo do tubo, o sobrenadante foi descartado e o DNA seco *overnight*. Com o DNA seco foi acrescentado 100 µL de água ultra pura e 5 µL de RNase (10 mg mL⁻¹) e mantido à 37°C por 1 hora. Posteriormente, foram acrescentados 10 µL de acetato de sódio 3 M e 2 volumes (200 µl) de etanol 75% gelado (-20 °C), centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos e feito lavagens com etanol. Depois de seco, o DNA foi ressuspenseo em 100 µL água ultrapura e armazenada a -20°C. As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,9% e coradas com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹), utilizando como padrão quantidades

conhecidas do DNA.

4.3 Reação de amplificação dos marcadores ISSR e Eletroforese

Para as reações de amplificação do DNA de cada genótipo foram utilizados 10 *primers* ISSR, desenvolvido pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (Tabela 2). Para a PCR, foram utilizadas aproximadamente 50 ng de DNA. Cada reação foi preparada para um volume final de 12,5 uL sendo: 8,9 µL de água ultrapura, 0,2 µM de primer, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase e de tampão para PCR 1×. A amplificação foi realizada em termociclador programado para um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de um passo inicial a 95 °C por 45 segundos, temperatura de pareamento do primer (Tabela 2) por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos. Após os 35 ciclos, um passo final de 72 °C por 10 minutos foi adicionado para extensão final dos fragmentos.

Os produtos da PCR foram resolvidos em gel de Agarose à 1,8% corado com brometo de etídio (0,5 µL mL⁻¹). A visualização dos fragmentos amplificados foi feita sob luz ultravioleta e os géis fotodocumentados por sistema digital.

4.4 Análise dos dados

Cada loco amplificado foi analisado de acordo com a presença (1) ou ausência (0) da banda. Somente as bandas com boa resolução foram consideradas. A matriz binária obtida pela leitura dos géis foi utilizada para as análises estatísticas. As informações acerca do polimorfismo seguiram o critério de Ott (1992) que considera os fragmentos presentes em mais de 5% ou em menos de 95% dos indivíduos como polimórficos. A porcentagem de polimorfismo foi calculada para cada primer dividindo o número de fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados.

A similaridade genética entre os genótipos foi estimada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do software NTSYS 2.2 (ROHLF, 2008). O agrupamento dos indivíduos para construção do dendrograma foi feito pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). (ROHLF, 2008).

Para obtenção dos índices de diversidade (índice de Shannon e o índice de diversidade de Nei) e o número de locos polimórfico por grupo de genótipos foi utilizado o software POPGENE 1.31 (YEH; YANG; BOYLE, 1999).

A análise de Coordenadas Principais (PCoA) para a visualização da distribuição espacial dos indivíduos e verificação da contribuição de cada grupo de genótipos para variabilidade genética foi realizada no software GenAlex versão 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). A análise Bayesiana, para obtenção do número de grupos genéticos que melhor explica a variabilidade existente foi feita com o auxílio do software STRUCTURE (PRITCHARDA *et al.*, 2010). Para determinação do número ideal de grupos genéticos (K) foram feitas simulações partindo do pressuposto que é possível a obtenção de qualquer número de clusters de 1 a 10, onde cada simulação foi repetida 10 vezes. Para esta análise foi usado o modelo de ascendência sem mistura e as frequências alélicas foram correlacionadas por 1000 burn-in e 10000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) repetições após o burn-in. Para determinação do K (número de grupos genéticos-*clusters*) mais provável em relação aos indicados pela análise, foram utilizados os critérios sugeridos por Evanno *et al.* (2005), com o auxílio do programa Structure Harvester (EARL, 2012).

5. RESULTADOS

Dos 10 *primers* utilizados, nove apresentaram produtos de qualidade na amplificação e foram considerados nas análises. Na figura 3 é apresentado o padrão de amplificação do *primer* UBC 864 em 19 genótipos de morangueiro. O tamanho dos fragmentos amplificados variaram de 100 a 1.700 pb. Os *primers* UBC 807 e UBC 864 amplificaram o maior número de locos (20 e 19 respectivamente) e o *primer* UBC 808 o menor (13) (Tabela 2). O total de fragmentos amplificados pelos nove *primers* ISSR foi de 147 bandas. Todos os fragmentos amplificados foram polimórficos (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos 10 *primers* ISSR utilizados para estimar a variabilidade genética de 64 genótipos de morangueiro (*Fragaria*×*ananassa*) do Programa de Melhoramento da UNICENTRO. TP - Temperatura de pareamento, NTLA- número total de locos amplificados, NLP- número de locos polimórficos, %P- porcentagem de polimorfismo.

Primer	Sequência*	TP °C	NTLA	NLP	%P
UBC 807	(AG)8T	55	20	20	100
UBC 808	(AG)8C	50	13	13	100
UBC 810	(GA) 8T	52	14	14	100
UBC 834	(AG)8YT	52	17	17	100

UBC 835	(AG)8YC	54	17	17	100
UBC 836	(AG)8YA	53	15	15	100
UBC 873	(GACA)4	50	15	15	100
UBC 861	(ACC)6	52	17	17	100
UBC 864	(ATG)6	55	19	19	100
UBC 891	HVH(TG)7	54	-	-	-

* Y = pirimidina (C ou T); H = A ou C ou T; V = A ou C ou G

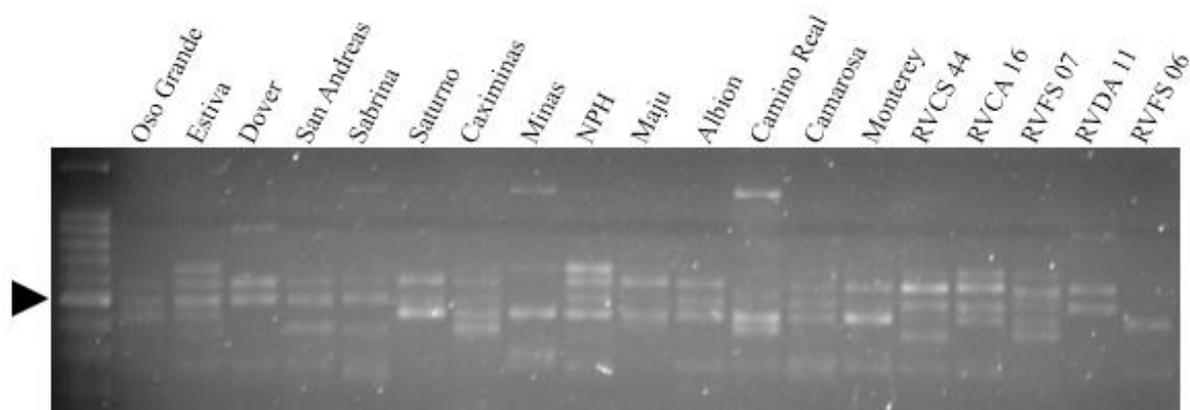


Figura 3. Gel de agarose com o padrão de amplificação do primer ISSR UBC 864 em 19 genótipos mantidos no Programa de Melhoramento da UNICENTRO, Guarapuava, PR. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100pb. A seta indica o fragmento de 500 pb.

O dendrograma indicou a formação de dois grupos (A e B). A cultivar Camino Real manteve-se isolada (Figura 4). O grupo A foi composto pela maioria das cultivares comerciais e híbridos simples. O grupo B foi formado pelos híbridos triplos (HDC e HFN) e pelas cultivares Fronteiras, Mercedes, Aromas, Festival e Sweet Charlie. Ainda, o grupo B foi dividido em dois subgrupos (B1 e B2) (Figura 4). O grupo B1 foi formado pelos HDC e o grupo B2 formado pelos HFN e pelas cultivares Fronteira, Mercedes, Aromas, Festival e Sweet Charlie (Figura 4). Dois genótipos selecionados previamente como plantas de fotoperíodo neutro (MONT07R16 e MONT11R25) ficaram agrupados nos genótipos considerados de dia curto.

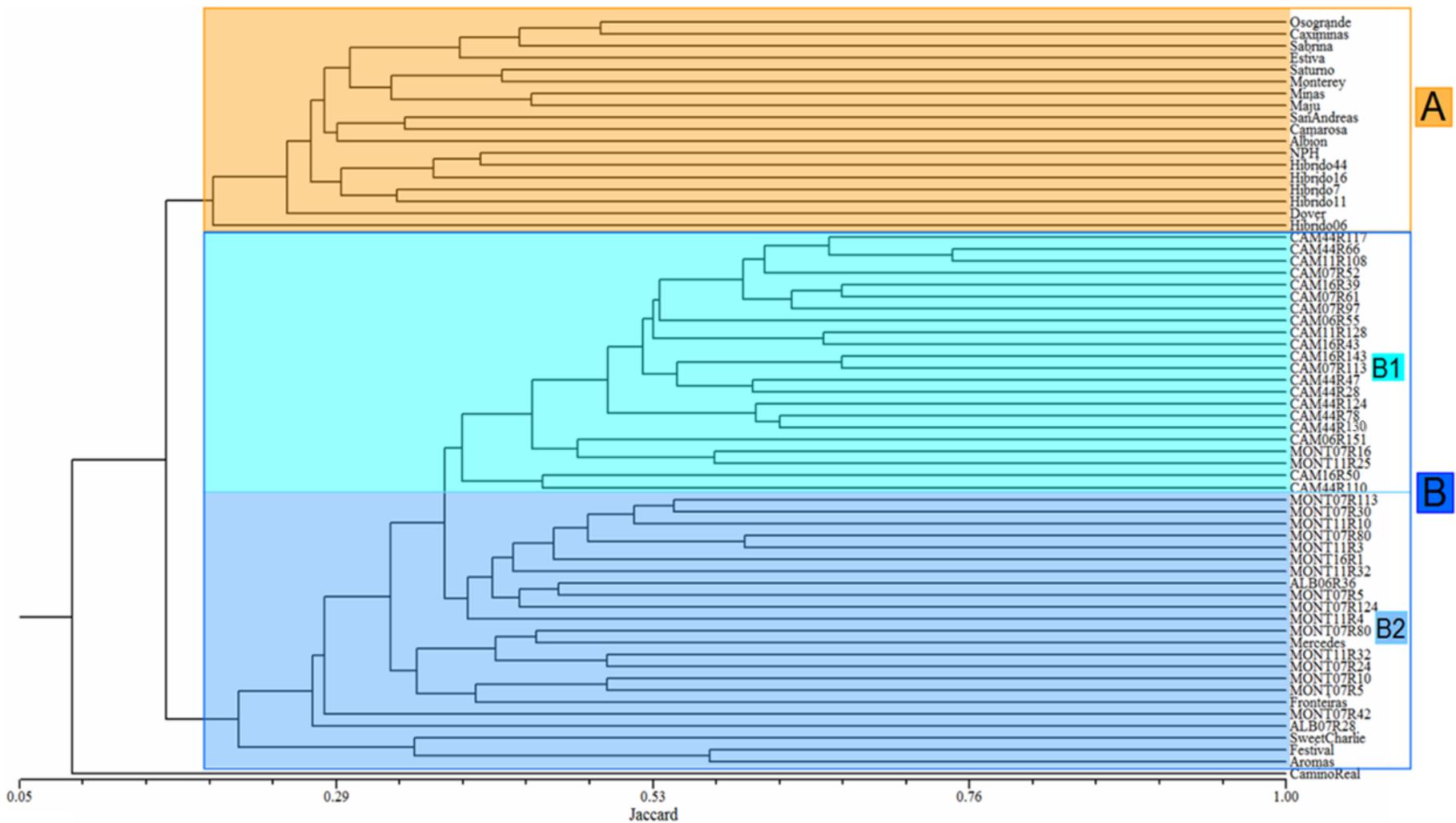


Figura 4. Dendrograma de similaridade genética dos 64 genótipos de morangueiro (*Fragaria × ananassa*) do Programa de Melhoramento da UNICENTRO, obtido com base em 147 locos ISSR.

As cultivares comerciais evidenciaram maior índice de diversidade de Shannon ($I = 0,46$), e também maior diversidade genética de Nei ($h = 0,29$). Já, os HDCs apresentaram os menores valores para os dois índices ($I = 0,28$ e $h = 0,18$) (Tabela 3). Os HFNs também apresentaram número expressivo de locos polimórficos (119 locos, 8%). Já, o menor número de locos polimórficos foi nos híbridos simples (69 locos, 47%) (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidade genética dos cinco grupos de genótipos de morangueiro (*Fragaria*×*ananassa*) do Programa de Melhoramento da UNICENTRO. Índice de Shannon (I); índice de diversidade de Nei (h); número de locos polimórficos (NLP) e porcentagem de locos polimórficos (% LP).

Grupos	H	I	NLPs	%LP
Cultivares comerciais	0,30	0,46	140	95
Cultivares crioulas	0,21	0,31	79	54
Híbridos simples	0,20	0,28	69	47
Híbridos triplo de dias curto	0,18	0,28	89	61
Híbridos triplo de fotoperíodo neutro	0,27	0,41	119	81
Todos	0,34	0,51		

A PCoA distribuiu os genótipos em três grupos quando não considerado sobreposição de área (Figura 5). As coordenadas 1, 2 e 3 explicam 28,77% da variação genética observada. O grupo formado pelos HFNs incluindo as cultivares Festival, Mercedes, Aromas, ficaram mais próximos graficamente do HDCs, quando comparados com cultivares comerciais, híbridos crioulos e híbridos simples. Os genótipos crioulos ocuparam a mesma área gráfica da cultivares comerciais.

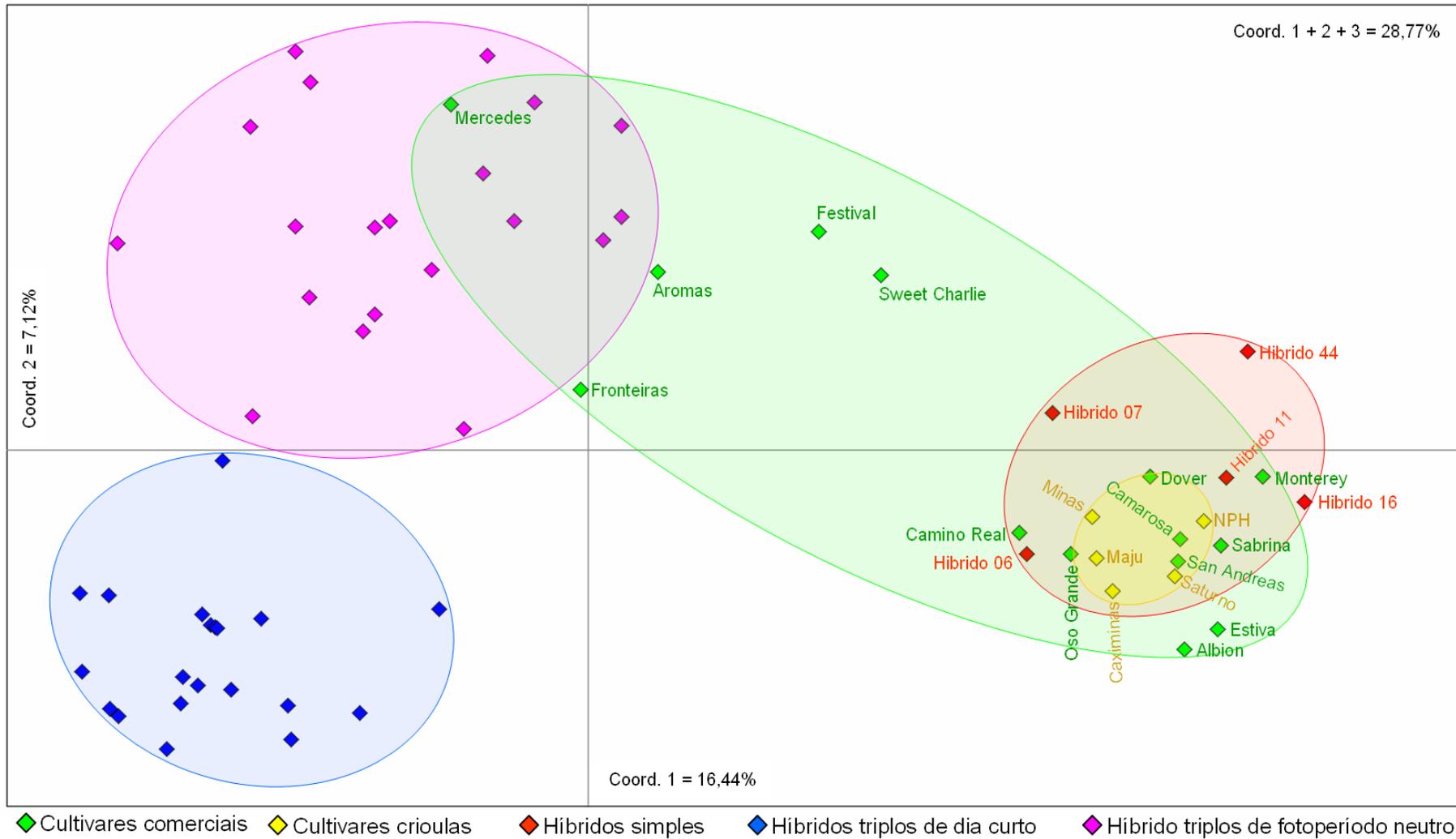


Figura 5. Distribuição espacial obtida pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA) de 64 genótipos de morangueiro (*Fragaria*×*ananassa*) do Programa de Melhoramento da UNICENTRO. Os círculos indicam a área ocupada pelos grupos avaliados nesse trabalho.

A análise de agrupamento Bayesiano evidenciou que os números de K (*Clusteres*, grupos genéticos) que melhor explica a variabilidade dos genótipos foi dois (Figura 6). Ao considerar o K = 2 a variabilidade genética é melhor explicada ocorrendo a união das cultivares comerciais (exceto Fronteiras, Mercedes, Sweet Charlie, Festival, Aromas), crioulas e híbridos simples em um grupo e os híbridos triplos mais as cultivares Fronteiras, Mercedes, Sweet Charlie, Festival e Aromas em outro grupo (Figura 7A). Ao observar o número de *clusters* K = 3, que é o indicado pela dendrograma e PCoA, o agrupamento que melhor explica a variabilidade é a divisão dos genótipos em três grupos, sendo que a diferença dos grupos obtidos com o K = 2 é a separação dos híbridos triplos em dois grupos (HDC em um grupo e HFN e cultivares Fronteiras e Mercedes, Sweet Charlie, Festival e Aromas em outro grupo) (Figura 7B).

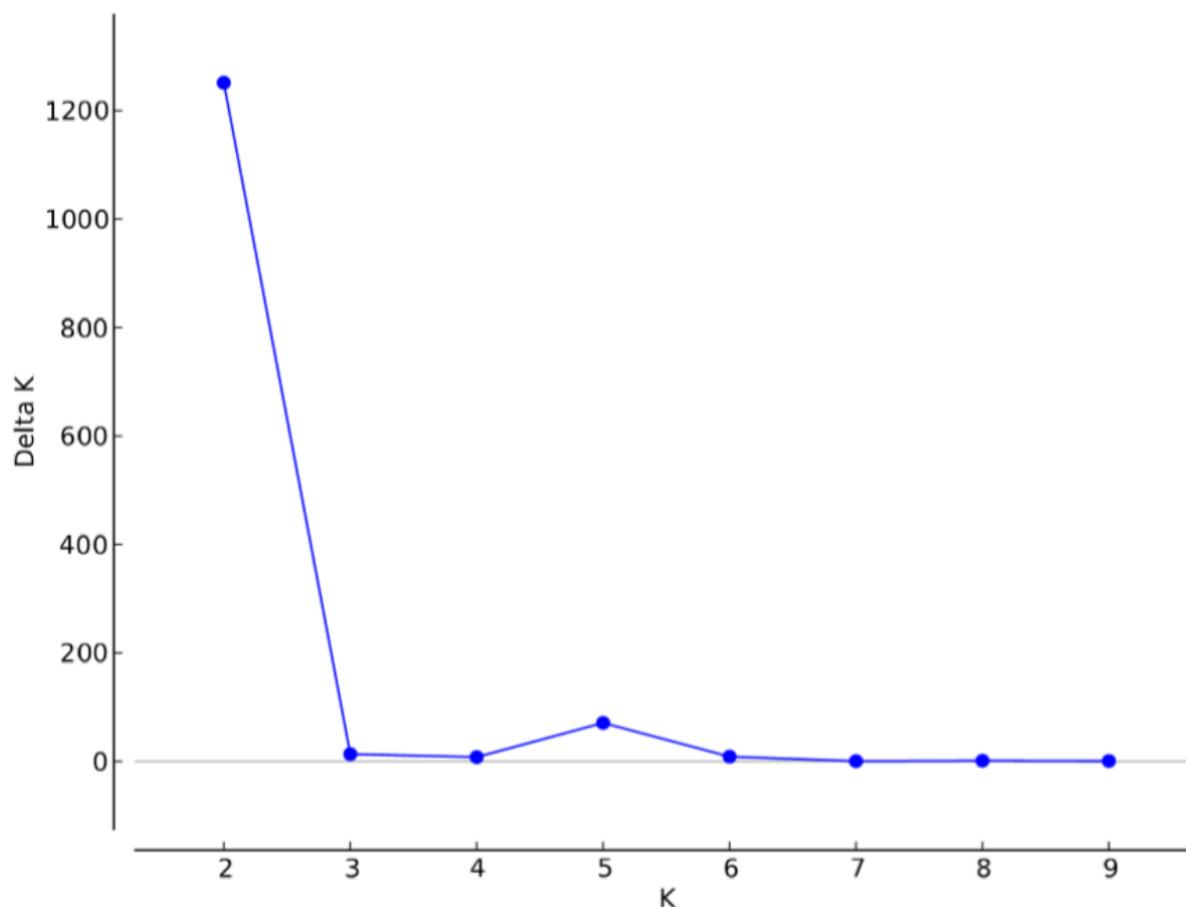


Figura 6. Determinação do número ótimo de K (*clusters*-grupos genéticos) em morangueiro (*Fragaria*×*ananassa*) obtido pelos nove marcadores ISSR. O ponto de intersecção entre o maior valor no eixo Y com o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos).

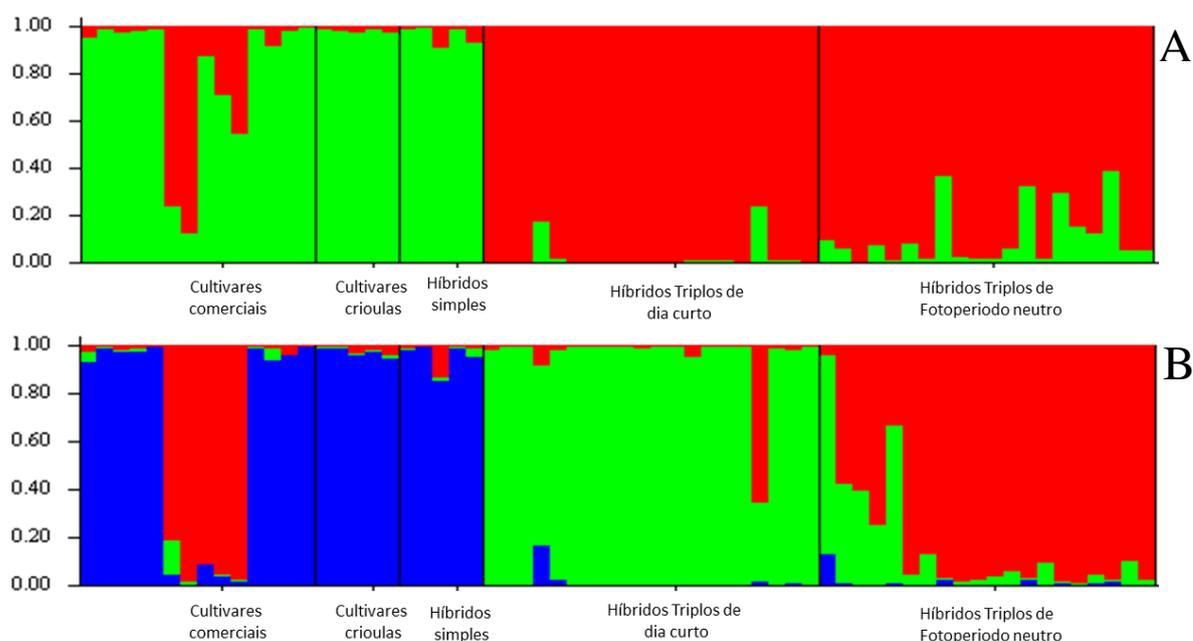


Figura 7. Distribuição dos grupos genéticos (K), obtidos pela análise de agrupamento Bayesiano utilizando 147 locos ISSR, dos 64 genótipos de morangueiro (*Fragaria*×*ananassa*) do programa de melhoramento genético da UNICENTRO, Guarapuava, PR. **A)** K = 2. **B)** K = 3.

6. DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo mostram que os híbridos do Programa de Melhoramento da UNICENTRO tem alta variabilidade e diversidade genética, e este programa de melhoramento tem sido efetivo na obtenção de genótipos diferenciados de morangueiro. O êxito do programa pode ser comprovado quando observado que os híbridos triplos desenvolvidos (HDC e HD) possuem divergências genéticas entre si e também com as cultivares disponíveis no mercado. Todos os resultados obtidos neste estudo levam a esta mesma conclusão (Figuras 4, 5 e 7).

O número médio de locos por *primer* (16) e a porcentagem de polimorfismo (100%) constatados no nosso trabalho, estão dentro do esperado para morangueiro. Por exemplo, Kaleybar *et al.* (2018) analisando três cultivares, quatro híbridos e nove genótipos silvestres, obtiveram média de 16 fragmentos amplificados por *primer* ISSR e polimorfismo de 95%. Também, no estudo realizado por Morales *et al.* (2011) com 11 cultivares de morango (incluindo algumas aqui estudadas) utilizando marcadores ISSR, o número de fragmentos

obtidos por *primer* foi menor, porém o polimorfismo foi de 100%. Além disso, a porcentagem de polimorfismo considerando cada grupo de genótipos foi alta (Tabela 3). Os dados obtidos em nosso estudo juntamente com os disponíveis na literatura fortalecem a eficiência dos marcadores moleculares ISSR na identificação de variabilidade genética em morangueiro. Ainda, a porcentagem de polimorfismo tem sido usada como parâmetro para indicar variabilidade quando se trabalha com marcadores dominantes (FEDRIGO *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2017; MARIANO *et al.*, 2019). Assim, podemos afirmar que os genótipos de morangueiro obtidos e mantidos pelo PMMU apresentam alta variabilidade genética e, conseqüentemente, alto potencial para gerar genótipos com combinações genéticas superiores.

O agrupamento observado no dendrograma (Figura 4) parece estar relacionado com o *pedigree* dos genótipos avaliados. As cultivares (Festival, Aromas e Sweet Charile) utilizadas como genitoras nos cruzamentos para o desenvolvimento dos híbridos triplos ficaram alocadas no mesmo subgrupo que os HFNs (Figura 4). No agrupamento das cultivares comerciais, crioulas e híbridos simples, tem-se as cultivares Albion e Minas que são genitoras da San Andreas e Caximinas, respectivamente, o que explicaria sua aproximação, mostrando possível contribuição de parentesco para o agrupamento. A evidência da relação parental também foi relatada por Kuras e Korbin (2010), ao estudarem a relação genética entre 96 cultivares de morangueiro desenvolvidos em diferentes programas de melhoramento. Este agrupamento pode ser explicado pelo compartilhamento de regiões genômicas comuns, o que é esperado entre parentais e híbridos (RADMANN *et al.*, 2006). Também, a formação dos grupos pode estar associada ao maior compartilhamento de regiões genômicas entre grupos de cultivares e não somente de parentais. Esta condição tem sido utilizada para a explicação da similaridade genética entre genótipos (FACHINELLO *et al.*, 2011), o que está de acordo com o agrupamento obtido em nosso trabalho, onde, por exemplo, é esperado (e foi observado) que os híbridos simples estejam mais próximos geneticamente das cultivares quando comparado aos híbridos triplos.

O estudo da variabilidade por meio de coeficientes de similaridade permite a identificação de parentais adequados a escolha de genótipos superiores, que ao serem cruzados apresentam maior efeito heterótico e maior segregação em recombinação (CRUZ; CARNEIRO, 2003). Também, a similaridade permite inferir a relação entre os híbridos obtidos com cultivares já disponíveis no mercado. Neste estudo, a similaridade genética entre os híbridos triplos e a maioria das cultivares comerciais e crioulas (mesmo as utilizadas como parentais) não passou de 20% (Figura 4). Ozturk Erdem e Cekic (2018), estudando a relação

genética de 52 genótipos de morangueiros derivados da F₁ com seus genitores também observou similaridade de 20% entre o grupo composto pelas cultivares e o grupo formado pelos híbridos. Estes dados evidenciam a alta variabilidade existente no morangueiro octaplóide.

A similaridade de apenas 20% entre os híbridos triplos e as cultivares verificadas em nosso estudo, evidencia também que o PMMU foi eficiente na obtenção de híbridos diferentes geneticamente das cultivares disponíveis no mercado. Esse sucesso está provavelmente relacionado ao uso de três cultivares para obtenção dos híbridos, o que permite maior possibilidade de recombinações. Em *Arabidopsis* a poliploidização pela combinação de diferentes genomas eleva a taxa de recombinação no poliplóide obtido e, conseqüentemente, a geração de variabilidade genética (PECINKA *et al.*, 2016). Nesse sentido, considerando que o morango cultivado é um híbrido poliplóide (octaplóide), e que as cultivares utilizadas nos cruzamentos realizados pelo PMMU são geneticamente distintas (Figura 4), podemos inferir que a alta diferenciação genética observada nos híbridos ocorre devido a elevada taxa de recombinação ocorrida no processo de obtenção destes. Também, é importante ressaltar que foram realizados dois cruzamentos (utilizando três genomas base) para obtenção de cada híbrido triplo, o que aumentou ainda mais o potencial de diferenciação genética. Assim, mesmo quando olhamos para dentro de cada grupo (HFN ou HDC) a diferenciação ainda é alta (em torno de 53%) (Figura 4). A explicação para isso está, além do explanado anteriormente, na alta pressão de seleção realizada (em torno de 2%), uma vez que estes híbridos foram selecionados de uma população de 1.800 híbridos.

Corroborando com a variabilidade genética entre os genótipos, os índices de diversidade genética ($I = 0,46$ e $h = 0,29$) também se mostraram elevados nas cultivares comerciais, o que era esperado, pois as mesmas tem origens genéticas diferentes. Entretanto, os HFNs também apresentaram alto índices de diversidade e locos polimórficos ($I = 0,41$ e $h = 0,27$ e 81% respectivamente). Resultados semelhantes são observados na literatura para morangueiro. Kaleybar *et al.* (2018) avaliando dezesseis genótipos de morangueiro com marcadores ISSR, incluindo cultivares comerciais e selvagens, observou alto índice de diversidade média ($I = 0,43$). Meng *et al.* (2015) avaliaram 70 genótipos de morangueiro silvestre (*Fragaria nubicola*) com 19 *primers* SSR e obtiveram o índice de diversidade de $h = 0,33$. Assim, essa variabilidade pode ser explicada pelo fato do morango ser uma planta alógama e altamente heterozigota (SOUZA, 2011). A alta heterozigidade ocorre em função

da espécie ser octaplóide e formada por possíveis quatro ancestrais diplóides (ROUSSEAU *et al.*, 2009).

A explicação de 28,77% da variação genética pelas três primeiras coordenadas da PCoA, sugere que a diversidade do grupo de genótipos avaliados é complexa e não pode ser explicada individualmente, por nenhum grupo de genótipos. No entanto é possível observar que as cultivares comerciais e os híbridos triplos são os que mais contribuem para a variação genética observada (Figura 5). Já as cultivares crioulas e os híbridos simples são sobrepostos na área das cultivares comerciais, evidenciando baixa contribuição destes genótipos para a diversidade (Figura 5). Esta não contribuição significativa das cultivares crioulas e híbridos simples para a variação genética, pode estar relacionada a obtenção das cultivares crioulas por agricultores sem cruzamentos planejados. Geralmente, o agricultor seleciona o material que apresenta as características semelhantes as cultivares que ele conhece, fazendo com isso uma seleção direcional, levando conseqüentemente a maior semelhança genética do material selecionado com as cultivares. Com relação aos híbridos triplos, o resultado da PCoA corroborou com os resultados dos índices de variabilidade e diversidade, e com o agrupamento no dendrograma, ou seja, evidenciou que os dois grupos de híbridos triplos (HFN e HDC) são diferentes geneticamente e altamente diversos. Ainda, os HFNs mostraram ter relação genética mais próxima com as cultivares comerciais do que os HDCs. A cultivar Mercedes, por exemplo, ficou no mesmo quadrante que os HFNs.

A análise Bayesiana mostrou que a variabilidade e diversidade genética dos genótipos estudados é melhor explicada quando considerados dois grupos genéticos (Figura 6 e 7A). Conforme esperado, as cultivares comerciais (exceto Aromas, Festival e Sweet Charlie), crioulas e híbridos simples apresentaram mais contribuição ao mesmo grupo genético, e os híbridos triplos (HDCs e HFNs) do outro grupo genético. A formação de um grupo diferente para os híbridos triplos pode estar relacionada ao processo de seleção destes materiais. A seleção destes híbridos foi feita para adaptação edafoclimática, características comerciais e produtividade em campo (ZEIST, 2019). Assim, o conjunto de regiões genômicas que controlam estas características selecionadas podem ter sido suficientes para manter estes genótipos no mesmo grupo genético. Fortalecendo esta hipótese, a maioria dos parentais (Aromas, Festival e Sweet Charlie) envolvidos nos cruzamentos para obtenção destes híbridos também foram classificados dentro do mesmo grupo dos híbridos. Outro fato interessante, é que as cultivares Fronteiras, Sweet Charlie, Festival e Aromas foram desenvolvidas em programas de melhoramento dos Estados Unidos, o que também explicaria o seu

agrupamento. As cultivares Festival e Aromas, além de serem genitoras de alguns dos híbridos triplos aqui estudados, são classificadas como cultivares de fotoperíodo neutro (STEWART; FOLTA, 2010), ou seja, possuem possíveis características em comum com os HFNs. Porém, as cultivares Fronteiras, Mercedes e Sweet Charlie apesar de serem classificadas como cultivares de dia curto, ficaram agrupadas no mesmo grupo genético dos HFNs, o que pode indicar que tenham algum ancestral em comum.

Na visualização de três grupos genéticos ($K = 3$) (Figura 7B) ocorre a separação dos HFNs, HDCs e cultivares (exceto os parentais dos híbridos), corroborando com o resultado da PcoA e também do dendrograma. Yoon *et al.* (2012) avaliaram 59 acessos de morangueiro oriundos da Coreia, Alemanha, Estados Unidos, Reino Unido e Japão, utilizando 18 marcadores microssatélites e obtiveram dois grupos genéticos. Ainda, estes autores concluíram que a maioria dos genótipos possuíam origem genética de um único *pool* gênico, pois 96,6% dos genótipos pertenceram ao mesmo grupo genético. Diferente do observado por estes autores, além de termos uma distribuição mais equitativa dos genótipos nos dois grupos genéticos obtidos, alguns genótipos (cultivares e híbridos) apresentam em sua constituição genética os dois *pools* gênicos. Esta condição é clara em metade dos genótipos de HFN (tanto em $K = 2$ como $K = 3$) e também em algumas cultivares comerciais (com maior frequência quando $K = 2$). Assim, é interessante (e esperado) que a variação de grupos genéticos nos híbridos triplos são daqueles observados nos parentais (Figura 7).

7. CONCLUSÃO

Os genótipos do programa de melhoramento genético da UNICENTRO, caracterizados neste trabalho, apresentaram alta diversidade e variabilidade genética. Os híbridos triplos desenvolvidos pelo PMMU são diferentes geneticamente das cultivares comerciais. Ainda, os híbridos triplos de dia curto são geneticamente diferentes dos híbridos de fotoperíodo neutro. Neste sentido, o PMMU tem sido eficiente na obtenção de linhagens híbridas com potencial de desenvolvimento de novas cultivares nacionais de morangueiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L. E. C.; JUNIOR, C. R. Fragole, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, v. 69, n. 5, p. 60-64, 2007.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G.L.; SANTOS, A. M. dos. **A cultura do morango**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2016. 590 p.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO G. L.; SANTOS, M d. **Morangueiro**. 2.ed. revisada ampliada Brasília: Embrapa informações Tecnológicas, Embrapa Clima Temperado, 2011. 52p.
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n. 1-2, p. 156-161, 2013.
- BORTOLOZZO, A. R.; VALDEBENITO SANHUEZA, R.; KOVALESKI, A. BERNARDI, J.; HOFFMANN, A.; BOTTON, M.; FREIRE, J. d. M.; BRAGHINI, L.; VARGAS, L.; CALEGARIO, F. Produção de morangos no sistema semihidropônico. **Embrapa Uva e Vinho: Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.
- BONOW, S.; OLIVEIRA, A. C. B de. Marcadores moleculares. *In*: ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. Brasília: Embrapa, 2016.
- BUCCI, A.; FAEDI, W.; BARUZZI, Botânica origem evoluzione. *In*. FAEDI, W.; ANGELINI, R. (Ed.). **La fragola**. Bologna: Bayer CropScience: Ed. Script, p. 1-11, 2010.
- BRADFORD, E.; HANCOCK, J. F.; WARNER, R. M. Interactions of temperature and photoperiod determine expression of repeat flowering in strawberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 2, p. 102-107, 2010.
- CASTRO, R. L. **Diversidade genética, adaptabilidade e estabilidade do morangueiro (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) em cultivo orgânico**. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M.; FAY, M.; BYNG, J.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D.; MABBERLEY, D.; SENNIKOV, A.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- COCCO, C. **Qualidade fisiológica das mudas na produção de frutas do morangueiro**. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

- COSTA, R.; CALVETE, E. O.; DOS SANTOS TRENTIN, N.; CHIOMENTO, J. L. T.; DE NARDI, F. S. Characterization of external morphanatomy of the strawberry identifies new structure. **Scientia Horticulturae**, v. 254, p. 70-76, 2019.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden, 1988.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, v. 2., 2003.
- DARROW, G. M. **The strawberry. History, breeding and physiology**, 1966.
- DARROW, G. M. Interrelation of temperature and photoperiodism in the production of fruit-buds and runners in the strawberry. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 34, p. 360-363, 1936.
- DE ALMEIDA, I.; ANTUNES, L.; REISSER JUNIOR, C. ;; STEINMETZ, S.; CARVALHO, F. Potenciais regiões produtoras de morango durante a primavera e verão e riscos de ocorrência de geada na produção de inverno no estado do Rio Grande do Sul. **Embrapa Clima Temperado: Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DURNER, E. F. Photoperiod and temperature conditioning of ‘Sweet Charlie’ strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch) plugs enhances off-season production. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 184-189, 2016.
- DUCHESNE, N. A. **Historie Naturelle des Fraisiers**. Paris, 1766.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EARL, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- FACHINELLO, J. C.; PASA, M. d. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectiva da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. SPE1, p. 109-120, 2011.
- FAGHERAZZI, A.; GRIMALDI, F.; KRETZSCHMAR, A.; MOLINA, A.; GONÇALVES, M.; ANTUNES, L.; BARUZZI, G.; RUFATO, L. Strawberry production progress in Brazil. **Acta Horticulturae**, n. 1156, p. 937–940, 2017.

- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT-Statistics Database**. 2017. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> . Acesso em: 15 de Setembro de 2019.
- FEDRIGO, K.; GIACOMIN, R. M.; FARIA, C. M.; DA-SILVA, P. R. ISSR primers for analysis of genetic variability of *Stenocarpella maydis*. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 4, p. 270-275, 2016.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa , 2002. 402 p.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2003. 412 p.
- GUIMARÃES, A.; ANDRADE JUNIOR, V.; ELSAYED, A.; FERNANDES, J.; FERREIRA, M. Potencial produtivo de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 112-120, 2015.
- HANCOCK, J. F.; FINN, C. E.; LUBY, J. J.; DALE, A.; CALLOW, P. W.; SERÇE, S. Reconstruction of the strawberry, *Fragaria*×*ananassa*, using genotypes of *F. virginiana* and *F. chiloensis*. **HortScience**, v. 45, n. 7, p. 1006-1013, 2010.
- HOFFMANN, A.; BERNARDI, J. **Produção de morangos no sistema Semi-hidropônico**, 2006. Bento Gonçalves: Embrapa uva e vinho. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/introducao.htm>> Acesso em: 15 de Setembro , 2019.
- JOHNSON, A. L.; GOVINDARAJULU, R.; ASHMAN, T. Bioclimatic evaluation of geographical range in *Fragaria* (Rosaceae): consequences of variation in breeding system, ploidy and species age. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, n. 1, p. 99-114, 2014.
- KALEYBAR, B.; NEMATZADEH, G.; GHASEMI, Y. Assessment of genetic diversity and fingerprinting of strawberry genotypes using inter simple sequence repeat marker. **Horticulture International Journal**, v. 2, n. 5, p. 264-269, 2018.

- KOHLER A. **Cultivo de Morango.** Disponível em: <<http://apostilasgratuitas.info/oportunidades-e-negocios/52-oportunidades-e-negocios/405-cultivo-de-morango>> Acesso em: 15 Setembro de 2019.
- MASSA, G. D.; KIM, H. H.; WHEELER, R. M.; MITCHELL, C. A. Plant Productivity in response to LED lighting. **HortScience**, v. 43, n. 7, p. 1951-1956, 2008.
- MARIANO, L. C.; ZCHONSKI, F. L.; DA SILVA, C. M.; DA-SILVA, P. R. Genetic variability in a Brazilian apple germplasm collection with low chilling requirements. **PeerJ**, v. 6, p. e6265, 2019.
- MARTINS, D. d. S.; STRASSBURGER, A.; PEIL, R. .; SCHWENGBER, J.; REISSER JÚNIOR, C.; FURTADO, L. Fisiologia da produção de morangueiro. *In*: TIMM, L. C.; TAVARES, V. E. Q.; REISSER JUNIOR, C.; ESTRELA, C. C. **Morangueiro irrigado aspectos técnicos e ambientais do cultivo.** Pelotas: Ed. UFPel, 2009. 163p.
- GIAMPIERI, F.; ZHANG, Y.-Tt.; ZHONG, C.-Ff.. Status of strawberry breeding programs and cultivation systems in Europe and the rest of the world. **Journal of Berry Research**, v. 8, n. 3, p. 205-221, 2018.
- MENG, F.; LIU, L.; PENG, M.; WANG, Z.; WANG, C.; ZHAO, Y. Genetic diversity and population structure analysis in wild strawberry (*Fragaria nubicola* L.) from Motuo in Tibet Plateau based on simple sequence repeats (SSRs). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 63, p. 113-118, 2015.
- MILACH, S. **Marcadores de DNA em Plantas.** Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- MORALES, R. G. F.; RESENDE, J. T. V.; FARIA, M. V.; ANDRADE, M. C.; RESENDE, L. V.; DELATORRE, C. A.; SILVA, P. R. d.. Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 6, p. 665-670, 2011.
- NISHIYAMA, M.; KANAHAMA, K. Effect of light quality on Growth of everbearing Strawberry plants. **American Society for Horticultural Science**, p. 151-154, 2009.
- NERI, D.; SANVINI, G.; MASSETANI, F. Arquitetura della pianta. *In*: FAEDI, W.; ANGELINI, R. **La fragola.** Bologna: Bayer CropScience, p. 142-151, 2010.
- NUNES, C. F.; FERREIRA, J. L.; GENEROSO, A. L.; DIAS, M. S. C.; PASQUAL, M.; CANÇADO, G. M. d. A.. The genetic diversity of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) hybrids based on ISSR markers. **Acta Scientiarum.Agronomy**, v. 35, n. 4, p. 443-452, 2013.

- OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 2, p. 283-290, 1992.
- OZTURK ERDEM, S.; CEKIC, C. the genetic relationship between some strawberry cultivars and f1 population derived from these cultivars. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 16, n. 3, p. 2983-2993, 2018.
- PALHA, M. G. A. **Planta do morangueiro**. In: PALHA, M. G. (coord.) - Manual do Morangueiro. Projecto PO AGRO DE&D nº 193: Tecnologias de produção integrada no morangueiro visando a expansão da cultura e a reconquista do mercado, p. 3-12, 2005.
- PECINKA, A.; FANG, W.; REHMSMEIER, M.; LEVY, A. A.; SCHEID, O. M. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in Arabidopsis. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 24, 2011.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PRADEEP REDDY, M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.
- PRITCHARDA, J.K.; WENA, X.; FALUSHB, D. **Structure. Version 2.3**: University of Chicago/University of Oxford, 2010.
- RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P. d.; FACHINELLO, J. C.C. Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 84-87,, 2006.
- ROUSSEAU-GUEUTIN, M.; GASTON, A.; AÏNOUCHE, A.; AÏNOUCHE, M. L.; OLBRICHT, K.; STAUDT, G.; RICHARD, L.; DENOYES-ROTHAN, B. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 3, p. 515-530, 2009.
- RONQUE, E. R. V. **Cultura do Morangueiro**: Revisão e prática. Curitiba: EMATER/PR, 206p, 1998.
- ROHLF, F.J. **NTSYS pc: numerical Taxonomy System**. Version 2.2: Exeter Publishing, New York, 2008.

- DA ROSA, J.; WEBER, G. G.; CARDOSO, R.; GORSKI, F.; DA-SILVA, P. R. Variability and population genetic structure in *Achyrocline flaccida* (Weinm.), a species with high value in folk medicine in South America. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e 0183533-1, 2017.
- STEWART, P.; FOLTA, K. M. A review of photoperiodic flowering research in strawberry (*Fragaria* spp.). **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.
- SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Fruticultura:Análise da Conjuntura Agropecuária** Dezembro, 2012. Disponível em:<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf>. Acesso em: 17 de Setembro de 2019.
- SEN, S.; DHAWAN, V. Molecular analysis of micropropagated strawberry plants using issr (inter simple sequence repeats) markers for ascertaining clonal fidelity. **Acta Horticulturae**, v. 865, p. 345-348, 2010.
- SIMPSON, D. **The Economic Importance of Strawberry Crops**. In: HYTÖNEN, T.; GRAHAM, J.; HARRISON, R. (Ed.). *The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives*. Cham: Springer International Publishing, p. 1-7, 2018.
- SONSTEBY, A.; HEIDE, O. M. Flowering performance and yield of established and recent strawberry cultivars (*Fragaria*×*ananassa*) as affected by raising temperature and photoperiod. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 367-375, 2017.
- SOUZA JR, C. L. de. Cultivar development of allogamous crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, n. SPE, p. 8-15, 2011.
- STRASSBURGER, A. S.; PEIL, R. M. N.; SCHWENGBER, J. E.; MEDEIROS, C. A. B.; MARTINS, D. d. S.; SILVA, J. B. Crescimento e produtividade de cultivares de morangueiro de “dia neutro” em diferentes densidades de plantio em sistema de cultivo orgânico. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 623-630, 2010.
- TAZZO, I. F.; FAGHERAZZI, A. F.; LERIN, S.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L. Exigência térmica de duas seleções e quatro cultivares de morangueiro cultivado no planalto catarinense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 550-558, 2015.
- TIMM, L. C.. Morangueiro irrigado. **Aspectos técnicos e ambientais do cultivo**. Pelotas: Ed. Da Universidade Federal de Pelotas, 2009.
- VERGAUWEN, D.; SMET, I. de. The Strawberry tales: Size Matters.**Trend in Plant Science**. v.24, n. 1, p. 1-3, 2019.

- WHITAKER, V. M. Applications of molecular markers in strawberry. **Journal of Berry Research**, n. 3, p. 115-127, 2011.
- YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. **POPGENE: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis**. Version 1.31. University of Alberta, Canada and Centre for International Forestry Research, Canada, 1999.
- YOON, M.-Y.; MOE, K. T.; KIM, D.-Y.; RHO, I.-R.; KIM, S.; KIM, K.-T.; WON, M.-K.; CHUNG, J.-W.; PARK, Y.-J. Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) using SSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 6-6. 2012.
- ZAWADNEAK, M. A.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, A. F. **Como produzir morangos**. Curitiba: Ed. UFPR, 2016.
- ZEIST, R. A. **Seleção de híbridos experimentais de morangueiro**. 2018. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2018.
- ZEIST, A. R.; RESENDE, J. T.V de. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 7-16, 2019.