

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE
MORANGUEIRO POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES E CARACTERES
MORFOAGRONÔMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAFAEL GUSTAVO FERREIRA MORALES

GUARAPUAVA-PR

2010

RAFAEL GUSTAVO FERREIRA MORALES

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MORANGO POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES E CARACTERES MORFOAGRONÔMICOS**

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.

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende
Orientador

Dr. Paulo Roberto da Silva
Co-Orientador

Dr. Marcos Ventura Faria
Co-Orientador

GUARAPUAVA-PR

2010

RAFAEL GUSTAVO FERREIRA MORALES

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MORANGO POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES E CARACTERES MORFOAGRONÔMICOS**

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 22 de fevereiro de 2010.

Profª. Dra. Luciane Vilela Resende – UFLA

Prof. Dr. Marcos Ventura Faria – UNICENTRO-PR

Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva – UNICENTRO-PR

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende – UNICENTRO-PR

Orientador

GUARAPUAVA-PR

2010

Dedico

As duas mulheres da minha vida,
Rafaela Carminatti e Laura Huguette Ferreira.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS, por ter me abençoado e permitido vencer mais uma etapa da vida.

A minha namorada Rafaela Carminatti, pela companhia, amizade, carinho e compreensão pelos diversos momentos de ausência.

Aos meus familiares que apoiaram e incentivaram todos esses anos, especialmente a minha mãe e irmãos, que souberam “aceitar” à distância desses últimos sete anos e tiveram a compreensão do que pode ser melhor para mim.

Ao amigo e orientador Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende, que me deu a oportunidade de ser um dos seus orientados, sendo essa sem dúvida uma parceria que deu certo. Além do mais, o mesmo foi fundamental pela continuidade dessa jornada, no doutorado, certamente a maior conquista da minha vida.

Aos co-orientadores Dr. Marcos Ventura Faria e Dr. Paulo Roberto da Silva, que me atenderam nos diversos momentos de dúvida e tiveram paciência e compreensão nas minhas dificuldades técnicas na área de genética e marcadores moleculares.

A Universidade Estadual do Centro-Oeste, que possibilitou a realização desse trabalho, por meio de sua infraestrutura e funcionários.

A Fundação Araucária, que financiou os estudos e possibilitou a conclusão dessa obra.

As instituições de ensino UFLA e UFRGS, por ter cedido os laboratórios para as análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Osnil Camargo, pelas sugestões e correções da dissertação.

A Dra Luciane Vilela Resende, pela colaboração técnica na execução das análises moleculares RAPD.

A Dra Carla Andréa Delatorre, pela colaboração técnica na execução das análises moleculares ISSR.

A acadêmica da UFLA Marcela Carvalho Andrade, pela ajuda concedida nas análises moleculares.

Aos colegas de trabalho: Alex, Alexandre, Daniel, Josué, Aline e Juliana que me ajudaram em diferentes ocasiões e possibilitaram a publicação de diversos trabalhos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para que esse trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1. Geral | 3 |
| 2.2. Específicos | 3 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 4 |
| 3.1. Origem e descrição botânica | 4 |
| 3.2. Caracterização e genealogia das cultivares | 7 |
| 3.2.1. Aromas | 8 |
| 3.2.2. Camarosa | 9 |
| 3.2.3. Camino Real | 10 |
| 3.2.4. Campinas | 10 |
| 3.2.5. Diamante | 11 |
| 3.2.6. Dover | 11 |
| 3.2.7. Oso Grande | 12 |
| 3.2.8. Sweet Charlie | 13 |
| 3.2.9. Toyonoka | 14 |
| 3.2.10. Tudla | 14 |
| 3.2.11. Ventana | 15 |
| 3.3. Marcadores moleculares RAPD | 16 |
| 3.4. Marcadores ISSR | 17 |
| 3.5. Caracteres morfoagronômicos no estudo de divergência genética | 19 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 21 |
| CAPÍTULO I | 28 |
| DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MORANGUEIRO POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD E ISSR | 28 |
| 1. INTRODUÇÃO | 30 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 2.1. Marcadores moleculares RAPD | 31 |
| 2.2. Marcadores moleculares ISSR | 32 |
| 2.3. Análise dos dados | 32 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 3.1. Marcadores RAPD | 33 |
| 3.2. Marcadores ISSR | 36 |
| 3.3. Marcadores ISSR e RAPD | 38 |
| 4. CONCLUSÕES | 40 |

| | |
|---|----|
| REFERÊNCIAS | 40 |
| CAPÍTULO II | 45 |
| DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CULTIVARES DE MORANGUEIRO BASEADA EM CARACTERES MORFOAGRONÔMICOS | 45 |
| 1. INTRODUÇÃO | 47 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4. CONCLUSÕES | 55 |
| 5. REFERÊNCIAS | 55 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 69 |

RESUMO

MORALES, Rafael Gustavo Ferreira. Divergência genética entre cultivares de morangueiro por meio de marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicos. Guarapuava: UNICENTRO, 2010. 69p. (Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a divergência genética entre 11 cultivares de morangueiro (Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana) utilizando caracteres morfoagronômicos e os marcadores moleculares RAPD e ISSR, indicando os cruzamentos mais promissores. Para avaliação molecular, a extração de DNA nos dois métodos seguiu o protocolo CTAB modificado, sendo as amplificações feitas por PCR e em seguida separados em gel de agarose (RAPD) e poliacrilamida (ISSR). A partir da leitura dos géis, para cada marcador, gerou-se uma matriz binária, calculando-se a partir dela a similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard. As cultivares foram agrupadas com base na matriz de similaridade genética usando UPGMA. Foram avaliados 29 caracteres morfoagronômicos relacionados à planta, folha, flor, fruto e aquênios do morangueiro, utilizando-se de uma escala de nota para a avaliação. Entre os marcadores moleculares, o ISSR foi mais eficiente que o RAPD no estudo de divergência genética do morangueiro, apresentando maior coerência com a origem e a genealogia das cultivares. Os caracteres morfoagronômicos foram menos eficientes para estudo de divergência genética, não sendo encontrada relação direta entre os valores de similaridade ou o dendograma, com a origem e a genealogia das cultivares. Entre as três técnicas avaliadas, os marcadores ISSR são os mais indicados para estudo de divergência genética em morangueiro. Os cruzamentos mais promissores, com base na divergência genética estimada a partir de dados moleculares RAPD e ISSR, são entre as cultivares Tudla e Ventana e entre Oso Grande e Ventana, respectivamente.

Palavras-Chave: *Fragaria x ananassa* Duch., DNA, melhoramento de plantas, análise multivariada.

ABSTRACT

MORALES, Rafael Gustavo Ferreira. Genetic diversity in strawberry cultivars based on morphological characteristics and molecular markers. Guarapuava: UNICENTRO, 2009. 68p. (Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal).

The aim of this study was to evaluate the genetic divergence of 11 strawberry cultivars (Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana) using morphological characters and RAPD and ISSR markers, indicating the most promising crosses. For molecular analysis, ADN extraction in both methods followed the modified CTAB protocol, and made the amplification by PCR and then separated by gel agorose (RAPD) and polyacrylamide (ISSR). From the reading of the gels, each marker, generated is a binary matrix, calculating from it the genetic similarity by the coefficient of Jaccard. The cultivars were grouped based on genetic similarity matrix using UPGMA. For the evaluation of morphological characteristics were selected 29 traits related to plant, leaf, flower, fruit and achenes of strawberries, using a range of marks for evaluation. Among the molecular markers, the ISSR was more efficient than the markers RAPD in the study of genetic diversity in strawberry, showing greater consistency with the origin and genealogy of the cultivars. Regarding grouping, ISSR method was more consistent with the origin and genealogy of the cultivars than the RAPD. The morphological characteristics were inefficient to study genetic diversity, not found a direct relationship between the values of similarity or dendrogram, with the origin and genealogy of the cultivars. Among the three techniques evaluated, the ISSR markers are more suitable for study of genetic diversity in strawberry. The most promising crosses, based on data and ISSR molecular markers, are among cultivars Tudla and Ventana, and Oso Grande and Ventana, respectively.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch., ADN, plant breeding, multivariate analysis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é cultivado nas mais variadas regiões do mundo, podendo ser considerada a espécie de maior expressão econômica do grupo das pequenas frutas (OLIVEIRA et al., 2006). No Brasil, a cultura teve grande expansão a partir da década de 1960, com difusão em regiões de clima temperado e subtropical, destacando-se pela alta rentabilidade por área e demanda intensa de mão-de-obra (SANTOS et al., 2003). A produção mundial de morangos é de 2,56 milhões de toneladas, sendo a produção brasileira responsável por 105.000 toneladas anuais, com destaque para os estados de Minas Gerais (33%), São Paulo (31%), Rio Grande do Sul (16%) e Paraná (9%) (AGRIANUAL, 2008).

Apesar da produção brasileira não configurar junto aos grandes produtores mundiais, existe viabilidade de aumentar a produção por meio de diversas técnicas de cultivo e desenvolvimento de novas cultivares (SATO & ASSUMPÇÃO, 2002). Segundo Ueno (2004), as cultivares de morango diferem de acordo com a adaptação regional, fazendo com que uma cultivar que se desenvolva satisfatoriamente bem em uma região não apresente o mesmo desempenho em outro local com condições ambientais diferentes. Antunes et al. (2006) relatam a importância de identificar o comportamento do morangueiro no local de cultivo, sendo este conhecimento muito importante para programas de melhoramento genético, bem como para o manejo da cultura.

O melhoramento do morangueiro teve início na Inglaterra em 1817 quando Thomas A. Knight, usando as espécies *F. virginiana* e *F. chiloensis*, produziu as cultivares Downton e Elton (CONTI, 1998). O princípio do melhoramento do morangueiro é o cruzamento dos melhores pais divergentes geneticamente, seleção e multiplicação dos clones promissores (CAMARGO & PASSOS, 1993).

Muitos métodos estão disponíveis para avaliar a divergência genética entre populações de plantas. Essas metodologias diferenciam-se na habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custos, facilidade de uso e repetibilidade dos resultados (MILACH, 1998). Diferentes caracteres de plantas são fontes de informação de dissimilaridade que estão, ou podem estar disponíveis para qualquer grupo de genótipos. Tais caracteres podem ser divididos em quatro grupos: agrônômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares. As diferenças entre genótipos em relação a quaisquer destes caracteres, revelam informações sobre as relações genéticas entre os genótipos estudados.

A caracterização de genótipos com marcadores moleculares baseados em DNA possibilita maior conhecimento do germoplasma disponível, pois permite a determinação do

nível de divergência genética e o padrão molecular de cada cultivar, dados que auxiliam o delineamento racional de cruzamentos para obtenção de cultivares superiores em curto prazo (WILLIAMS et al., 1990).

Entre os marcadores moleculares, o RAPD (random amplified polymorphic DNA), proposto por Williams et al. (1990), tem sido muito empregado no estudo de divergência genética nos últimos anos. A técnica consiste na extração do DNA de indivíduos, amplificação de fragmentos deste DNA pela técnica de PCR (polymerase chain reaction), separação de fragmentos amplificados de comprimentos diferentes por eletroforese e visualização de bandas correspondentes às regiões amplificadas por meio de coloração dos fragmentos de DNA com brometo de etídio ou SYBR Green (MILACH, 1998). A técnica RAPD é mais simples que outros marcadores moleculares, apresentando diversas vantagens, como, por exemplo, necessita pequenas quantidades de DNA, é aplicável a qualquer espécie, baixo custo, facilidade e rapidez no emprego da técnica. Por outro lado, a técnica ainda é criticada pela baixa repetibilidade experimental, embora esse problema possa ser contornado com a utilização de mais primers e de critérios mais rígidos no momento da interpretação dos resultados (TELLES et al., 2001).

Outro marcador molecular que vêm sendo muito utilizado é o ISSR (inter simple sequence repeats), uma variação dos marcadores SSR (simple sequence repeats), também conhecidos como microssatélites. Este método também é baseado em PCR, em que na reação utiliza-se um único primer, geralmente longo (16 a 25 pb) e constituído por sequências de “di” ou “tri” nucleotídeos. O produto da reação de PCR são sequências de diferentes tamanhos localizadas entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas (WOLFE, 2005). A separação e visualização das bandas seguem o descrito para RAPD, apresentando também a vantagem de não requerer informações de sucessão do genoma e de padrões altamente polimórficos, ou seja, não requerem informações prévias da sequência de DNA do organismo em estudo. Além disso, obtêm-se resultados rápidos, com muita eficiência, alta repetibilidade e baixo custo (ZIETJIEWICZ et al., 1994).

Caracteres morfoagronômicos também são usados para estudo de diversidade genética. Contudo, a sua eficiência muitas vezes está relacionada ao número de genes responsáveis pelo controle de determinada característica. Desta forma, em muitos casos esses caracteres apresentam sérias limitações, principalmente pelo efeito do ambiente, fazendo com que não sejam caracteres estáveis, além de muitos serem avaliados somente nas plantas adultas, o que requer tempo e espaço (VIEIRA, 2004).

A decisão de qual método utilizar depende dos recursos disponíveis e do grau de

confiabilidade do método. A comparação entre as técnicas de estudo de divergência genética é uma maneira de estimar o grau de dissimilaridade entre cultivares, sendo esse conhecimento fundamental para programas de melhoramento.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a divergência genética entre cultivares de morangueiro utilizando caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares.

2.2. Específicos

- Identificar a genealogia das 11 cultivares em estudo;
- Determinar os coeficientes de similaridade das 11 cultivares a partir de caracteres morfoagronômicos e os marcadores RAPD e ISSR;
- comparar a eficiência dos marcadores moleculares RAPD e ISSR no estudo da divergência genética, por meio das matrizes de similaridade e dos dendogramas;
- comparar os dados de similaridade e o dendograma das três técnicas supracitadas com as informações referentes à origem e genealogia das cultivares; e
- indicar em função dos resultados obtidos os cruzamentos mais promissores para início de um programa de melhoramento genético com a cultura.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Origem e descrição botânica

A origem do morangueiro cultivado *F. x ananassa* Duch., descrita por Darrow (1966), advém de uma hibridação natural entre as espécies octaplóides *F. chiloensis* ($2n=8x=56$) e *F. virginiana* ($2n=8x=56$) em um jardim botânico europeu há aproximadamente 260 anos. Plantas de *F. virginiana* chegaram a Europa no final do século XVII por diversas rotas desconhecidas, enquanto algumas plantas de *F. chiloensis* foram levadas à França em 1714 pelo Capitão francês François Frenzeir. Estas espécies obtiveram sucesso moderado após a introdução, destacando-se somente após serem identificados os primeiros frutos da hibridação que deu origem a *F. x ananassa*, por volta de 1750. Entretanto, apenas em 1817 o melhoramento do morangueiro teve início na Inglaterra quando Thomas A. Knight, usando as espécies *F. virginiana* e *F. chiloensis*, produziu as cultivares Downton e Elton (CONTI, 1998).

O morangueiro é classificado botanicamente, segundo Cronquist (1988), na divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Magnoliopsida (Dicotiledoneae), subclasse Rosidae, ordem Rosales, família Rosaceae, gênero *Fragaria* e a grande maioria das espécies cultivadas atualmente pertencem à espécie *Fragaria x ananassa* Duch.

As plantas que compõem o gênero *Fragaria* são herbáceas, atingem de 15 a 30 cm de altura, podendo ser rasteira e formar pequena touceira que aumenta de tamanho no decorrer do cultivo. A reprodução pode ser vegetativa, por meio dos estolões que formam as plantas filhas, ou sexuada via sementes que estão contidas nos aquênios. Apesar de ser uma cultura perene, anualmente é renovada devido ao acúmulo de doenças de um ciclo para outro (RONQUE, 1998). A planta é constituída pelo sistema radicular, coroa, folhas, estolões, flores e frutos.

As raízes apresentam aspecto fibroso e surgem da coroa na base de cada folha nova (Figura 1a) (BRAZANTI, 1989), sendo fasciculada, superficial, podendo atingir de 50 a 60 cm de profundidade. Aproximadamente 95% dessas raízes localizam-se nos primeiros 20 cm de solo, com concentração maior nos primeiros cinco centímetros (RONQUE, 1998). As raízes são divididas em primárias e secundárias; as secundárias são originadas das primárias e possuem como principal função a absorção de água e nutrientes.



Figura 1. Principais órgãos que constituem a planta de morangueiro. a) Sistema radicular; b) Coroa; c) Estípula; d) Trifólio; e) Estolho; f) Nó do estolho; g) Flor; h) Pseudofruto; i) Aquênios.

A primeira parte da planta acima do solo é a coroa (Figura 1b), que é um rizoma estolhoso, com entrenós curtos, cilíndrico e retorcido, com um condutor periférico em espiral nos dois sentidos unidos às folhas, cujas gemas terminais originam as folhas compactas, os estolhos ou as inflorescências, dependendo da sua idade fisiológica, fotoperíodo e temperatura (RONQUE, 1998). As gemas axilares normalmente formam coroas secundárias quando o fotoperíodo é longo demais para formar flores ou mais curto que o necessário para a formação de estolões (DURNER & POLING, 1988). Em uma plantação é importante que todas as plantas desenvolvam uma boa quantidade de coras laterais, pois estas estão diretamente relacionadas com a produtividade (RONQUE, 1998).

As folhas se originam da coroa de forma helicoidal, normalmente é constituída de duas estípulas membráceas (Figura 1c), de um pecíolo longo e, em geral, de três folíolos, um mediano e dois laterais (Figura 1d), ligados ao pecíolo por meio de peciólulos. O tamanho dos folíolos pode variar entre 3 a 20 cm, sofrendo influência do meio externo, como luminosidade e temperatura (FOLQUER, 1986). A distribuição de folíolos mantém-se uniforme durante todo o ciclo da cultura (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1996). A coloração do limbo varia de verde-clara até verde-escura, podendo apresentar-se brilhante a opaco e densamente piloso a glabro (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1996). Os folíolos são dentados e apresentam um grande número de estômatos (300 a 400 estômatos mm^{-2}), sendo devido a este aspecto morfológico que o morangueiro é muito sensível ao déficit hídrico, baixa umidade relativa e altas temperaturas, podendo uma folha transpirar até 25 ml de água por dia (BRAZANTI, 1989). O número e a área total de folhas no outono são diretamente relacionados com a produção de frutos no ano seguinte; assim, uma redução na área foliar causada por moléstias ou condições ambientais adversas tem um efeito direto na produtividade (RONQUE, 1998).

Os estolões ou estolhos são órgãos vegetativos que se desenvolvem a partir das gemas basais das folhas, crescem sobre a superfície do solo e tem a capacidade de emitir raízes e originar novas plantas (Figura 1e). As novas plantas surgem dos nós (Figura 1f), formando um conjunto de plantas em séries, pois cada nova planta forma outro estolão que forma uma nova planta e assim sucessivamente (RONQUE, 1998). As plantas formadas a partir do estolho dependem inicialmente da nutrição e da água fornecida pela planta matriz, até o desenvolvimento do próprio sistema radicular, o qual ocorre de 10-15 dias após a emissão das folhas (BRAZANTI, 1989). Possivelmente, o primeiro estolho emitido da origem a uma planta de maior desenvolvimento vegetativo e, supostamente, maior produtividade (RONQUE, 1998). As condições que favorecem a emissão de estolhos é fotoperíodo superior a 13-14 horas e temperatura maiores que 14 °C, sendo máxima em condições de dias longos e temperaturas de 20-26 °C (SONSTEBY, 1997). A produção de estolhos também é estimulada pelo maior vigor da planta, o que pode ser consequência da adubação empregada, principalmente rica em nitrogênio, ou até mesmo a maior quantidade de horas de frio acumuladas antes da primavera (FRANQUEZ, 2008).

O morangueiro possui flores geralmente andrógenas, porém, algumas cultivares podem ser unissexuais masculinas ou femininas (Figura 1g) (RONQUE, 1998). Sua simetria é actinomorfa e após a fecundação o receptáculo perde a forma transformando-se no pseudofruto (FOLQUER, 1986). As flores são agrupadas em inflorescências do tipo cimeira, que possui um eixo primário, dois secundários, quatro terciários e oito quaternários, sendo

que cada eixo carrega uma flor. O número de inflorescências por planta é bastante variável entre as cultivares e, muitas vezes, varia muito entre plantas da mesma cultivar (BRANZANTI, 1989). Na fase de florescimento ocorre diferenciação do meristema vegetativo para o floral, ocasionando a origem de pétalas, estames e pistilos. O androceu é constituído por 20 estames, filamentosos, um pouco mais curto que a corola e dentro do cálice (BRAZANTI, 1989). O gineceu dicarpelar apresenta vários carpelos muito pequenos. Os pistilos possuem um estilete simples disposto lateralmente no estigma indiviso e ovário (BRAZANTI, 1989). A corola é pentâmera, assim como o cálice, tendo geralmente 5-8 pétalas, comumente brancas, com forma que varia desde elíptica a arredondadas ou ovais (STAUDT, 1962). Para que ocorra a polinização, a temperatura mínima deve ser de 12 °C e a umidade relativa inferior a 94%, sendo que pistilos com problemas de polinização originam frutos deformados (RONQUE, 1998).

O que é comumente chamado de fruto do morangueiro (Figura 1h), na verdade é um pseudofruto constituído pelo receptáculo floral hipertrofiado, doce, carnoso e suculento, de tamanho e contornos regulares e uniformes, polpa firme, de coloração vermelha, com ótimo sabor e aroma, rico em materiais de reserva, onde se prendem os verdadeiros frutos, chamados aquênios. Os aquênios são diminutos, amarelos ou avermelhados, duros e superficiais, contendo uma única semente (Figura 1i) (RONQUE, 1998). O desenvolvimento do aquênio começa após a fertilização, que estimula o engrossamento do receptáculo, que uma vez transformado em carnoso, constitui um pseudofruto ou infrutescência, que recebe o nome de morango (BRANZANTI, 1989).

3.2. Caracterização e genealogia das cultivares

O desenvolvimento vegetativo e produtivo do morangueiro é influenciado principalmente por dois fatores ambientais; fotoperíodo e temperatura. Estes, na maioria dos casos, são determinantes para definir as regiões adequadas para cultivo. Antunes et al. (2006) relatam a importância de identificar o comportamento do morangueiro no local de cultivo, podendo-se levar em consideração os caracteres morfológicos, como descrito por Passos et al. (1994). Entretanto, é de fundamental importância conhecer os principais caracteres morfológicos do morangueiro no seu local de origem, onde foi selecionado e apresentou vantagens competitivas em relação aos demais clones. Desta forma, a descrição morfológica apresentada é baseada em diversos trabalhos de caracterização para pedido de patente nos Estados Unidos, com exceção da cultivar Campinas, desenvolvida e avaliada no Brasil. Sendo

assim, as descrições a seguir estão relacionadas às potencialidades das cultivares, que podem ou não serem expressas dependendo do local de cultivo. Cabe ressaltar também que a genealogia parcial das cultivares Camarosa, Campinas, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie e Tudla apresentadas a seguir foram construídas a partir de uma revisão bibliográfica em sites, livros, periódicos e arquivos de patente.

3.2.1. Aromas

Desenvolvido na Universidade da Califórnia (EUA), foi inicialmente designada como ‘CN209’, sendo resultado do cruzamento realizado em 1991 entre os clones ‘Cal. 87.112-6’ e ‘Cal. 88.270-1’ (Tabela 1) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dia neutro, vigor e densidade foliar média, formato do recorte da folha arredondada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-escuro, médio brilho foliar, estípula pequena, início da floração precoce, flores posicionadas acima do dossel, de 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, reflorescimento média, fruto primário grande de formato cuneiforme, com inserção no cálice saliente, epiderme medianamente resistente, de coloração vermelho-negro e brilho médio, cálice de tamanho médio e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios de tamanho intermediário, número mediano e salientes na epiderme, polpa vermelha e firme, cavidade interna do fruto de tamanho médio, teores medianos de açúcares, acidez e flavor, com qualidade organoléptica mediana e de colheita tardia (SHAW, 1998a).

Tabela 1. Genitores, país de origem e ano de lançamento das cultivares Aromas, Camino Real, Diamante, Toyonoka e Ventana.

| Cultivar | País de Origem | Genitores | Ano |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------------|------------|
| Aromas | USA - Califórnia | ‘Cal. 87.112-6’ x ‘Cal. 88.270-1’ | 1991 |
| Camino Real | USA - Califórnia | ‘Cal.89.230-7’ x ‘Cal.90.253-3’ | 1994 |
| Diamante | USA - Califórnia | ‘Cal. 87.112-6’ x ‘Cal. 88.270-1’ | 1992 |
| Toyonoka | Japão | Himiko x Harunoka | 1983 |
| Ventana | USA - Califórnia | ‘Cal.93.70-606’ x ‘Cal.92.35-601’ | 1996 |

3.2.2. Camarosa

Desenvolvida na Universidade da Califórnia (EUA), foi inicialmente designada como ‘Cal. 88.24-603’, resultado do cruzamento realizado em 1988 entre a cultivar Douglas e o clone ‘Cal. 85.218-605’ (Figura 2) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor médio-forte e densidade foliar média, formato do recorte da folha arredondada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-clara, médio brilho foliar, ausência de estípula, início da floração muito precoce, flores posicionadas no meio do dossel e de 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, reflorescimento média, fruto primário grande de formato quase cilíndrico, com inserção no cálice saliente, epiderme do fruto medianamente resistente, com coloração vermelho-escuro e brilho médio, cálice de tamanho grande e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios de tamanho intermediário, em grande número e inclusos na epiderme, polpa vermelha e muito firme, cavidade interna do fruto pequena, teor muito alto de açúcar, teores medianos de acidez e flavor, com boa qualidade organoléptica e de colheita precoce (VOTH et al., 1994). Em relação às doenças, é suscetível à mancha de micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), à antracnose (*Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum acutatum*) e ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (SANTOS, 2005).

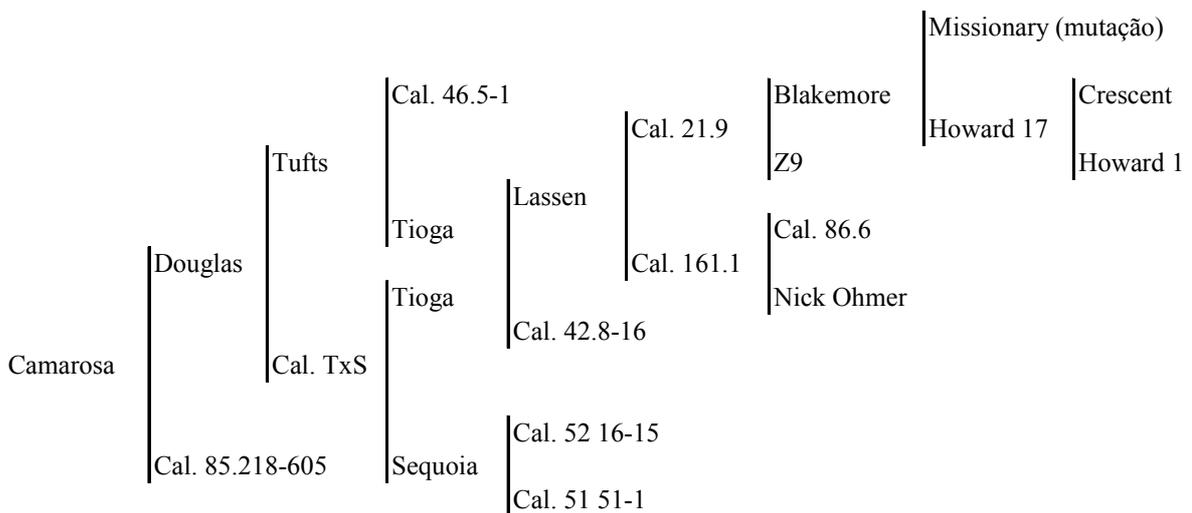


Figura 2. Genealogia parcial da cultivar de morangueiro Camarosa.

3.2.3. Camino Real

Desenvolvida na Universidade da Califórnia (EUA), foi inicialmente designada como ‘C213’, sendo resultado do cruzamento realizado em 1994 entre os clones ‘Cal. 89.230-7’ e ‘Cal. 90.253-3’ (Tabela 1) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor e densidade foliar média, formato do recorte da folha arredondado, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-clara, médio brilho foliar, estípula pequena, início da floração precoce, flores posicionadas no meio do dossel, com 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e menor que o cálice, reflorescimento média, fruto muito grande de formato quase cilíndrico, com inserção do mesmo nível do cálice, epiderme do fruto medianamente resistente, de coloração vermelho-escuro e brilho fraco, cálice grande e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios de tamanho intermediário, número mediano e inclusos na epiderme, polpa vermelho-escuro e firme, cavidade interna do fruto pequena, teores medianos de açúcares, média acidez e flavor fraco, com pouca qualidade organoléptica e de colheita precoce (SHAW & LARSON, 2002).

3.2.4. Campinas

Desenvolvida em 1960 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo, Brasil. É resultado do cruzamento entre as cultivares norte-americanas Donner e Tahoe. Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, planta vigorosa, semi-eretas, com folhas arredondadas e verde-escuras, boa produtividade, precoce, frutos pouco protegidos pelas folhas, o cálice destaca-se facilmente do fruto, fruto grande, de formato cônico alongado, com pescoço, regularmente firme, epiderme vermelho-rosa e brilhante, internamente rosa, aquênios reentrantes, altos teores de açúcares e com boa qualidade organoléptica. Em cultivos comerciais especializados na produção de mudas é normal obter 120-180 mudas de estolho por planta, correspondendo a 840.000-1.260.000 mudas por hectare. Em relação às doenças, é tolerante à mancha angular (*Xanthomonas fragariae*), susceptível a rizoctoniose (*Rhizoctonia*), antracnose (*Colletotrichum* sp), à murcha de verticillium (*Verticillium albo-atrum*) e a mancha de micosferela (*Mycosphaerella fragariae*) (CAMARGO & PASSOS, 1993).

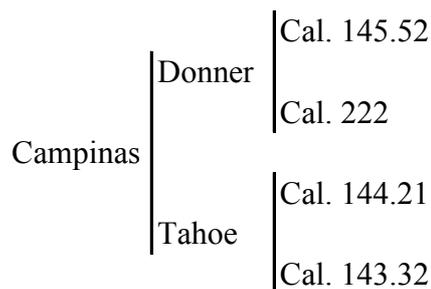


Figura 3. Genealogia parcial da cultivar de morangueiro Campinas.

3.2.5. Diamante

Desenvolvida na Universidade da Califórnia (EUA), foi inicialmente designada como ‘CN210’, resultado do cruzamento realizado em 1992 entre os clones ‘Cal. 87.112-6’ e ‘Cal. 88.270-1’ (Tabela 1) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dia neutro, vigor médio e fraca densidade foliar, formato do recorte da folha arredondada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-escuro, médio brilho foliar, estípula pequena, início da floração precoce, flores posicionadas acima do dossel, com 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, reflorescimento média, fruto primário muito grande de formato cônico, com inserção no cálice saliente, epiderme resistente, de coloração vermelho-alaranjada e brilho muito forte, cálice de tamanho médio e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios de tamanho intermediário, em grande número e salientes na epiderme, polpa vermelho-alaranjada e muito firme, cavidade interna do fruto pequena, teores medianos de açúcares e flavor, fraca acidez, com qualidade organoléptica mediana e de colheita precoce (SHAW, 1998b).

3.2.6. Dover

Desenvolvida na Universidade da Flórida (EUA), esta cultivar foi selecionada para a característica de resistência a antracnose nas condições da Florida, resultado do cruzamento realizado em 1973 entre a cultivar Florida Belle e o clone ‘Fla. 71-189’ (Figura 4) (HOWARD & ALBREGTS, 1980). Essa cultivar é caracterizada por alta produtividade, vigor médio, coroa grossa, produção inicial precoce, fruto grande de formato cônico-alongado, epiderme e polpa de coloração vermelho intensa, pouco ácido e de aroma pouco evidenciado, frutos de pouco sabor, alta sensibilidade ao ataque de *Xanthomonas* e tolerância a fungos de

solo. A firmeza do fruto possibilita boa conservação pós-colheita, adequado para mercados distantes das áreas de produção (HOWARD & ALBREGTS, 1980; SANTOS, 2005).

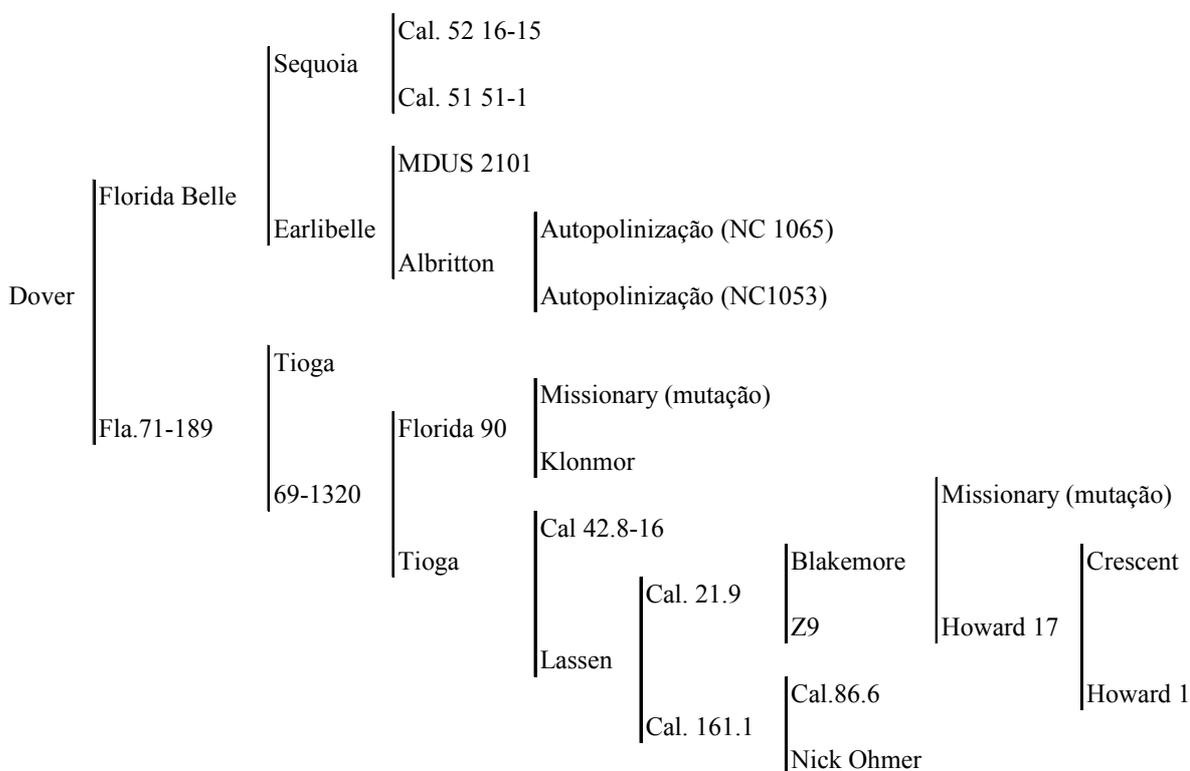


Figura 4. Genealogia parcial da cultivar de morangueiro Dover.

3.2.7. Oso Grande

Desenvolvida na Universidade da Califórnia (EUA), foi inicialmente designada como ‘Cal. 81.43-603’, resultado do cruzamento realizado em 1981 entre a cultivar Parker e o clone ‘Cal. 77.3-603’ (Figura 5) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor médio-forte e densidade foliar média, formato do recorte da folha serrilhada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-escura, médio brilho foliar, estípula grande, início da floração precoce, flores posicionadas no meio do dossel, com 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, re floração média, fruto primário grande de formato cuneiforme, com inserção no nível do cálice, epiderme medianamente resistente, de coloração vermelho-escuro e pouco brilho, cálice de tamanho médio e facilidade de remoção mediana, sépalas de tamanho médio, aquênios de tamanho intermediário, em grande número e emergentes na epiderme, polpa amarelo-esbranquiçada e firme, cavidade interna do fruto grande, altos teores de açúcares, teores medianos de acidez e flavor, com qualidade organoléptica mediana e de colheita nem precoce e nem tardia (VOTH &

BRINGHURST, 1989). É sensível a fungos de solo, tolerante ao mofo cinzento (*B. cinerea*), susceptível à mancha de micosferela (*M. fragariae*) e à antracnose (*C. fragariae* e *C. acutatum*) (SANTOS, 2005).

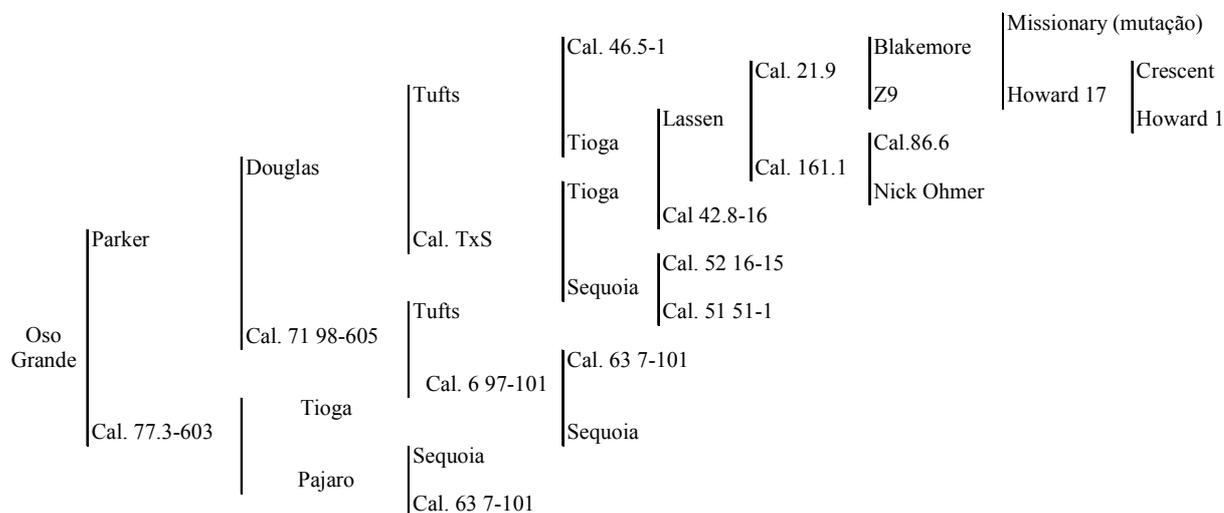


Figura 5. Genealogia parcial da cultivar de morangueiro Oso Grande.

3.2.8. Sweet Charlie

Desenvolvida na Universidade da Flórida (EUA), foi inicialmente designada como ‘FL 85-4925’, resultado do cruzamento realizado em 1992 entre a cultivar Pajaro e o clone ‘FL 80-456’ (Figura 6) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor e densidade foliar média, formato do recorte da folha arredondada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-escura, médio brilho foliar, estípula grande, início da floração muito precoce, flores posicionadas no meio do dossel, com 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, re floração média, fruto primário médio de formato quase cilíndrico, incluso no cálice, epiderme medianamente resistente, de coloração vermelho-escuro e brilho muito forte, cálice de tamanho médio e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios de tamanho e número intermediário e emergentes na epiderme, polpa vermelha e pouco firme, cavidade interna do fruto pequena, altos teores de açúcar, teores medianos de acidez e flavor, com boa qualidade organoléptica e de colheita muito precoce (HOWARD, 1994).

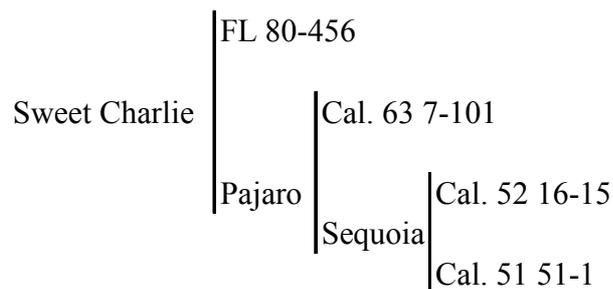


Figura 6. Genealogia parcial da cultivar de morangueiro Sweet Charlie.

3.2.9. Toyonoka

Cultivar desenvolvida no Japão por meio do cruzamento realizado em 1983 entre as cultivares Himiko e Harunoka (Tabela 1) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor médio-forte e densidade foliar média, formato do recorte da folha arredondada, folha grande, cor da superfície adaxial verde-clara, médio brilho foliar, estípula grande, início da floração muito precoce, flores posicionadas acima do dossel e com cinco pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, pequena reflorescimento, fruto primário de tamanho mediano de formato quase cilíndrico, com inserção no cálice saliente, epiderme medianamente resistente, de coloração vermelho-alaranjado e pouco brilho, cálice de tamanho mediano e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios pequenos, em número intermediário e salientes na epiderme, polpa amarelo-esbranquiçado e pouco firme, cavidade interna do fruto pequena, teores muito alto de açúcar e medianos de acidez e flavor, com boa qualidade organoléptica e de colheita muito precoce (FAEDI et al., 2009).

3.2.10. Tudla

Cultivar desenvolvida na Espanha por meio do cruzamento realizado em 1992 entre as cultivares Parker e Chandler (Figura 7) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor médio-forte e densidade foliar média, formato do recorte da folha arredondada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-clara, médio brilho foliar, estípula pequena, início da floração precoce, flores posicionadas no meio do dossel, com 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e maior que o cálice, reflorescimento média, fruto primário grande de formato quase cilíndrico, com inserção no cálice saliente, epiderme sem resistência, de coloração vermelho-escuro e brilho médio, cálice de tamanho mediano e de fácil remoção, sépalas pequenas, aquênios pequenos, em número mediano e salientes na

epiderme, polpa vermelha e firme, cavidade interna do fruto pequena, teor muito alto de açúcar, alta acidez e flavor mediano, com boa qualidade organoléptica e de colheita precoce (FAEDI et al., 2009). Tolerante ao mofo cinzento (*B. cinerea*) e susceptível à mancha de micoserela (*M. fragariae*) e à antracnose (*C. fragariae* e *C. acutatum*) (SANTOS, 2005).

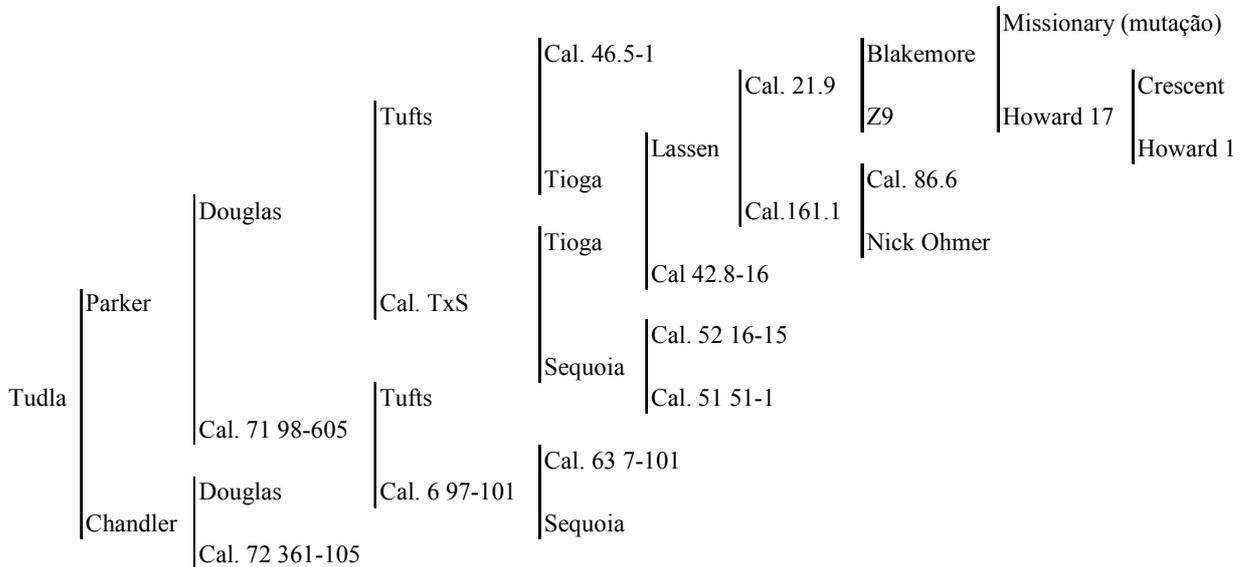


Figura 7. Genealogia parcial da cultivar de morangueiro Tudla.

3.2.11. Ventana

Desenvolvida na Universidade da Califórnia (EUA), foi inicialmente designada como ‘C216’, resultado do cruzamento realizado em 1996 entre os clones ‘Cal. 93.170-606’ e ‘Cal. 92.35-60’ (Tabela 1) (FAEDI et al., 2009). Caracteriza-se como cultivar de dias curtos, vigor médio-forte e alta densidade foliar, formato do recorte da folha serrilhada, folha de tamanho médio, cor da superfície adaxial verde-escura, médio brilho foliar, estípula pequena, início da floração muito precoce, flores posicionadas no meio do dossel, de 5 a 8 pétalas, corola de tamanho médio e do mesmo tamanho que o cálice, re floração média, fruto primário grande de formato cônico, com inserção no nível do cálice, epiderme medianamente resistente, de coloração vermelho-escuro e brilho mediano, cálice grande e de fácil remoção, sépalas de tamanho médio, aquênios pequenos, em grande número e inclusos na epiderme, polpa vermelho-alaranjado e firme, cavidade interna pequena, teores medianos de açúcares e acidez, flavor fraco, com qualidade organoléptica mediana e de colheita muito precoce (LARSON & SHAW, 2003).

3.3. Marcadores moleculares RAPD

Muitos métodos estão disponíveis para avaliar a divergência genética em populações de plantas. Essas metodologias diferenciam-se na habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custos, facilidade de uso, consistência e repetibilidade dos resultados (MILACH, 1998). Os marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA), proposto por Williams et al. (1990) esta no grupo dos principais marcadores utilizados no estudo de divergência genética em populações de plantas. A técnica consiste na extração do DNA de indivíduos, amplificação de fragmentos deste DNA pela técnica da PCR, separação de fragmentos amplificados de comprimentos diferentes por eletroforese e visualização de bandas correspondentes a regiões amplificadas por meio de coloração dos fragmentos de DNA com brometo de etídio ou SYBR Green (MILACH, 1998).

Os marcadores RAPD são dominantes, visto que a presença de uma determinada banda não determina se o loco correspondente é homozigoto (AA) ou heterozigoto (Aa) (WILLIAMS et al., 1990). Porém, os marcadores moleculares revelam uma marca ou fragmento que permite comparar os indivíduos em estudo quanto à sua presença ou ausência. Assim, as bandas reveladas são codificadas numa matriz formada pelos números 1 e 0, ao qual será aplicado o método estatístico (MEYER, 2002).

Os marcadores RAPD são mais simples que outros marcadores moleculares, como, por exemplo, RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeats) e ISSR (inter simple sequence repeat), facilitando o estudo de um grande número de locos e fornecendo uma maior amostragem aleatória do DNA (WILLIAMS et al., 1990). O método apresenta como vantagem a não utilização de radioatividade, não requer o conhecimento prévio da sequência alvo a ser amplificada, necessita de pequenas quantidades de DNA, é aplicável a qualquer espécie, baixo custo, facilidade e rapidez no emprego da técnica. Por outro lado, a técnica ainda é criticada pela baixa repetibilidade experimental, embora esse problema possa ser contornado com a utilização de mais primers e de critérios mais rígidos no momento da interpretação dos resultados (TELLES et al., 2001). Ainda, ocorrem alterações nos resultados em função das condições da PCR, tais como a concentração de MgCl₂, de DNA molde e de nucleotídeos na solução, a temperatura de andamento, o tipo de polimerase, o tipo de termociclador e a composição dos primers (MILACH, 1998).

Os marcadores moleculares RAPD têm sido utilizados em grande número de culturas e em diversas ocasiões, como, por exemplo, na caracterização de genótipos de mirtilo (SILVA

et al., 2008), na confirmação de híbridos interespecífico artificiais no gênero *Passiflora* (JUNQUEIRA et al., 2008), na identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembriônicas de mangaueira (CORDEIRO et al., 2006), na similaridade genética de cultivares de alho (MOTA et al., 2006), na diversidade genética em quiabeiro (MARTINELLO et al., 2003), dentre outras.

Na cultura do morangueiro os marcadores RAPD demonstram ser eficientes na identificação e análise de divergência genética de cultivares. No trabalho de Gidoni et al. (1994), foram utilizados 10 primers para identificação de oito cultivares de morangueiro, sendo que os autores concluíram que a técnica é eficiente para tal finalidade. Já no estudo de Parent & Pagé (1995), foi possível a identificação de 13 cultivares de morangueiro por meio de uma chave dicotômica gerada a partir de dados RAPD. Em seu trabalho, Graham et al. (1996) estudaram oito clones de morangueiro com 116 marcadores RAPD; comparando os dendogramas formados com os dados de RAPD e com os dados da genealogia, concluíram que o grau de similaridade quando estimado pelo pedigree é menor que aquele calculado pelos dados moleculares, indicando que o método de pedigree apresenta diferenças grandes em cultivares que na verdade são semelhantes pelo método RAPD. Mais recentemente, Conti et al. (2002a) estudaram a similaridade genética de 26 cultivares de morango e concluíram que com o método de RAPD é possível fazer inferências precisas quanto à similaridade entre cultivares. Em outro trabalho, Conti et al. (2002b) compararam o método de caracterização molecular com o morfológico e concluíram que é viável utilizar o método de caracterização molecular RAPD no morangueiro.

3.4. Marcadores ISSR

Os marcadores SSR (simple sequence repeats), também conhecidos como microssatélites, são sequências bastante frequentes de nucleotídeos, entre 1 a 6 bases, distribuídos ao acaso no genoma de seres eucariotas. Os locos de SSR se tornaram uma nova geração de marcadores genéticos, porém, o uso deste marcador requer o conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos para que se construam os primers que serão usados na PCR (LIU & WENDEL, 2001). Entretanto, descobrir e caracterizar um número grande de primers SSR é demorado, além de ser um processo oneroso. Desta forma, Zietjiewicz et al. (1994) desenvolveram um tipo de marcador baseado em SSR, os chamados ISSR (inter simple sequence repeats).

A reação de PCR-ISSR utiliza um único primer geralmente longo (16 a 25 pb) e constituído por sequências de “di” ou “tri” nucleotídeos. O produto da reação de PCR são sequências de diferentes tamanhos localizadas entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas (WOLFE, 2005). O tamanho dos fragmentos amplificados varia de 200 a 2000 pb e apresentam alta repetibilidade, devido possivelmente, ao uso de primers longos o qual permitem um subsequente uso de altas temperaturas de pareamento do mesmo (BORNET & BRANCHARD, 2001). Para separação e visualização dos produtos da amplificação pode ser utilizada eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo (JOSHI et al., 2000) ou eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (BLAIR et al., 1999).

A principal vantagem dos marcadores ISSR é que a amplificação não requer informações de sucessão do genoma e de padrões altamente polimórficos, ou seja, não requerem informações prévias da sequência de DNA do organismo em estudo. Além disso, obtêm-se resultados rápidos, com muita eficiência, alta repetibilidade e baixo custo (ZIETJIEWICZ et al., 1994). Entretanto, uma desvantagem dos marcadores ISSR é a sua dominância (ZIETJIEWICZ et al., 1994).

Atualmente, os marcadores ISSR vem sendo utilizados em estudos de populações naturais de plantas, fungos e insetos (WOLFE, 2005), provando ser útil também em detecção clonal, estudos de divergência genética e identificação de indivíduos aparentados (WOLFE & LISTON, 1998; WOLFE et al., 1998; WOLFE & RANDLE, 2001; SOUZA et al., 2005; SLOTTA & PORTER, 2006).

No morangueiro, ainda é incipiente os estudos de divergência utilizando os marcadores ISSR, ficando o estudo restrito a poucos trabalhos. Hussein et al. (2008) estudaram a divergência genética de seis cultivares de morangueiro por meio dos marcadores ISSR e observaram que a técnica apresentou distinção adequada entre todas as cultivares de morango, concluindo que a mesma tem grande potencial na identificação de cultivares, aliando simplicidade, rapidez, sendo altamente discriminante e de confiança. Anita et al. (2004) estudaram as relações genéticas entre 24 cultivares de morango usando RAPD e ISSR e obtiveram resultados semelhantes para ambas às técnicas, porém, os valores de similaridade baseada em dados de ISSR foram maiores do que aqueles baseados em RAPD. Um estudo com 24 cultivares de morango comparando os marcadores ISSR e RAPD foi realizado por Korbin et al. (2002), sendo observado semelhança nos agrupamentos de similaridade das cultivares. Entretanto, a conclusão que os autores chegaram é que foi necessário seis vezes

mais primers RAPD para alcançar valores semelhantes de similaridade aos obtidos pelos marcadores ISSR.

3.5. Caracteres morfoagronômicos no estudo de divergência genética

Os primeiros relatos da utilização de caracteres morfológicos estão relacionados à identificação, descrição e classificação dos seres vivos (MUHLENS et al., 2000). Charles Darwin foi um dos primeiros a utilizar a morfologia para obter conclusões importantes sobre a teoria da seleção natural, pela observação de caracteres morfológicos internos e externos dos vegetais, tais como tamanho, disposição, cor, forma e posição dos elementos estruturais da planta, sendo todos eles de fácil identificação visual (AMORIM, 1996). A construção dos primeiros mapas genéticos, as teorias sobre ligações gênicas e mendelianas, também utilizaram caracteres morfológicos como base de estudo (STEINER & GREENE, 1996).

Os caracteres morfoagronômicos são tradicionalmente usados na caracterização de cultivares e têm sua importância reconhecida. Apresentam, porém, algumas limitações principalmente pelo efeito do ambiente, fazendo com que não sejam caracteres estáveis, além de muitos serem avaliados somente nas plantas adultas, o que requer tempo e espaço (VIEIRA, 2004). Contudo, eles têm papel fundamental na divulgação das características agrônomicas de novos materiais genéticos, influenciando decisivamente a escolha de cultivares (PECCHIONI et al., 1996).

A principal vantagem dos caracteres morfoagronômicos nos estudos de divergência genética é o baixo custo, sendo a maior parte das avaliações visuais, não envolvendo análises laboratoriais, ao contrário do que acontece com os marcadores moleculares e bioquímicos. Como desvantagem, Castellen (2000) relata que os caracteres morfológicos são controlados por um baixo número de locos e, também, poucas espécies apresentam características de fácil identificação com herança mendeliana simples. Outras desvantagens, conforme Ferreira & Grattapaglia (1998), são a presença de um pequeno número de caracteres morfológicos ligados a genes de importância econômica e o fato desses caracteres somente serem identificados, em sua maioria, na planta adulta. Outro fator importante a ser considerado é que os caracteres morfológicos, frequentemente, são controlados por genes dominantes, não permitindo distinguir plantas heterozigóticas, sendo expressos muitas vezes somente na planta adulta, não sendo práticos quando se trabalha com espécies de ciclo de vida longo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais caracteres morfoagronômicos levados em consideração na identificação

e caracterização de cultivares de morangueiro são descritos por Faedi et al. (2009), sendo eles encontrados nos diferentes órgãos vegetais. São eles:

- Na planta: número de coroas, hábito vegetativo, densidade foliar, início da floração, vigor e uniformidade do vigor;
- Folhas: formato do folíolo terminal, forma do recorte, relação comprimento/largura, cor página superior, brilho, pigmentação da estípula;
- Flor: posição, número de pétalas, tamanho da corola, tamanho da corola em relação ao cálice, reflorescimento, facilidade de remoção, tamanho do cálice e das sépalas;
- Frutos: produção, regularidade na produção, uniformidade de produção, inserção no cálice, formato mais frequente, resistência da epiderme, cor, brilho, homogeneidade da cor, cor da ponta;
- Aquênios: cor, tamanho, número e inserção na polpa; e
- Polpa: cor, firmeza e tamanho da cavidade interna.

Conti et al. (2002b) utilizaram caracteres morfológicos (forma dos dentes, ângulo da base e razão entre o comprimento e a largura do folíolo, cor da folha, posição da inflorescência em relação à folhagem e tamanho do cálice em relação ao fruto) e marcadores moleculares para estudo de divergência genética em cultivares de morangueiro, e observaram que a disposição das cinco cultivares nos dendogramas foi igual, só diferindo o grau de similaridade entre elas. Desta forma, a utilização de caracteres morfológicos para estudo de divergência genética em morangueiro pode ser uma opção interessante, pois não necessita de equipamentos e reagentes caros, com redução considerável de custos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2008. 419p.

AMORIM, I.L. **Morfologia de frutos, sementes, germinação, plântulas e mudas de espécies florestais da região de Lavras-MG**. 1996. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ANITA, K.; MALGORZATA, K.; EDWARD, Z. Comparison of suitability of RAPD and ISSR techniques for determination of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) relationship. **Plant Cell, Tissue and Organ, Culture Springer Netherlands**, v.79, p.189–193, 2004.

ANTUNES, O.T.; CALVETE, E.O.; ROCHA, H.C.; NIENOW, A.A.; MARIANI, F.; WESP, C.L. Floração, frutificação e maturação de frutos de morangueiro cultivados em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.426-430, 2006.

BLAIR, M.W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). **Theoretical and applied genetics**, v.98, p.780–792, 1999.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat SSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant molecular biology reporter**, v.19, p.209-215, 2001.

BRAZANTI, E.C. **La Fresa**. Madrid. Mundi-Prensa, 1989. 386p.

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

CASTELLEN, M.S. **Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em população naturais de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.** 2000. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Escola Superior de Agricultura Luiz

de Queiroz, Piracicaba, SP.

CONTI, J.H. **Estudo de caracteres morfológicos, agronômicos e moleculares em cultivares de morango** (*Fragaria x ananassa* Duch.). 154p. USP: Esalq (Tese de Doutorado). 1998.

CONTI, J.H.; MINAMI, K.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares de morangueiro por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.145-152, 2002a.

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

CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C.Q.; RAMOS, V.H.V.; FALEIRO, F.G.; FRAGA, L.M.S. Identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembriônicas de mangueira (*Mangifera indica*, L.) cv. rosinha por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p. 454-457, 2006.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden. 1988.

DARROW, G.M. **The strawberry: History, Breeding and Phisiology**. New York: Holt, Rinehart and Wiston, 1966. 447p.

DURNER, E.F.; POLING, E.B. Strawberry developmental responses to photoperiod and temperature: A review. **Advanced Strawberry Production**, v.7, p.6-14, 1988.

FAEDI, W.; BARUZZI, G.; LOVATI, F.; SBRIGHI, P.; LUCCHI, P. **Monografia di cultivar di fragola**. Roma: Istituto Sperimentale per la Frutticoltura Roma, v.2, 2009. 240p.

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

FOLQUER, F. **La frutilla o fresa**. Editora Hemisfério Sur, Buenos Aires, 1986, p. 24-51.

FRANQUEZ, G.G. **Seleção e multiplicação de clones de morangueiro** (*Fragaria x ananassa* Duch.). 2008. 118p. Tese (Doutorado). Santa Maria: UFSM.

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

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

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

HOWARD, C.M. **Strawberry plant called 'Sweet Charlie'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 8,729, 1994.

HUSSEIN, T.S.; TAWFIK, A.A.; KHALIFA, M.A. Molecular identification and genetic relationships of six strawberry varieties using ISSR markers. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.10, p. 677–80, 2008.

JOSHI, S.P.; GUPTA, V.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1311–1320, 2000.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; RAMOS, J.D.; BRAGA, M.F.; SOUZA, L.S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.191-196, 2008.

KORBIN, M.; KURAS, A.; ZURAWICZ, E. Fruit plant germplasm characterization using molecular markers in RAPD and ISSR-PCR. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.7, p.785–794, 2002.

LARSON, K.D.; SHAW, D.V. **Strawberry plant named ‘Ventana’**. USA: The Regents of the University of California. Plant Patent 13,469P3, 2003.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.205-208, 2001.

MARTINELLO, G.E.; LEAL, N.R.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, M.G.; DAHER, R.F. Diversidade genética em quiabeiro baseada em marcadores RAPD. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.1, p.20-25, 2003.

MEYER, A.S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

MOTA, J.H.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.156-160, 2006.

MUHLENS, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Variabilidade genética em etnovariedades de mandioca avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.319-328, 2000.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; WREGE, M.S.; UENO, B.; CASTRO, L.A.S. **Otimização da produção nacional de mudas de morangueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos 162, 2006, 28 p.

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**, v.75, n.1, p.221-224, 1995.

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

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M., TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Genetic and Breeding**, v.50, p.203-219, 1996.

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

RONQUE, E.R.V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba:EMATER-PR, 1998. 206p.

SANTOS, A.M. Cultivares. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (Eds.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.24-30. (Frutas do Brasil, 40).

SANTOS, P.E.T. **Sistema de Produção do Morango: Características básicas das principais cultivares de morango plantadas no Brasil**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap02.htm>>. Acesso em 15 out. 2009.

SATO, G.S.; ASSUMPÇÃO, R. Pólos de produção de morango. **Informações econômicas**, v.32, n.11, p.41-49, 2002.

SHAW, D.V. **Strawberry plant named 'Aromas'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 10,451, 1998a.

SHAW, D.V. **Strawberry plant 'Diamante'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 10,435, 1998b.

SHAW, D.V.; LARSON, K.D. **Strawberry plant named 'Camino Real'**. USA: The Regents of the University of California. Plant Patent 13,079P2, 2002.

SILVA, D.A.S; ANTUNES, L.E.C.; ANTHONISEN, D.G.; LEMÕES, J.S.; GONÇALVES, E.D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.180-184, 2008.

SLOTTA, T.A.B.; PORTER, D.M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.151, p.345–354, 2006.

SONSTEBY, A. Short-day period and temperature interactions on growth and flowering of strawberry. **Acta Horticulturae**, n.439, p.609-616, 1997.

SOUZA, V.Q.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; LUZ, V.K.; OLIVEIRA, A.C. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, v.64, p.569-575, 2005.

STAUDT, G. Taxonomic studies in the genus *Fragaria*: Typification of the *Fragaria* species know at the time of Linnaeus. **Canadian Journal of Botany**, v.40 p.869-886, 1962.

STEINER, J.J.; GREENE, S.L. Proposed ecological descriptors and their utility for plant germoplasm collections. **Crop Science**, v.36, n.2, p.439-451, 1996.

TELLES, M.P.C.; MONTEIRO, M.S.R.; RODRIGUES, F.M.; SOARES, T.N.; RESENDE, L.V.; AMARAL, A.G.; MARRA, P.R. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.87-95, 2001.

UENO, B. Manejo integrado de doenças do morango. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.69-77. 2004.

VIEIRA, E.S.N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização**

de cultivares de soja e café. 137 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

VOTH, V.; BRINGHURST, R.S. **Strawberry plant called 'Oso Grande'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 6,578, 1989.

VOTH, V.; SHAW, D.V.; BRINGHURST, R.S. **Strawberry plant called 'Camarosa'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 8,708, 1994.

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

WOLFE, A.D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzimol.**, n.395, p.134-144, 2005.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (eds). **Plant molecular systematics II**. Boston: Kluwer, 1998. p.43-86.

WOLFE, A.D.; RANDLE, C.P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. **Systematic Botany**, v.26, n.1, p.120-130, 2001.

WOLFE, A.D.; XIANG, Q.Y.; KEPHART, S.R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (*Scrophulariaceae*) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v.7, p.1107-1125, 1998.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.

CAPÍTULO I

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MORANGUEIRO POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD E ISSR

RESUMO

O morango é muito apreciado em todo o mundo, sendo considerado o principal fruto do grupo das pequenas frutas. A caracterização de suas cultivares, por meio de marcadores moleculares, possibilita maior conhecimento do germoplasma disponível, fornecendo rápidas estimativas da diversidade genética em plantas, sendo essas informações úteis para o início de um programa de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a divergência genética de 11 cultivares de morangueiro por meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR, indicando os possíveis cruzamentos promissores. Para tanto, a extração do DNA seguiu o protocolo CTAB modificado, sendo a amplificação feita em PCR. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose e corados com SYBR Green, no caso do RAPD, e em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata, para os marcadores ISSR. A partir da leitura dos géis, tanto para RAPD como para ISSR, gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença e ausência de bandas. A matriz de similaridade genética foi estimada pelo coeficiente de Jaccard. Com base nessa matriz, as cultivares foram agrupadas usando o método UPGMA. O dendograma gerado pelos marcadores RAPD distribuiu as cultivares em três grupos e os marcadores ISSR geraram dois grupos, não existindo relação direta nos agrupamentos quando comparados os dois marcadores. O agrupamento proposto pelo método ISSR é mais coerente com a origem e a genealogia das cultivares do que aquele proposto pelo método RAPD, podendo ser considerado o método mais eficiente no estudo de divergência genética do morangueiro. A cultivar Sweet Charlie pode ser útil em programas de melhoramento devido à sua divergência genética em relação às outras cultivares. Os cruzamentos mais promissores, com base na divergência genética estimada a partir de dados moleculares RAPD e ISSR, são entre as cultivares Tudla e Ventana e entre Oso Grande e Ventana, respectivamente.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch., melhoramento de plantas, similaridade, predição de cruzamentos.

ABSTRACT

Rafael Gustavo Ferreira Morales. Genetic diversity in strawberry cultivars based on molecular markers RAPD and ISSR.

The fruit of the strawberry is very popular throughout the world and is considered the main result of the group of small fruit. The characterization of their cultivars through molecular markers, provides better knowledge of the available germplasm, providing quick estimates of genetic diversity in plants, this information is useful for the beginning of a breeding program. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of 11 strawberry cultivars by RAPD and ISSR markers, indicating the possible crosses promising. Therefore, ADN extraction followed the CTAB protocol modified, being made in PCR amplification. The ADN fragments were separated on agarose gel and stained with SYBR Green, in the case of RAPD, and polyacrylamide gel and stained with silver nitrate for the ISSR markers. From the reading of the gels, both RAPD and ISSR, generated is a binary matrix in which the individuals were genotyped for the presence and absence of bands. The genetic similarity matrix was estimated by Jaccard coefficient. Based on this matrix, the cultivars were grouped using the UPGMA. The dendrogram generated by RAPD markers distributed the cultivars into three groups and ISSR markers generated two groups, and there is no direct relationship in the groups when comparing the two markers. The grouping method proposed by ISSR is more consistent with the origin and genealogy of cultivars than that proposed by the RAPD method, can be considered the most efficient method in the study of genetic diversity in strawberry. Cultivar Sweet Charlie may be useful in breeding programs due to the high genetic diversity in relation to other cultivars. The most promising crosses, based on data and ISSR molecular markers, are among cultivars Tudla and Ventana, and Oso Grande and Ventana, respectively.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch., plant breeding, similarity, prediction crosses.

1. INTRODUÇÃO

O fruto do morangueiro é muito apreciado em todo o mundo, tendo como maiores produtores e consumidores países de primeiro mundo, como Estados Unidos, Espanha, Itália, dentre outros. Nesses países existem programas de melhoramento visando, principalmente, o aumento da produtividade, o tempo de armazenamento pós-colheita e a resistência a fungos e pragas (CAMARGO & PASSOS, 1993). De forma geral, as cultivares plantadas em todo o mundo são oriundas desses países, como é o caso da Camarosa, Dover, Oso Grande (EUA), Tudla (Espanha) e Toyonoka (Japão). O cultivo dessas cultivares em condições climáticas diferentes do local de seleção pode prejudicar o desenvolvimento da planta. Entretanto, a sua utilização em programas de melhoramento em países onde o cultivo ainda é dependente do material genético estrangeiro é uma opção interessante, reduzindo-se os efeitos ambientais e proporcionando, conseqüentemente, aumento de produtividade.

Diferentes caracteres de plantas são fontes de informação que estão, ou podem estar, disponíveis para qualquer grupo de genótipos. Tais caracteres podem ser divididos em quatro grupos: agronômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares. As diferenças entre genótipos, em relação a quaisquer desses caracteres, revelam informações sobre as relações genéticas entre as constituições estudadas (LORENCETTI et al., 2006).

A caracterização de genótipos com marcadores moleculares baseados em DNA possibilita maior conhecimento do germoplasma disponível para o início de um programa de melhoramento, pois permite a determinação do nível de divergência genética e o padrão molecular de cada cultivar, dados que auxiliam o delineamento racional de cruzamentos para obtenção de cultivares superiores em curto prazo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Diversas técnicas moleculares baseadas na análise do DNA estão disponíveis para estudos de divergência genética. Dentre estas, os marcadores RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeat) e ISSR (inter simple sequence repeat) são os mais utilizados. Os marcadores RAPD apresentam vantagens por serem de simples execução e de baixo custo (Torres et al., 2003), porém, apresentam problemas de repetibilidade experimental, produzindo dados de menor confiabilidade. Entretanto, marcadores ISSR combinam a simplicidade e o baixo custo do RAPD com a alta repetibilidade do AFLP e SSR, sendo assim, o mais indicado para trabalhos onde não há conhecimento prévio do genoma.

Na cultura do morangueiro os marcadores moleculares RAPD demonstraram eficiência na identificação de cultivares e estudo de divergência genética (GIDONI et al.,

1994; PARENT & PAGÉ, 1995; GRAHAM et al.,1996; CONTI et al., 2002a; 2002b; ZEBROWSKA & TYRKA, 2003) e ISSR (ARNAU et al., 2003; HUSSEIN et al., 2008). Anita et al. (2004) estudaram as relações genéticas entre 24 cultivares de morango usando os marcadores RAPD e ISSR e obtiveram resultados semelhantes para ambas às técnicas, embora, os valores de similaridade baseada em dados de ISSR tenham sido maiores do que aqueles baseados em RAPD. Um estudo comparando os marcadores ISSR e RAPD observou semelhança em valores de similaridade, entretanto, foram necessários seis vezes mais primers RAPD para alcançar valores de similaridade semelhantes aos obtidos pelos marcadores ISSR (KORBIN et al., 2002).

A decisão de qual método utilizar depende dos recursos disponíveis e do grau de confiabilidade do método. A comparação entre as técnicas de estudo de divergência genética é uma maneira de estimar o grau de similaridade entre cultivares, sendo esse conhecimento importante para programas de melhoramento. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a divergência genética de 11 cultivares de morangueiro, por meio dos marcadores moleculares RAPD e ISSR e inferir por meio da divergência genética a predição dos cruzamentos mais promissores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Marcadores moleculares RAPD

As cultivares utilizadas neste estudo foram: Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana. A análise molecular RAPD foi realizada no Laboratório de eletroforese do Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG. A metodologia de extração do DNA foi baseada no protocolo de Soto (2001), utilizando-se duas folhas “não expandidas” de cada cultivar. Após a extração foram feitas as reações de amplificação em termociclador. Para cada reação foi utilizado tampão (1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTPmix (0,2mM), primer (25 ng), Taq DNA polimerase (1U) e DNA (5ng/μl). O programa de amplificação iniciou com uma pré-desnaturação a 95°C, por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 72°C, com uma extensão final de 2 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%) a uma corrente elétrica de 100 mA. O gel foi corado em solução de SYBR Green (1,5L de água para 50μl de SYBR Green), visualizados em luz ultravioleta (Anexo I). Foram testados 40

primers da “Operon Technologies”, selecionando apenas os polimórficos para a análise final dos dados (Tabela 1).

2.2. Marcadores moleculares ISSR

A avaliação com os marcadores ISSR foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS. Para extração do DNA, folhas jovens de cada cultivar foram coletadas separadamente e mantidas em nitrogênio líquido. As folhas foram maceradas até a formação de um pó bem fino. Este macerado foi incubado em uma solução de extração conforme descrito por Mercado et al. (1999), onde o mesmo segue o protocolo CTAB modificado, que inclui o isolamento parcial do núcleo e o baixo pH do tampão de extração que impede a precipitação de carboidratos e melhora a eliminação dos polifenóis. Após extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a -20 °C até momento do uso.

Para a PCR (polimerase chain reaction) o DNA de cada cultivar foi diluído na concentração de 20 ng/μl e amplificado com 16 primers ISSR, de acordo reação descrita a seguir: 40 ng de DNA genômico, 2,5 μl de tampão para PCR 1x, 1,5mM de MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 10 μmol de primer, 1 unidade de *Taq* polymerase e água até completar um volume de 25 μl. As amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100tm (MJ Reserch Inc.). A programação do termociclador para a PCR foi de um passo inicial para desnaturação do DNA de 15 minutos a 95°C seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos. Ao final dos 35 ciclos foi realizado um passo de 72°C por 7 minutos para extensão final dos fragmentos amplificados. Após amplificação, os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida 6% em uma corrente constante de 2000 volts por 3 horas. Após separação, os fragmentos foram corados com nitrato de prata e revelados com carbonato de sódio.

2.3. Análise dos dados

A partir da leitura dos géis, para cada marcador molecular, gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Com essa matriz calculou-se a divergência genética, estimada pelo coeficiente de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973), utilizando o Software NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 2000). A

formação do dendograma teve como princípio o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Marcadores RAPD

Dos 40 primers RAPD avaliados, apenas 11 foram polimórficos (B08, B19, A8, A10, A15, A16, A17, A20, G11, G14, G18), sendo que os demais não amplificaram ou apresentaram baixa qualidade de amplificação. Estes 11 primers amplificaram 67 bandas, sendo 33 polimórficas (55,83% de polimorfismo), de tamanhos variando entre 500 a 2000 pb, com quatro primers (A10, A16, A17 e G11) gerando cinco bandas e dois primers (A20 e G18) gerando uma única banda (Anexo II). O primer B5, que foi considerado um dos melhores primers no trabalho de Radmaan et al. (2006), gerando até 14 fragmentos polimórficos, não foi selecionado para análise dos dados devido seu baixo polimorfismo nas cultivares em estudo. Os primers B8 e B19 geraram dois fragmentos polimórficos cada um, resultado contrastante com os seis e dez fragmentos polimórficos observados por Conti et al. (2002a). Apesar de ser considerado baixo o número de fragmentos amplificados neste estudo, Williams et al. (1990) comentam que fatores como tamanho e composição do genoma, métodos da extração do DNA genômico e as condições da reação interferem no número de fragmentos amplificados a partir de um primer RAPD. O tamanho dos fragmentos obtidos (entre 500 e 2000 pb) está de acordo com os citados por Ferreira & Grattapaglia (1998), que citam que em reações de RAPD, normalmente, são amplificados fragmentos entre 500 e 2500 pb.

A similaridade média foi de 46%, variando de 30% (Ventana e Tudla) a 67% (Camarosa e Diamante; Oso Grande e Aromas) (Tabela 1). Estes valores estão condizentes com os observados por Zebrowska & Tyrka (2003), onde os mesmos encontraram similaridade média de 53%, com valores variando de 32 a 77%, sendo que os autores concluíram que os marcadores RAPD são eficientes no estudo de diversidade genética do morangueiro. Considerando a similaridade média de cada cultivar em relação às outras 10 cultivares, a cultivar Sweet Charlie apresentou a menor similaridade média (40%) e a cultivar Oso Grande a maior (54%). Desta forma, a cultivar Sweet Charlie pode ser útil em programas de melhoramento devido a sua divergência genética em relação às outras cultivares.

Tabela 1. Matriz de similaridade entre cultivares de morangueiro com base em dados de

marcadores moleculares RAPD, calculados com base no coeficiente de Jaccard.

| | Aromas | Camino Real | Camarosa | Campinas | Diamante | Dover | Oso Grande | Sweet Charlie | Toyonoka | Tudla |
|---------------|--------|-------------|----------|----------|----------|-------|------------|---------------|----------|-------|
| Camino Real | 0,56 | | | | | | | | | |
| Camarosa | 0,43 | 0,43 | | | | | | | | |
| Campinas | 0,50 | 0,43 | 0,40 | | | | | | | |
| Diamante | 0,50 | 0,42 | 0,67 | 0,37 | | | | | | |
| Dover | 0,44 | 0,54 | 0,43 | 0,48 | 0,37 | | | | | |
| Oso Grande | 0,67 | 0,52 | 0,48 | 0,58 | 0,58 | 0,52 | | | | |
| Sweet Charlie | 0,38 | 0,48 | 0,36 | 0,37 | 0,48 | 0,32 | 0,46 | | | |
| Toyonoka | 0,46 | 0,50 | 0,45 | 0,44 | 0,44 | 0,50 | 0,60 | 0,38 | | |
| Tudla | 0,48 | 0,59 | 0,38 | 0,40 | 0,45 | 0,40 | 0,57 | 0,45 | 0,36 | |
| Ventana | 0,36 | 0,40 | 0,47 | 0,36 | 0,45 | 0,48 | 0,46 | 0,41 | 0,45 | 0,30 |

A partir da análise de agrupamento, com base nas similaridades genéticas das 11 cultivares, foi possível a formação de três grupos, considerando o ponto de corte numa distância genética de 46%, equivalente à similaridade média de todas as cultivares (Figura 1). O grupo I é formado por 7 cultivares (Aromas, Oso Grande, Campinas, Toyonoka, Dover, Camino Real e Tudla), o grupo II é formado por três cultivares (Camarosa, Diamante e Ventana) e o grupo III é formado por uma única cultivar (Sweet Charlie), que apresentou a maior distância genética em relação a todas as outras cultivares. Radmann et al. (2006) estudaram a similaridade genética do morangueiro com marcadores RAPD e obtiveram a formação de um grupo (Dover, Campinas, Tudla, Aromas, Camarosa, Oso Grande e Sweet Charlie) muito semelhante ao obtido neste trabalho. Este fato mostra que, apesar da baixa repetibilidade experimental, os marcadores RAPD são eficientes no estudo de divergência genética do morangueiro, corroborando com os trabalhos de Conti et al. (2002a) e Radmann et al. (2006).

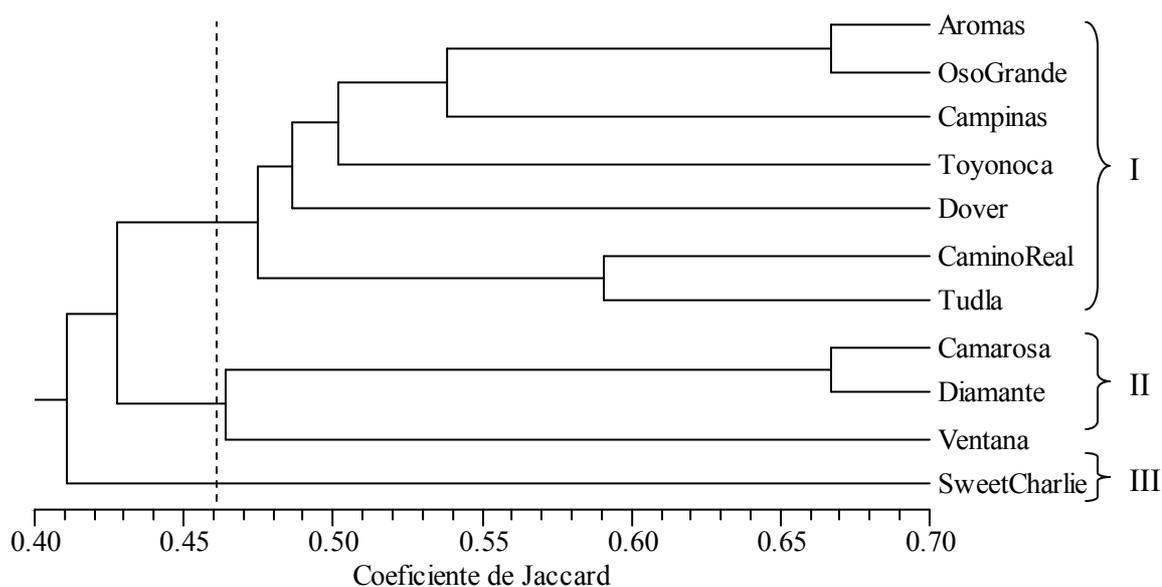


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética entre 11 cultivares de morangueiro, obtido a partir de marcadores RAPD, utilizando o método UPGMA. A linha pontilhada indica o ponto de corte com base na similaridade média calculada de 46%.

A baixa similaridade genética em cultivares de morango observado por Radmann et al. (2006) foi atribuída à genealogia das cultivares, pois a maioria não possuía genitor em comum. Estes autores já ressaltavam em seu estudo a possibilidade da formação dos grupos estarem vinculados ao compartilhamento de genes derivados de ancestrais comuns mais distantes, o que explicaria a similaridade genética existente. Nesse sentido, a presença de ancestrais comuns pode ter influenciado a similaridade entre as cultivares desse estudo. Como exemplo, as cultivares Dover, Camarosa, Tudla, Oso Grande possuem em comum como ancestral as cultivares Sequóia e Tioga (CAMARGO & PASSOS, 1993; CONTI, 1998; FAEDI et al., 2009), sendo estas cultivares alocadas no grupo I (Figura 1), com exceção da cultivar Camarosa, presente no grupo II. As cultivares Tudla e Oso Grande têm em comum como genitor a cultivar Parker (FAEDI et al., 2009), o que não garantiu elevada similaridade genética (57%), mas pode ter influenciado na presença destas no mesmo grupo. Quanto ao grupo II, pode-se inferir que as três cultivares foram coerentes com a origem, pois as mesmas são provenientes dos Estados Unidos, resultado do cruzamento entre cultivares da Universidade da Califórnia. Contudo, nesse caso, só foi possível identificar os ancestrais da cultivar Camarosa, sendo que as outras cultivares têm como genitores clones não comerciais, o que dificulta o rastreamento para identificação e discussão da genealogia.

A alta divergência genética pode ser consequência do fato do morangueiro, segundo Camargo & Passos (1993), ter uma estrutura genética altamente heterozigota, devido aos vários níveis de ploidia e a origem híbrida da maioria das espécies. O elevado polimorfismo

verificado está de acordo com os resultados obtidos em outras cultivares de morangueiro por Conti et al. (2002a). Entretanto, no trabalho desses autores, a similaridade média das cultivares foi de 62%, superior ao observado neste estudo (46%), fato este explicado pelas cultivares utilizadas por estes autores apresentarem origem em comum.

3.2. Marcadores ISSR

Dos 16 primers ISSR avaliados, seis foram selecionados por apresentarem boa qualidade de amplificação. Os seis primers amplificaram 22 bandas polimórficas, de tamanhos estimados de 200 a 2700 pb, variando de sete bandas polimórficas para o primer 834 a uma banda com o primer 849 (Anexo II).

A similaridade média avaliada por meio dos marcadores moleculares ISSR foi de 62%, variando de 30% (Ventana e Oso Grande) a 88% (Camino Real e Ventana) (Tabela 2). Estes valores evidenciam alto polimorfismo, estando de acordo com os resultados obtidos em outras cultivares de morangueiro (GRAHAM et al., 1996; ARNAU et al., 2003; ANITA et al., 2004). As cultivares Aromas e Diamante apresentaram um dos maiores valores de similaridade (80%), fato este provavelmente relacionado aos genitores em comum ('Cal. 87.112-6' x 'Cal. 88.270-1') (SHAW, 1998a; 1998b). Contudo, esta diferença de 20% pode ser considerada alta quando envolve descendentes dos mesmos genitores, embora, para a cultura do morangueiro, este fato esteja relacionado à elevada complexidade do DNA e a poliploidia (CAMARGO & PASSOS, 1993). Fato semelhante pode ser observado entre as cultivares Tudla e Oso Grande, em que possuir um genitor em comum (Parker) não foi o suficiente para garantir uma alta similaridade (57%). Pelo contrário, a cultivar Tudla apresentou menor similaridade com a cultivar Oso Grande do que em relação a todas as outras cultivares. No entanto, o alto grau de similaridade entre as cultivares Camino Real e Ventana (88%), mesmo não possuindo pais em comum, mostra a capacidade de recombinação gênica no cruzamento entre cultivares de morangueiro (CAMARGO & PASSOS, 1993). Os coeficientes de similaridade entre algumas cultivares deste estudo, de maneira geral, estão de acordo com os observados na literatura (ARNAU et al., 2003; ANITA et al., 2004; RADMANN et al., 2006), demonstrando a maior confiabilidade dos dados moleculares.

Tabela 2. Matriz de similaridade entre cultivares de morangueiro com base nos dados de marcadores moleculares ISSR, calculados com base no coeficiente de Jaccard.

| | Aromas | Camino Real | Camarosa | Campinas | Diamante | Dover | Oso Grande | Sweet Charlie | Toyonoka | Tudla |
|---------------|--------|-------------|----------|----------|----------|-------|------------|---------------|----------|-------|
| Camino Real | 0,60 | | | | | | | | | |
| Camarosa | 0,62 | 0,53 | | | | | | | | |
| Campinas | 0,64 | 0,62 | 0,72 | | | | | | | |
| Diamante | 0,80 | 0,62 | 0,48 | 0,58 | | | | | | |
| Dover | 0,67 | 0,71 | 0,59 | 0,54 | 0,54 | | | | | |
| Oso Grande | 0,75 | 0,43 | 0,59 | 0,70 | 0,70 | 0,48 | | | | |
| Sweet Charlie | 0,56 | 0,62 | 0,56 | 0,67 | 0,58 | 0,69 | 0,61 | | | |
| Toyonoka | 0,67 | 0,57 | 0,58 | 0,61 | 0,61 | 0,64 | 0,64 | 0,61 | | |
| Tudla | 0,73 | 0,82 | 0,67 | 0,76 | 0,76 | 0,71 | 0,57 | 0,69 | 0,71 | |
| Ventana | 0,43 | 0,88 | 0,50 | 0,52 | 0,44 | 0,76 | 0,31 | 0,52 | 0,46 | 0,69 |

O cálculo da similaridade média permitiu dividir as cultivares em dois grupos (Figura 2). O grupo I foi formado pelas cultivares Dover, Ventana e Camino Real e o Grupo II é formado pelas demais cultivares. As três cultivares do grupo I são provenientes dos Estados Unidos, porém, de programas de melhoramento distintos: as cultivares Camino Real e Ventana foram desenvolvidas na Universidade da Califórnia; e a cultivar Dover na Universidade da Flórida. Apesar de serem de programas de melhoramento distintos, o intercâmbio de material pode ter influenciado no agrupamento destas cultivares (DARROW, 1966). O grupo II não foi coerente com o país de origem, pois possui cultivares provenientes dos Estados Unidos, Espanha, Japão e Brasil. As cultivares Aromas e Diamante, que são classificadas quanto ao fotoperíodo em dias neutros, ficaram agrupadas juntamente com as cultivares de dias curtos (grupo II), demonstrando que a técnica identifica os locos ao acaso, não discernindo muitas vezes características importantes. Neste caso em especial, sabe-se que estas duas cultivares compartilham vários genes em comum, vindos da espécie selvagem *F. virginiana*, principal fonte da característica que confere insensibilidade ao fotoperíodo (FRANQUEZ, 2008).

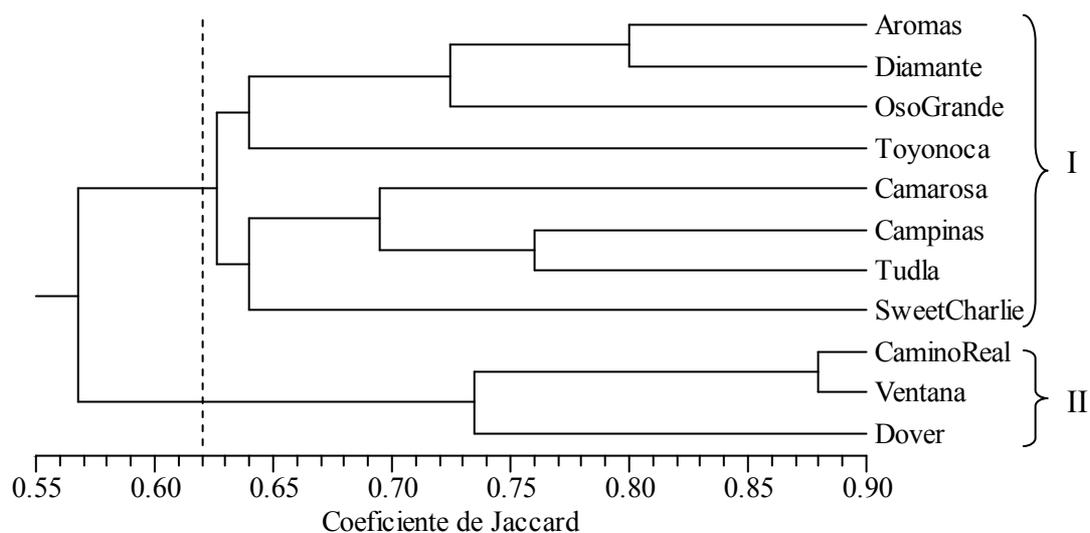


Figura 2. Dendrograma de similaridade genética entre 11 cultivares de morangueiro, obtido a partir de marcadores ISSR, utilizando o método de agrupamento UPGMA. A linha pontilhada indica o ponto de corte com base na similaridade média calculada de 62%.

3.3. Marcadores ISSR e RAPD

Os resultados de divergência genética com base nos marcadores RAPD e ISSR divergiram em alguns pontos. A maior média de similaridade obtida com marcadores ISSR (62%) em relação aos marcadores RAPD (46%), são semelhantes aos dados obtidos por Anita et al. (2004), que estudaram as relações genéticas entre 24 cultivares de morango e obtiveram valores de similaridade com os marcadores ISSR maiores do que aqueles obtidos com o RAPD. Entretanto, esses autores utilizaram 23 primers RAPD e 41 primers ISSR, muito superior ao utilizado nesse estudo, indicando, desta forma, que os primers escolhidos são eficientes para o estudo em questão.

Comparando os valores de similaridade entre os dois métodos, observam-se diferenças importantes entre as cultivares mais próximas geneticamente. Com os marcadores RAPD as cultivares Camarosa e Diamante apresentaram um dos maiores valores de similaridade (67%), em contrapartida, com os marcadores ISSR as duas cultivares apresentaram um dos menores valores de similaridade (48%), mostrando, de certa forma, incongruência entre as técnicas. Fato semelhante pode ser observado entre as cultivares Camino Real e Ventana, onde foi observado 88% de similaridade com os marcadores ISSR e apenas 40% com os marcadores RAPD.

Com base nos coeficientes de similaridade das 11 cultivares, foram observadas 55 interações possíveis, sendo que, destas, 11 apresentaram valores de similaridade em RAPD até 10 pontos percentuais (pp) inferiores aos obtidos com ISSR; 19 apresentavam valores entre 10 e 20 pp inferiores; outras 19 apresentavam valores inferiores a 20 pp; somente em cinco casos os valores de similaridade em RAPD foram superiores aos obtidos pelo ISSR (ex: Camarosa e Diamante); e em apenas um caso os valores foram idênticos, observado entre as cultivares Tudla e Oso Grande (57%). As similaridades inferiores obtidas pelos marcadores RAPD em relação ao ISSR também foram observadas por Korbin et al. (2002), onde os autores chegaram a conclusão que é necessário seis vezes mais primers RAPD para alcançar valores semelhantes de similaridade aos obtidos pelos marcadores ISSR. Este fato está relacionado à baixa repetibilidade dos marcadores RAPD (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), podendo ser considerado o principal fator limitante da técnica.

Analisando os agrupamentos, pela técnica ISSR, o grupo I, constituído pelas cultivares Dover, Ventana e Camino Real, agrupou coerentemente com a origem. Porém, pela técnica RAPD, estas mesmas cultivares não foram alocadas no mesmo grupo. A cultivar Sweet Charlie não agrupou com nenhuma cultivar com os marcadores RAPD, contudo, com os marcadores ISSR, essa cultivar agrupou com outras sete cultivares formando o grupo I.

O estudo de divergência genética por meio dos coeficientes de similaridade ou dos dendograma, auxilia na identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos com maior efeito heterótico e que proporcionem maior segregação em recombinações, possibilitando a seleção de indivíduos superiores (CRUZ & CARNEIRO, 2003). Nesse sentido, considerando unicamente os marcadores RAPD, pode-se inferir que cruzamentos envolvendo a cultivar Sweet Charlie é o mais interessante, devido à baixa similaridade (41%) desta em relação a todas as outras cultivares. Contudo, o cruzamento mais promissor é entre Tudla e Ventana, devido à elevada dissimilaridade (70%). Com relação aos marcadores ISSR, a cultivar que apresentou a maior dissimilaridade em relação a todas as outras foi a Ventana (45%), sendo nesse caso o cruzamento mais interessante entre Ventana e Oso Grande, devido aos 70% de dissimilaridade. Levando em consideração as médias entre os dois métodos, a cultivar Ventana apresenta a maior dissimilaridade (48%) e o cruzamento que pode proporcionar o maior efeito heterótico é entre Ventana e Oso Grande.

Com base nas matrizes de similaridade e nos dendogramas dos dois marcadores moleculares em estudo, é possível afirmar que os marcadores ISSR são mais eficientes que os marcadores RAPD para estudo de divergência genética do morangueiro. Contudo, os marcadores RAPD apresentaram coerência no agrupamento das cultivares e, até certo ponto,

com a genealogia e país de origem, podendo ser utilizado para estudo de divergência genética. Pelos valores de similaridade obtidos nas análises é possível afirmar que existe divergência genética entre as cultivares, principalmente devido ao uso de genótipos com origem de programas de melhoramento distintos. Estes resultados serão úteis para o entendimento da base genética das cultivares de morango e também servirão de subsídios para a futura implantação de um programa de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições de solo e clima do Brasil.

4. CONCLUSÕES

Os coeficientes de similaridade obtidos com o método ISSR são, de forma geral, maiores do que os obtidos com o método RAPD.

Os marcadores moleculares ISSR são mais eficientes que os marcadores RAPD no estudo de divergência genética do morangueiro.

Os cruzamentos mais promissores, com base nos dados moleculares RAPD e ISSR, são entre as cultivares Tudla e Ventana e entre Oso Grande e Ventana.

REFERÊNCIAS

ANITA, K.; MALGORZATA, K.; EDWARD, Z. Comparison of suitability of RAPD and ISSR techniques for determination of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) relationship. **Plant Cell, Tissue and Organ**, v.79, p.189–193, 2004.

ARNAU, G.; LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Euphytica**, v.129: p.69–79, 2003.

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

CONTI, J.H. **Estudo de caracteres morfológicos, agronômicos e moleculares em cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 154p. USP: Esalq (Tese de Doutorado). 1998.

CONTI, J.H.; MINAMI, K.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares de morangueiro por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.145-152, 2002a.

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

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v.2. Viçosa: Editora UFV, 2003.

DARROW, G.M. **The strawberry: History, Breeding and Phisiology**. New York: Holt, Rinehart and Wiston, 1966. 447p.

FAEDI, W.; BARUZZI, G.; LOVATI, F.; SBRIGHI, P.; LUCCHI, P. **Monografia di cultivar di fragola**. Roma: Istituto Sperimentale per la Frutticoltura Roma, v.2, 2009. 240p.

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

FRANQUEZ, G.G. **Seleção e multiplicação de clones de morangueiro** (Fragaria x ananassa Duch.). 2008. 118p. (Tese de Doutorado), Santa Maria: UFSM.

GIDONI, D.; ROM, M.; KUNIK, T.; ZUR, M.; IZSAK, E.; IZHAR, S.; FIRON, N. Strawberry cultivar identification using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Plant Breeding**, v.113, p.339-342, 1994.

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

HUSSEIN, T.S.; TAWFIK, A.A.; KHALIFA, M.A. Molecular identification and genetic relationships of six strawberry varieties using ISSR markers. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.10, p. 677–80, 2008.

KORBIN, M.; KURAS, A.; ZURAWICZ, E. Fruit plant germplasm characterization using molecular markers in RAPD and ISSR-PCR. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.7, p.785–794, 2002.

LORENCETTI, C.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; VALÉRIO, I.P.; BENIN, G.; ZIMMER, P.D.; VIEIRA, E.A. Distância genética e sua associação com heterose e desempenho de híbridos em aveia. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.4, p.591-598, 2006.

MERCADO, J.A.; EL MANSOURI, I.; JIMENEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** v.35, p.152-153, 1999.

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**, v.75, n.1, p.221-224, 1995.

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; OLIVEIRA, R.P.; FACHINELLO, J.C. Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.84-87, 2006.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. Manual. Applied Biostatistics, New York, USA. 2000.

SHAW, D.V. **Strawberry plant named 'Aromas'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 10,451, 1998a.

SHAW, D.V. **Strawberry plant 'Diamante'**. USA: The Regents of the University of Califórnia. Plant Patent 10,435, 1998b.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 513 p.

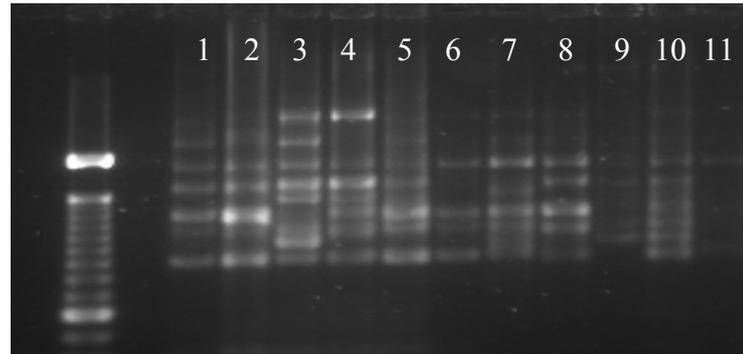
SOTO, B. **Análisis molecular de poblaciones segregantes de *Pinus radiata***. 2001. 78p. Tesis (Tese de Doutorado). Universidad Católica de Temuco: D. Chile.

TORRES, E.; IRIONDO, J.M.; PEREZ, C. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): Allozyme and RAPD analysis. **American Journal of Botany**, v.90, p.85–92, 2003.

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

ZEBROWSKA, J.I.; TYRKA, M. The use of RAPD markers for strawberry identification and genetic diversity studies. **Food, Agriculture & Environment**, v.1, n.1, p.115-117, 2003.

ANEXO I



Gel de eletroforese para estudo de divergência genética das 11 cultivares de morangueiro (Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana). Primer RAPD 'OPA 17'.

ANEXOII

Primers utilizados, suas respectivas seqüências e número de bandas amplificadas nos 11 cultivares de morango.

| Primers | | Bandas | | |
|----------------|-------------------------------|---------------|-------------------------|--------------|
| ISSR | Seqüência | Total | Polimórficas (P) | % P |
| 827 | 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CG-3' | 6 | 6 | 100 |
| 834 | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYT-3' | 7 | 7 | 100 |
| 845 | 5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRG-3' | 3 | 3 | 100 |
| 848 | 5'-CAC ACA CAC ACA CAC ARG-3' | 2 | 2 | 100 |
| 849 | 5'-GTG TGT GTG TGT GTG TYA-3' | 1 | 1 | 100 |
| 860 | 5'-TGT GTG TGT GTG TGT GRA-3' | 3 | 3 | 100 |
| RAPD | | | | |
| OPB08 | 5' -GTCCACACGG- 3' | 6 | 2 | 33,33 |
| OPB19 | 5' -ACCCCCGAAG- 3' | 2 | 2 | 100,00 |
| OPA15 | 5' -TTCCGAACCC- 3' | 2 | 2 | 100,00 |
| OPA16 | 5' -AGCCAGCGAA- 3' | 11 | 5 | 45,45 |
| OPA17 | 5' -GACCGCTTGT- 3' | 9 | 5 | 55,56 |
| OPA20 | 5' -GTTGCGATCC- 3' | 8 | 1 | 12,50 |
| OPG11 | 5' -TGCCCGTCGT- 3' | 8 | 5 | 62,50 |
| OPG14 | 5' -GGATGAGACC- 3' | 6 | 2 | 33,33 |
| OPG18 | 5' -GGCTCATGTG- 3' | 4 | 1 | 25,00 |
| OPA8 | 5' -GTGACGTAGG- 3' | 4 | 3 | 75,00 |
| OPA10 | 5' -GTGATCGCAG- 3' | 7 | 5 | 71,43 |
| TOTAL | | 67 | 33 | 55,83 |

R = purina (A ou G); Y = pirimidina (C ou T).

CAPÍTULO II

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CULTIVARES DE MORANGUEIRO BASEADA EM CARACTERES MORFOAGRONÔMICOS

RESUMO

Os caracteres morfoagronômicos são tradicionalmente usados na caracterização de cultivares e têm sua importância reconhecida. No estudo de divergência genética a sua utilização é recente, podendo ser eficiente em função da cultura e das condições de cultivo. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a divergência genética por meio de caracteres morfoagronômicos de 11 cultivares de morangueiro (Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana) nas condições climáticas da região Centro-Sul do Paraná. Foram analisados 29 caracteres morfoagronômicos relacionados à planta, folha, flor, fruto e aquênios do morangueiro. As similaridades genéticas foram calculadas por meio de análise multivariada e as cultivares foram agrupadas com base na matriz de similaridade genética usando UPGMA. Dentre os 29 caracteres morfoagronômicos avaliados, oito apresentaram diferenças não significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$). A similaridade média foi de 38%, variando de 19% (Aromas e Camino Real) a 62% (Camino Real e Camarosa; Aromas e Sweet Charlie). O dendograma alocou as cultivares em quatro grupos, contudo, essa divisão não foi coerente com a origem e genealogia das cultivares. A cultivar Tudla apresenta elevado potencial “per se” para utilização em programas de melhoramento. O cruzamento mais promissor com base nos caracteres morfoagronômicos é entre as cultivares Camarosa e Campinas.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch., melhoramento de plantas, similaridade, análise multivariada.

ABSTRACT

Rafael Gustavo Ferreira Morales. Genetic diversity in strawberry cultivars based morphological characteristics.

The morphological characteristics are traditionally used to characterize cultivars and have recognized its importance. In the study of genetic diversity in their use is recent, can be effective depending on the culture and cultivation conditions. Therefore, this study was to evaluate the genetic diversity by means of morphological characteristics of 11 cultivars of strawberry (Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana) climatic conditions of south-central Paraná. Were analyzed 29 morphological characters related to plant, leaf, flower, fruit and achenes of strawberries. Genetic similarities were calculated by a multivariate analysis and the cultivars were grouped based on genetic similarity matrix using UPGMA. Among the 29 morphological characters evaluated, eight had high differences not significant by F test ($p < 0,05$). The average similarity was 38%, ranging from 19% (Aromas and Camino Real) to 62% (Camino Real and Camarosa, Aromas and Sweet Charlie). The dendrogram divided the cultivars into four groups, however, this division was not consistent with the origin and genealogy of the cultivars. The cultivar Tudla has a high potential “per se” for use in breeding programs. The crossing more promising on the basis of morphological characteristics among cultivars is Camarosa and Campinas.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch., plant breeding, similarity, multivariate analysis.

1. INTRODUÇÃO

O comportamento das cultivares de morango difere de acordo com a adaptação regional, fazendo com que uma cultivar que se desenvolva satisfatoriamente em uma região não apresente o mesmo desempenho em outro local com condições ambientais diferentes (UENO, 2004). É importante identificar o comportamento do morangueiro no local de cultivo, sendo este conhecimento muito importante para programas de melhoramento genético, bem como para o manejo da cultura (ANTUNES et al., 2006).

Conhecer as relações genéticas entre as cultivares pode auxiliar o desenvolvimento de estratégias de utilização de novos materiais (GICHUKI et al., 2003). Para os melhoristas, a distinção da relação genética entre os genótipos está relacionada com a informação fenotípica da planta (KLOCKE et al., 2002). Muitos métodos estão disponíveis para avaliar a divergência genética em populações de plantas, diferenciando-se na habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custos, facilidade de uso, consistência e repetibilidade dos resultados (MILACH, 1998).

A utilização de caracteres morfoagronômicos na avaliação da divergência genética proporciona uma simplificação da quantificação da variação genética e simultaneamente possibilita avaliar o desempenho dos genótipos no ambiente de crescimento (FUFA et al., 2005). Contudo, a sua eficiência muitas vezes está relacionada ao número de genes responsáveis pelo controle de determinada característica. Desta forma, em muitos casos esses caracteres apresentam sérias limitações, principalmente pelo efeito do ambiente, fazendo com que não sejam caracteres estáveis, além de muitos serem avaliados somente nas plantas adultas, o que requer tempo e espaço (VIEIRA, 2004).

De forma geral, os caracteres morfoagronômicos parecem ser eficientes para estudo de divergência genética, entretanto, quando comparados com os marcadores moleculares, são menos eficientes. Este fato pode ser observado em diversos trabalhos, como, por exemplo, na avaliação de diversidade genética da Cravina (*Dianthus chinensis* L.) (FU et al., 2008) e da Zínia (*Zinnia elegans*) (YE et al., 2008). No caso de serem utilizados caracteres inadequados o método pode tornar-se ineficiente, como relatam Chahidi et al. (2008), que trabalharam com caracteres relacionados à planta e a folha da tangerina (*Citrus reticulata*) ao invés dos frutos que, segundo os autores, seriam caracteres mais eficientes no estudo de divergência genética.

No morangueiro, os principais caracteres morfoagronômicos levados em consideração na identificação e caracterização de cultivares são descritos por Faedi et al. (2009). Como exemplo de caracteres morfológicos pode-se citar a forma do recorte da denteção foliar,

pigmentação da estípula, tamanho da corola em relação ao cálice floral, formato do fruto etc. Como exemplo de caracteres agrônômicos pode-se citar produção de frutos, massa média de frutos, época de floração e posição da inflorescência na folhagem. Com base em caracteres morfológicos, Conti et al. (2002) estudaram a divergência genética em cinco cultivares de morangueiro e concluíram que o método foi eficiente na separação das cultivares em grupos, formando um dendograma muito similar ao formado quando utilizou-se marcadores moleculares RAPD, apenas diferindo no grau de similaridade.

A caracterização por meio de caracteres morfoagronômicos fornecerá estimativas da divergência genética das cultivares de morangueiro, sendo esta uma das primeiras etapas para que se possa organizar um programa de conservação ou melhoramento de qualquer espécie vegetal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a divergência genética de 11 cultivares de morangueiro, por meio de 29 caracteres morfoagronômicos, nas condições climáticas da região Centro-Sul do Paraná.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O clima da região de cultivo é classificado como Cfb (Subtropical mesotérmico úmido), sem estação seca, com verões frescos e inverno moderado, conforme a classificação de Koppen. A temperatura média mínima anual é 12,7°C, temperatura média máxima anual de 23,5°C, umidade relativa do ar de 77,9%, altitude de aproximadamente 1100 m e precipitação média anual de 1944 mm (THOMAZ & VESTENA, 2003).

As matrizes foram obtidas na empresa Multiplanta Biotecnologia Vegetal Ltda. (Anexo Ia) e multiplicadas em viveiro (Anexo Ib). As mudas receberam “toaletes”, em que foram retiradas folhas velhas, secas e com sintomas de doença, além de terem as raízes aparadas remanescendo 10 cm. Após o toailete, as raízes foram imersas por 15 minutos em calda bordalesa na concentração de 4 g para 10 L de água, sendo transplantadas em seguida para vasos de 5 litros. As mudas selecionadas apresentavam diâmetro de coroa superior a 8 mm, consideradas de ótimo padrão (RONQUE, 1998).

No preparo dos vasos foi utilizado 50% de substrato comercial e 50% de solo de área não cultivada, classificado como Latossolo Bruno Distroférrico típico de textura argilosa (EMBRAPA, 2006). Nesta mistura foi adicionado o adubo formulado NPK 4-14-8, na proporção de 1 kg de adubo para 50 kg de mistura. Na adubação de cobertura foi aplicado em cada vaso 5 g do formulado NPK 20-00-20, a cada 30 dias, iniciando-se 30 dias após o transplante, seguindo-se as recomendações da cultura na região Centro-Sul do Paraná

(RONQUE, 1998). No início do florescimento foram aplicados via foliar ácido bórico e sulfato de zinco, na concentração de 1% e 2%, respectivamente. No estágio de produção de frutos, foi pulverizado cloreto de cálcio a 0,4%, a cada 15 dias.

O experimento foi conduzido em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por três vasos de cada cultivar, dispostos lado a lado (Anexo Id). As cultivares avaliadas foram: Aromas, Camarosa, Camino Real, Campinas, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie, Toyonoka, Tudla e Ventana.

O controle das plantas daninhas foi realizado manualmente a cada 15 dias. O sistema de irrigação adotado foi por gotejamento, utilizando-se tubos gotejadores de polietileno flexível espaçados de 0,30 m, sendo o fluxo de água direcionado no centro de cada vaso (Anexo Ie). O controle de pulgões e ácaros foi realizado com pulverizações mensais de abamectin (6ml/10L) e o controle de doenças fúngicas foi realizado aplicando-se de forma alternada Iprodione (150ml/100L) e Tebuconazole (750g/ha) a cada 15 dias.

Apesar dos estolões serem caracteres passíveis de avaliação para estudo de divergência genética, optou-se pela remoção em todas as cultivares logo após a emissão, pois o mesmo seria avaliado em detrimento da avaliação de frutos, que são caracteres mais importantes no estudo em questão.

O plantio foi realizado em maio de 2009, iniciando-se a colheita 60 dias após o plantio, sendo todas as flores produzidas até esta data arrancadas priorizando o desenvolvimento vegetativo da planta. Para a avaliação da produção os frutos foram colhidos a cada dois dias, durante 120 dias, sendo colhidos os frutos que apresentavam mais de 3/4 da superfície com coloração vermelha (Anexo Ic).

Foram avaliados 29 caracteres morfoagronômicos, baseando-se em escalas de nota adaptadas de SNPC (2009) e Faedi et al. (2009) (Anexo III). As avaliações foram divididas em duas fases: 1ª florada, aos 60 dias após o plantio, sendo essas avaliações realizadas diretamente nos vasos, sob estufa; 2ª florada, aos 80 dias após o plantio, sendo tais avaliações realizadas em laboratório, com frutos de cinco colheitas congelados a -20°C, sendo estes distribuídos numa matriz 11 x 12 (Anexo IIa), com quatro blocos e três frutos por repetição, repetindo-se essa avaliação cinco vezes, obtendo-se desta forma 15 frutos por repetição.

Nas avaliações das variáveis foram levados em consideração diversos aspectos relatados a seguir. Produção e peso médio de frutos: foram contados e pesados todos os frutos do experimento logo após a colheita; Densidade da planta: a escala foi baseada na quantidade de trifólios (Anexo IV). Vigor: foi levado em consideração o número de trifólio, tamanho das folhas e do pecíolo. Época de floração: a escala foi determinada conforme a época de início de

coleta de frutos. Cor e brilho da superfície adaxial da folha: foi levada em consideração apenas trifólios completamente expandidos, atribuindo-se a nota ao conjunto de trifólios (Anexo V). Forma da seção transversal da folha: a análise visual considerou a forma do conjunto de trifólios, sendo realizada ao término da tarde, sob temperatura amena ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$), evitando qualquer estresse por temperatura que poderia influenciar a forma das folhas (Anexo VI). Relação comprimento largura, forma da base e forma do recorte do folíolo terminal: as análises foram visuais, utilizando-se três folíolos completamente expandidos por vaso (Anexos VII, VIII e IX). Pigmentação antociânica da estípula: a estípula foi avaliada na própria planta, sem sua remoção para avaliação (Anexo X). Posição da inflorescência na folhagem: o limite para considerar fora ou no nível do dossel foliar foi à projeção do dossel com o solo (Anexo XI). Tamanho do cálice em relação à corola foliar: as flores foram visualizadas por cima, quando a corola estava completamente aberta, sendo atribuída a nota 1 quando não era possível visualizar o cálice, 2 quando era possível visualizar apenas a ponta da sépala e 3 quando todas as sépalas apareciam com destaque (Anexo XII). Tamanho da flor: foram amostradas cinco flores primárias de cada repetição, classificando as mesmas em pequena, média e grande. Relação comprimento/largura da pétala: foram retiradas as pétalas das flores da análise anterior, distribuindo-se as mesmas nos seus respectivos grupos. Tamanho do fruto em relação ao cálice: utilizaram-se apenas frutos maduros, não deformados e de tamanho padrão da cultivar (Anexo XIII). Remoção do fruto do cálice: no momento da colheita dos frutos foi verificada a dificuldade de destacá-los do cálice, sendo a amostragem de cinco frutos por vaso. Inserção do fruto no cálice: as análises foram realizadas logo após a remoção dos frutos, removendo-se completamente o cálice e observando o formato da base do fruto onde se dá a inserção. No caso do cálice incluso, a base fica levemente deprimida, dando ao fruto o formato de coração (Anexo XIV). Cor e brilho dos frutos: as avaliações foram realizadas de dia, com boa iluminação, em cinco frutos por vaso (Anexo XV). Formato mais frequente de frutos: os frutos foram distribuídos em nove classes, sendo atribuída uma única nota ao formato mais frequente encontrado (Anexo XVI). Tamanho e zona sem aquênios nos frutos: a classificação foi realizada conforme comparação direta entre os frutos das 11 cultivares (Anexo XVII). Implantação e cor dos aquênios: esta análise foi realizada com o auxílio de uma lupa (20x) (Anexo XVIII). Cavidade central, regularidade e distribuição da cor vermelha na polpa dos frutos: todos os frutos foram partidos ao meio (Anexo IIc), com o auxílio de uma lâmina, sendo os frutos avaliados na própria matriz (Anexos XIX e XX).

Os dados morfoagronômicos foram submetidos à análise de variância, sendo eliminados os caracteres não significativos ($p < 0,05$). Uma análise multivariada foi realizada

pelo aplicativo computacional Genes (CRUZ, 2006), obtendo-se a matriz de similaridade genética entre as cultivares. As 11 cultivares de morango foram agrupadas com base na matriz de similaridade genética usando UPGMA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 29 caracteres morfoagronômicos avaliados, oito não foram significativos pelo teste F ($p < 0,05$) (Anexo XXI). Desta forma, foram considerados 21 caracteres para a análise de similaridade genética e formação do dendograma (Anexo XXII).

A similaridade média detectada pelos caracteres morfoagronômicos foi de 38%, variando de 19% (Aromas e Camino Real) a 62% (Camino Real e Camarosa; Aromas e Sweet Charlie) (Tabela 1). Estes valores foram inferiores aos observados com marcadores moleculares RAPD (46%) e ISSR (62%), que são técnicas comprovadamente eficientes para estudo de diversidade genética (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Este fato corrobora com estudos de Conti et al. (2002), onde os caracteres morfológicos foram menos eficientes do que os marcadores moleculares no estudo de diversidade genética do morangueiro.

Tabela 1. Matriz de similaridade genética entre cultivares de morangueiro com base em dados de caracteres morfoagronômicos, calculados com base no coeficiente de Jaccard.

| | Aromas | Camino Real | Camarosa | Campinas | Diamante | Dover | Oso Grande | Sweet Charlie | Toyonoka | Tudla |
|---------------|--------|-------------|----------|----------|----------|-------|------------|---------------|----------|-------|
| Camino Real | 0,19 | | | | | | | | | |
| Camarosa | 0,52 | 0,62 | | | | | | | | |
| Campinas | 0,33 | 0,24 | 0,24 | | | | | | | |
| Diamante | 0,52 | 0,29 | 0,48 | 0,57 | | | | | | |
| Dover | 0,38 | 0,43 | 0,29 | 0,48 | 0,24 | | | | | |
| Oso Grande | 0,38 | 0,33 | 0,38 | 0,38 | 0,43 | 0,24 | | | | |
| Sweet Charlie | 0,62 | 0,24 | 0,52 | 0,48 | 0,57 | 0,24 | 0,48 | | | |
| Toyonoka | 0,29 | 0,29 | 0,33 | 0,52 | 0,48 | 0,43 | 0,29 | 0,29 | | |
| Tudla | 0,48 | 0,29 | 0,48 | 0,38 | 0,24 | 0,24 | 0,33 | 0,38 | 0,33 | |
| Ventana | 0,57 | 0,29 | 0,52 | 0,48 | 0,57 | 0,24 | 0,57 | 0,57 | 0,29 | 0,33 |

A genealogia das cultivares não apresentou relação direta com os resultados de similaridade genética. As cultivares Aromas e Diamante, que deveriam ser próximas geneticamente, pois possuem dois genitores em comum, apresentaram 52% de similaridade

genética, valores baixos por possuir dois genitores em comum. Outros exemplos de baixa similaridade envolvendo cultivares aparentadas são: Dover e Oso Grande (24%), Dover e Tudla (24%), Dover e Sweet Charlie (24%), Dover e Camarosa (29%) e Tudla e Oso Grande (33%).

O dendograma formado com base nas similaridades genéticas dividiu as cultivares em três grupos, considerando o ponto de corte numa distância genética de 38%, equivalente à similaridade média de todas as cultivares (Figura 1). O grupo I é formado pelas cultivares Aromas, Sweet Charlie, Ventana, Oso Grande, Campinas, Diamante e Toyonoka; o grupo II pelas cultivares Camino Real, Camarosa e Tudla; e o grupo III é formado unicamente pela cultivar Dover. O país de origem das cultivares não foi fator decisivo na formação dos grupos, pois o grupo I possui cultivares de três países (Estados Unidos, Brasil e Japão) e o grupo II de dois países (Estados Unidos e Espanha). Isso ocorre devido à base genética dos materiais dos programas de melhoramento, pois muitos utilizam cultivares provenientes dos programas de melhoramento Norte Americano. A título de exemplo toma-se a cultivar Campinas, desenvolvida no Brasil e com genitores provenientes dos Estados Unidos (Tahoe e Donner) (CAMARGO & PASSOS, 1993). Comparando os dendogramas com a genealogia observa-se coerência no grupo I (Aromas e Diamante; Sweet Charlie e Campinas) e no grupo II (Camarosa e Tudla). Contudo, a maioria das cultivares aparentadas não agruparam coerentemente com a genealogia, tais como: Camarosa e Oso grande; Camarosa e Dover; Camarosa e Campinas; Camarosa e Sweet Charlie; Sweet Charlie e Oso Grande; Sweet Charlie e Tudla; Sweet Charlie e Dover; Dover e Oso Grande; Dover e Tudla; Dover e Campinas; Dover e Sweet Charlie; e Tudla e Oso Grande. A formação de grupos pode representar valiosa informação na escolha de genitores dentro dos programas de melhoramento, pois as novas populações híbridas a serem estabelecidas devem ser baseadas na magnitude de suas distâncias e no potencial “per se” dos genitores (BERTAN et al., 2006).

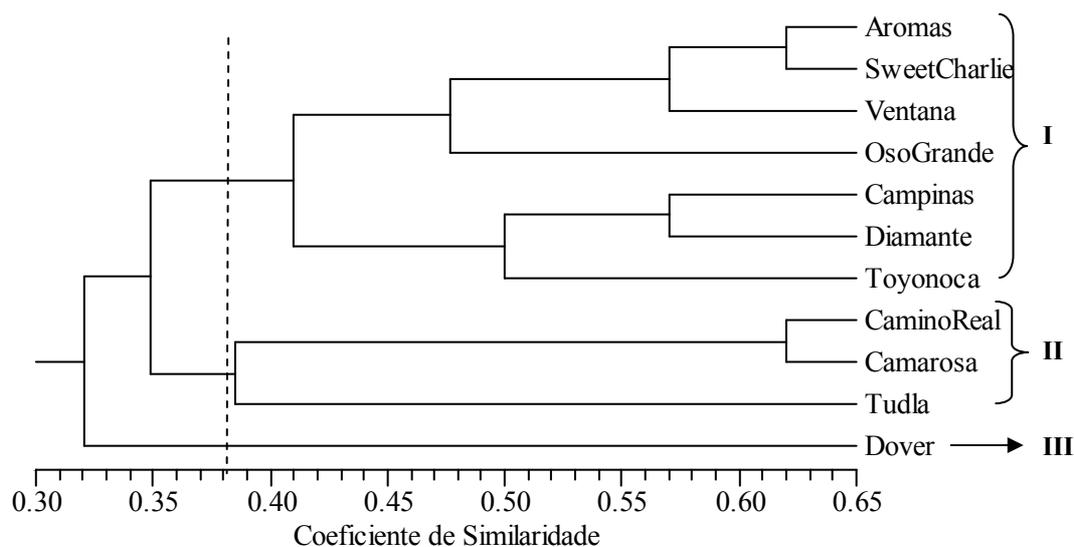


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética entre 11 cultivares de morangueiro, obtido a partir de caracteres morfoagronômicos, utilizando o método de agrupamento UPGMA. A linha pontilhada indica o ponto de corte com base na similaridade média calculada de 38%.

A similaridade obtida entre cultivares possibilita a identificação de genitores adequados à obtenção de cruzamentos com maior efeito heterótico, aumentando a possibilidade de obtenção de indivíduos superiores (CRUZ & CARNEIRO, 2003). Nesse sentido, com base na matriz de similaridade, pode-se inferir que o cruzamento mais promissor é entre as cultivares Camarosa e Campinas, que além de apresentarem baixa similaridade (24%) são cultivares com bom desenvolvimento vegetativo e produtivo na região Centro-Sul do Paraná (VIRMOND & RESENDE, 2006). Considerando a similaridade média de cada cultivar em relação às outras 10 cultivares, a cultivar Tudla apresentou a menor similaridade média (33%) e a cultivar Ventana a maior (45%). Desta forma, a cultivar Tudla pode ser útil em programas de melhoramento genético, devido a sua baixa similaridade geral, possuindo diversos caracteres divergentes em relação às outras cultivares, tais como, densidade de folhas, tamanho e formato de frutos.

O emprego da análise multivariada para avaliação de divergência genética é uma das maneiras mais eficientes na identificação de similaridade genética (MACHADO, 1999). Contudo, quando comparada com técnicas moleculares, apresenta menor eficiência. Esse fato foi observado por Conti et al. (2002) no morangueiro, sendo relatado também em outras culturas, tais como Pimentão (*Capsicum annuum*) (TEIXEIRA, 1996), Zínia (*Zinnia elegans*) (YE et al., 2008), Amor-perfeito (*Viola wittrockiana*) (WANG & BAO., 2005) e Rosa (*Rosa roxburghii*) (WEN et al., 2004). Entretanto, apesar de menos eficientes que os marcadores

moleculares, apresenta vantagem de ser simples e com baixo custo, podendo ser aplicado com eficiência para certos tipos de germoplasma (BRETTING & WIDRLECHENER, 1995).

A influência ambiental sobre caracteres morfoagronômicos pode ser estimada comparando-se as descrições bibliográficas das cultivares descritas por FAEDI et al. (2009) com as observações deste estudo. Assim, as cultivares que apresentaram maiores alterações fenotípicas devido, provavelmente, à influência ambiental foram Aromas, Diamante, Camarosa, Tudla e Toyonoka. As diferenças observadas nas duas primeiras cultivares estão relacionadas ao fotoperíodo, onde as duas são classificadas em dias neutros e, de forma geral, essas cultivares não apresentam bom desenvolvimento vegetativo e produtivo na região. As cultivares Tudla e Toyonoka apresentaram bom desenvolvimento vegetativo, porém, nesse caso, as diferenças podem estar relacionadas ao clima dos países de origem (Espanha e Japão, respectivamente) em relação às condições de cultivo desse experimento. Quanto aos principais caracteres influenciados pelo ambiente, pode-se citar coloração da superfície adaxial da folha, coloração antociânica da estípula, posição da inflorescência em relação ao dossel foliar e coloração dos frutos. O êxito da utilização de caracteres morfoagronômicos está relacionada ao número de genes responsáveis pela expressão de tais características, onde, quanto menor o número de genes, menor será a influência do ambiente sobre o mesmo (VIEIRA, 2004). Contudo, no caso do morangueiro, poucos são os estudos que apontam os caracteres adequados para estudo de divergência genética.

Pelos valores de similaridade obtidos foi possível observar boa divergência genética entre as cultivares em estudo, porém, devido à baixa relação destes com a origem e a genealogia, esses resultados indicam menor eficiência em relação às técnicas moleculares, corroborando com os resultados de Conti et al. (2002). Em contrapartida, informações relativas ao comportamento de caracteres morfoagronômicos em regiões que se pretende implantar um programa de melhoramento são fundamentais para auxiliar o melhorista na escolha dos melhores cruzamentos, possibilitando a concentração de esforços nas combinações mais promissoras. Dessa forma, estes resultados serão úteis para o entendimento da base genética das cultivares de morango e também servirão de subsídios para futura implantação de um programa de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares adaptadas à região Centro-Sul do Paraná e mesmo para outras regiões brasileiras.

4. CONCLUSÕES

Os valores de similaridade e o dendograma não apresentaram relação direta com a origem e genealogia das cultivares.

A cultivar Tudla apresenta elevado potencial “per se” para utilização em programas de melhoramento.

O cruzamento mais promissor com base nos caracteres morfoagronômicos é entre as cultivares Camarosa e Campinas.

5. REFERÊNCIAS

ANTUNES, O.T.; CALVETE, E.O.; ROCHA, H.C.; NIENOW, A.A.; MARIANI, F.; WESP, C.L. Floração, frutificação e maturação de frutos de morangueiro cultivados em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.426-430, 2006.

BERTAN, I.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, J.A G.; BENIN, G.; VIEIRA, E.A.; SILVA, G.O.; HARTWIG, I.; VALÉRIO, I.P.; FINATTO, T. Dissimilaridade genética entre genótipos de trigo avaliados em cultivo hidropônico sob estresse por alumínio. **Bragantia**, v.65, n.1, p.55-63, 2006.

BRETTING, P.K.; WIDRLECHENER, M.P. Genetic markers and horticultural germplasm management. **HortScience**, v.30, n.7, p.1349-1355, 1995.

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

CHAHIDI, B.; EL-OTMANI, M.; JACQUEMOND, C.; TIJANE, M. EL-MOUSADIK, A.; SRAIRI, I.; LURO, F. Utilisation de caractères morphologiques, physiologiques et de marqueurs moléculaires pour l'évaluation de la diversité génétique de trois cultivars de clémentinier. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p.1-12, 2008.

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

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. 2003.

CRUZ, C.D. **Programa GENES: análise multivariada e simulação**. Viçosa: Imprensa Universitária. 2006. 285p.

EMBRAPA. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Embrapa, Rio de Janeiro, 2006. 306p.

FAEDI, W.; BARUZZI, G.; LOVATI, F.; SBRIGHI, P.; LUCCHI, P. **Monografia di cultivar di fragola**. Roma: Istituto Sperimentale per la Frutticoltura Roma, v.2, 2009. 240p.

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

FU, X.; NING, G.; GAO, L.; BAO, M. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, v.117, p.263–270, 2008.

FUFA, H.; BAENZIGER, P.S.; BEECHER, B.S.; DWEIKAT, I.; GRAYBOSCH, R.A.; ESKRIDGE, K.M. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. **Euphytica**, v.145, p.133–146, 2005.

GICHUKI, S.T.; BERENYI, M.; ZHANG, D.; HERMANN, M.; SCHMIDT, J.; GLOSSOL, J.; BURG, K. Genetic diversity in sweet potato (*Ipomoea atatas*) in relationship to geographic source as assessed with RAPD markers. **Genetic resources and crop evolution**, v.5, p.429–437, 2003.

KLOCKE, E.; LANGBEHN, J.; GREWE, C.; PANK, F. DNA fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v.9, p.171–176, 2002.

MACHADO, C.F. **Procedimentos para a escolha de genitores de feijão**. 118p. (Dissertação Mestrado) - Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

RONQUE, E.R.V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba:EMATER-PR, 1998. 206p.

SNPC. **Serviço nacional de proteção de cultivares**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,976115&_dad=portal&_schema=PORTAL>. Acesso em 11 nov. 2009.

TEIXEIRA, R. **Diversidade em Capsicum: análise molecular, morfoagronômica e química**. 81f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 1996.

THOMAZ, E.L.; VESTENA, L.R. **Aspectos climáticos de Guarapuava, PR**. Guarapuava: UNICENTRO, 106 p. 2003.

UENO, B. Manejo integrado de doenças do morango. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.69-77. 2004.

VIEIRA, E.S.N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 137 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

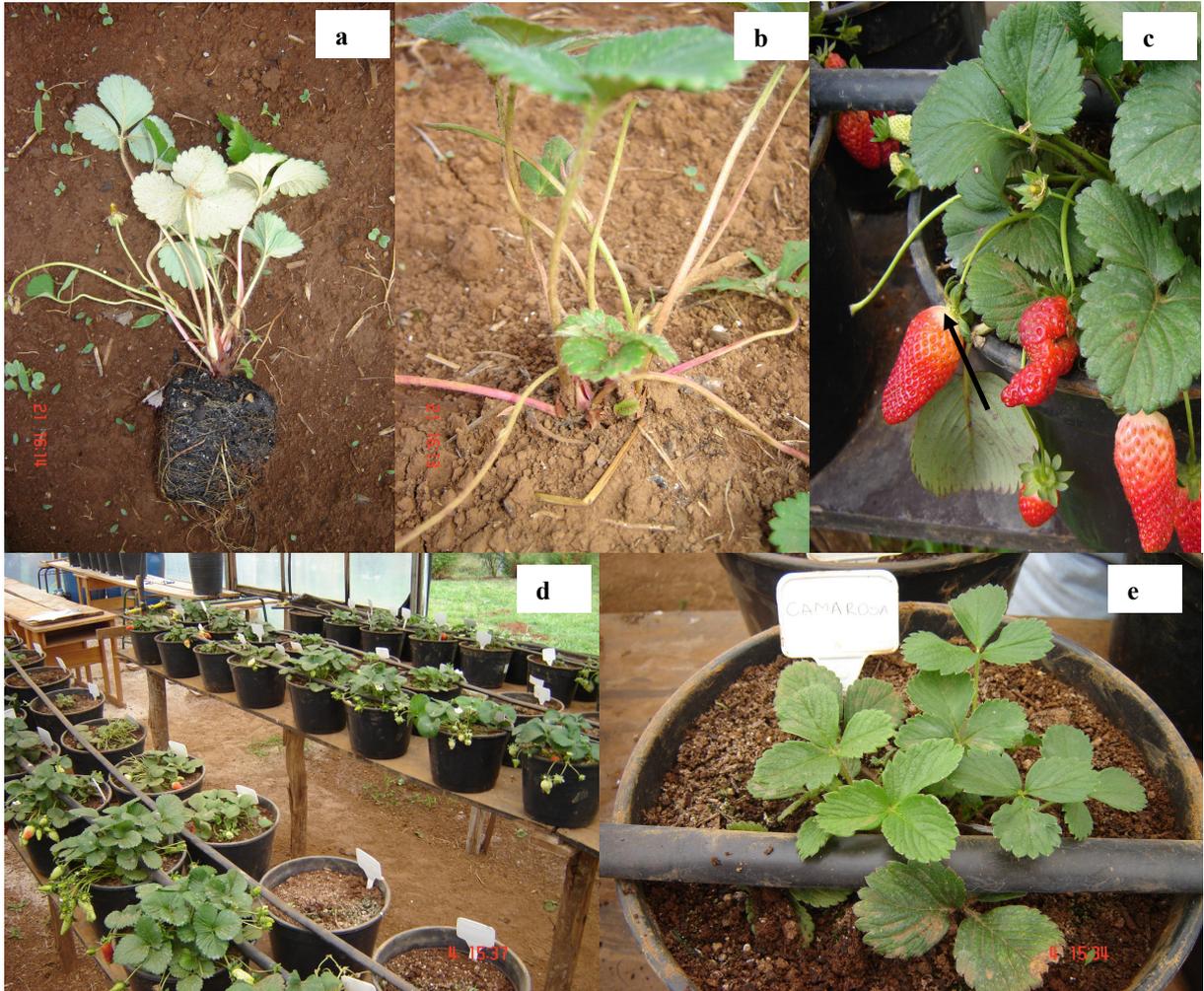
VIRMOND, M.R.F.; RESENDE, J.T.V. Produtividade e teor de sólidos solúveis totais em frutos de morango sob diferentes ambientes de cultivo. **Revista Eletrônica Lato Sensu**, Ano 1, n.1, p.62-69, 2006.

WANG, J.; BAO, M.Z. Characterization of genetic relationships in pansy (*Viola wittrockiana*) inbred lines using morphological traits and RAPD markers. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.80, n.5, p. 537–542, 2005.

WEN, X.P.; PANG, X.M.; DENG, X.X. Characterization of genetic relationships of *Rosa roxburghii* Traff and its relatives using morphological traits, RAPD and AFLP markers. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, p.189-196, 2004.

YE, Y.M.; ZHANG, J.W.; NING, G.G.; BAO, M.Z. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v.118, p.1-7, 2008.

ANEXO I



Fases da instalação do experimento para avaliação dos caracteres morfoagronômicos do morangueiro. a) Muda matriz para produção de mudas; b) Muda transplantada no campo; c) Estágio de colheita aproximada dos frutos; d) Visão geral do experimento; e) Sistema de irrigação por gotejamento.

ANEXO II



Metodologia para avaliação dos frutos das 11 cultivares de morangueiro. a) Matriz 11 x 12 para avaliação dos frutos; b) fruto avaliado individualmente e inteiro; c) fruto partido pela metade para avaliação da polpa.

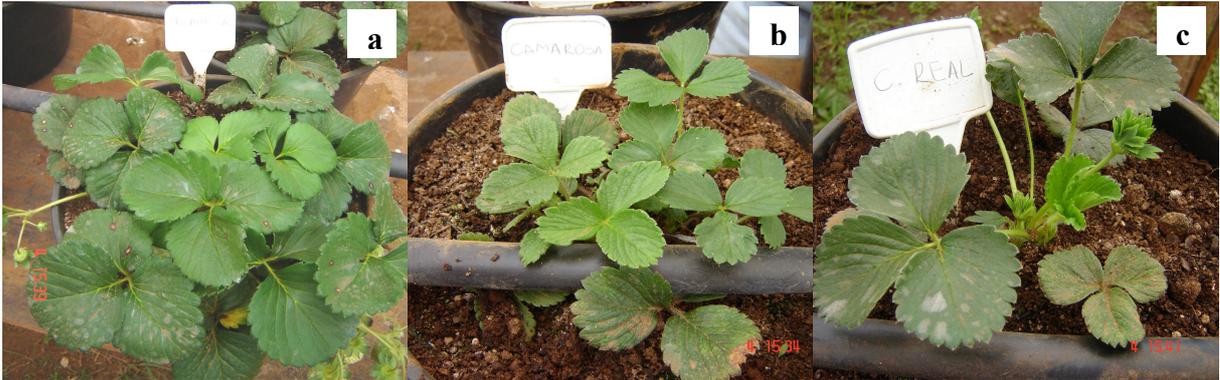
ANEXO III

Características morfoagronômicas analisadas nas 11 cultivares de morangueiro, suas respectivas escalas de nota e época de avaliação.

| CARACTERÍSTICAS | ESCALAS DE NOTA | Época de Avaliação |
|-------------------------------------|---|--------------------|
| Planta: Produção de frutos | Caráter Quantitativo | 1ª e 2ª Florada |
| Peso médio de frutos | Caráter Quantitativo | 1ª e 2ª Florada |
| Planta: densidade | 3- fraca; 5- média; 7- forte | 1ª Florada |
| Planta: vigor | 3- fraca; 5- média; 7- forte | 1ª Florada |
| Época de floração | 1- muito precoce; 3- precoce; 5- média; 7- tardia; 9- muito tardia | 1ª Florada |
| Folha: cor | 1- verde clara; 3- verde média; 5- verde escura; | 1ª Florada |
| Folha: Brilho | 3- fraca; 5- média; 7- forte | 1ª Florada |
| Folha: forma da secção transversal | 1- côncava; 2- plana; 3- convexa | 1ª Florada |
| Folíolo Terminal: relação comp/larg | 1- mais larga que comprida; 2- tão comprida como larga; 3- mais comprida do que larga | 1ª Florada |
| Folíolo Terminal: forma da base | 1- acuneada; 2- obtusa; 3- arredondada | 1ª Florada |
| Folíolo Terminal: forma do recorte | 1- serrilhada; 2- crenada | 1ª Florada |
| Estípula: pigmentação antociânica | 1- ausente ou fraca; 2- média; 3- forte | 1ª Florada |
| Inflorescência: posição na folhagem | 1- no nível do dossel foliar; 2- fora do dossel foliar | 1ª Florada |
| Flor: tamanho do cálice/corola | 1- menor; 2- do mesmo tamanho; 3- maior | 1ª Florada |
| Flor: tamanho | 3- pequena; 5- média; 7- grande | 1ª Florada |
| Pétala: Relação comprimento/largura | 1- mais larga que comprida; 2- tão comprida como larga; 3- mais comprida do que larga | 1ª Florada |
| Fruto: tamanho em relação ao cálice | 1- muito menor; 2- menor; 3- igual; 4- maior; 5- muito maior | 1ª Florada |
| Fruto: remoção do cálice | 1- muito fraca; 2- fraca; 3- média; 4- forte; 5- muito forte | 1ª Florada |
| Fruto: inserção no cálice | 1- inclusivo; 2- plano; 3- saliente | 1ª Florada |
| Fruto: cor | 1- vermelho alaranjado; 2- vermelha; 3- vermelho escuro; | 1ª Florada |
| Fruto: brilho | 3- fraco; 5- médio; 7- forte | 1ª Florada |
| Fruto: formato mais frequente | 1- reniforme; 2- achatado; 3- globoso; 4- cônico; 5- bicônico; 6- ovóide; 7- quase cilíndrico; 8- cuneiforme; 9- cordiforme | 2ª Florada |
| Fruto: tamanho | 1- muito pequeno; 3- pequeno; 5- médio; 7- grande; 9- muito grande | 2ª Florada |
| Fruto: zona sem Aquênios | 3- pequena; 5- média; 7- grande | 2ª Florada |
| Fruto: implantação dos aquênios | 1- inclusos; 2- emergentes; 3- salientes | 2ª Florada |
| Cor dos Aquênios | 1- amarela; 2- verde; 3- vermelha | 2ª Florada |
| Fruto: cavidade central | 1- ausente; 2- pequena; 3- grande | 2ª Florada |
| Fruto: cor vermelha na polpa | 1- apenas na margem; 2- na margem em direção ao centro; 3- uniforme em toda a polpa | 2ª Florada |
| Fruto: regularidade da cor da polpa | 1- não uniforme; 2- quase uniforme; 3- uniforme | 2ª Florada |

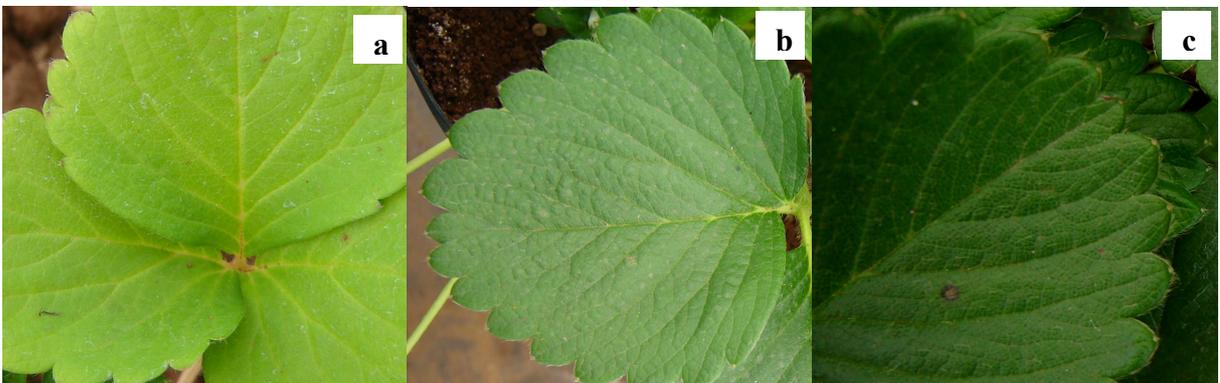
Adaptado de SNPC (2009).

ANEXO IV



Densidade de folha nas plantas de morangueiro. a) alta densidade foliar [cv. Toyonoka]; b) densidade foliar mediana [cv. Camarosa]; c) fraca densidade foliar [cv. Camino Real].

ANEXO V



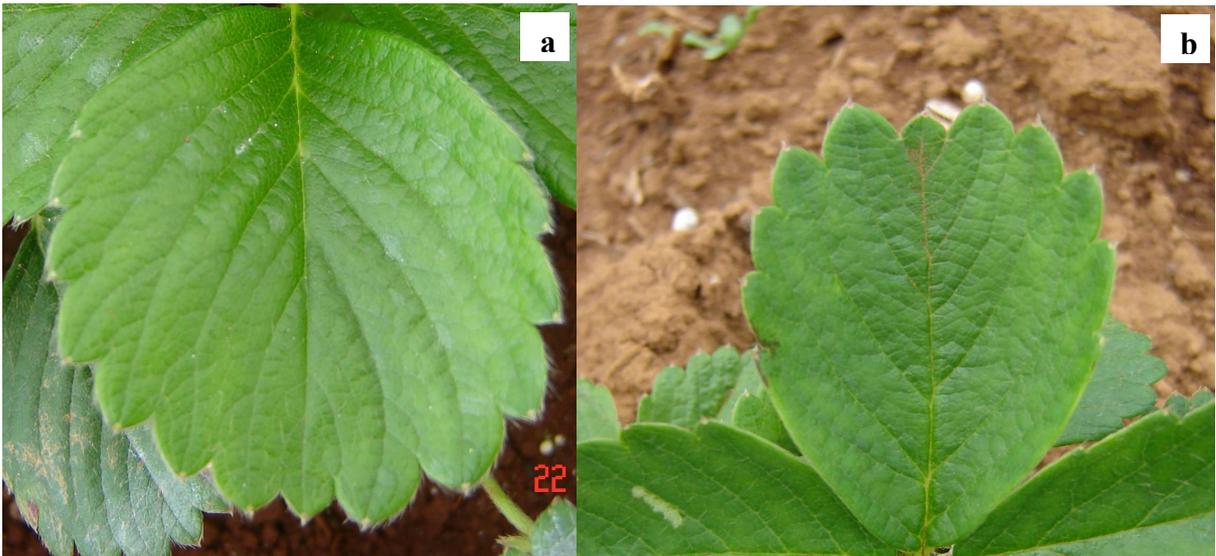
Coloração das folhas de morangueiro. a) verde clara [cv. Toyonoka]; b) verde média [cv. Tudla]; c) verde escura [cv. Diamante].

ANEXO VI



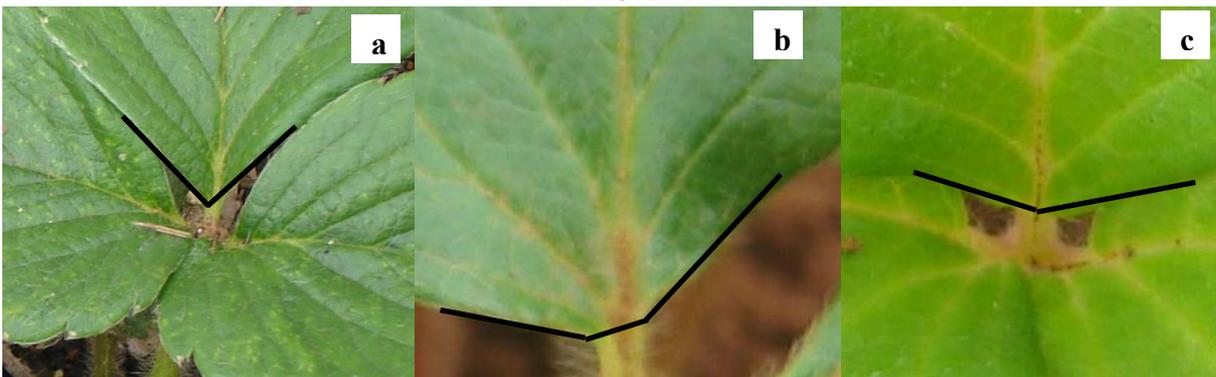
Forma da seção transversal da folha do morangueiro. a) côncava [cv. Toyonoka]; b) plana [cv. Tudla]; convexa [cv. Diamante].

ANEXO VII



Relação comprimento largura das folhas do morangueiro. a) tão comprida como larga [cv. Tudla]; b) mais comprida do que larga [cv. Camino Real].

ANEXO VIII



Forma da base do folíolo terminal do morangueiro. a) acuneada [cv. Ventana]; b) obtusa [cv. Tudla]; arredondada [cv. Toyonoka].

ANEXO IX



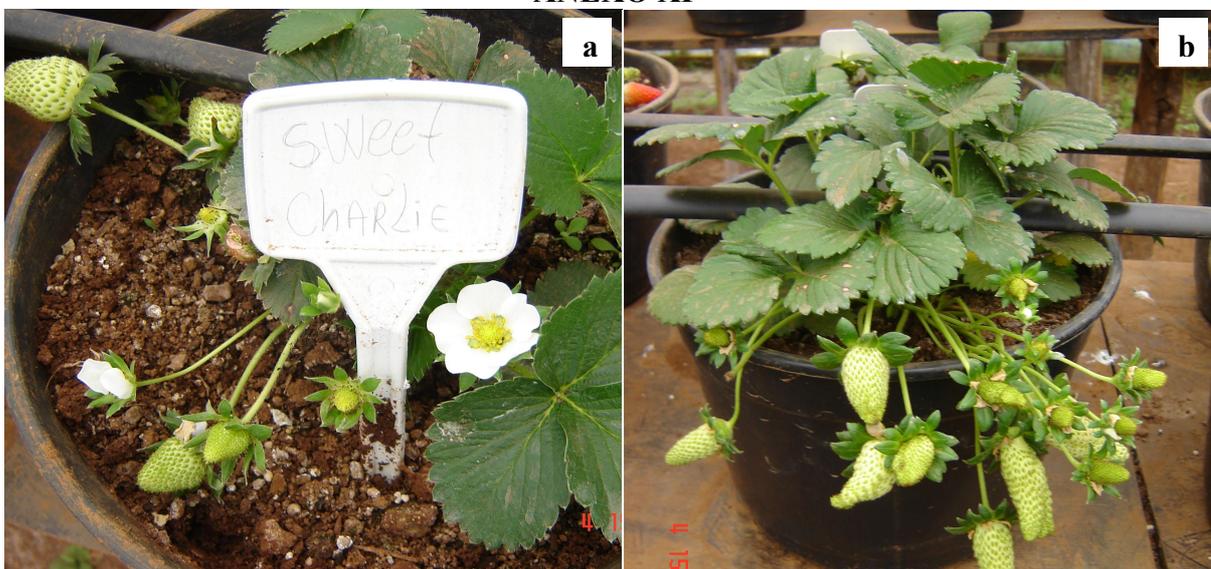
Forma do recorte de folhas do morangueiro. a) crenada [cv. Toyonoka]; b) serrilhada [cv. Ventana].

ANEXO X



Pigmentação antocianica da estípula do morangueiro. a) ausência ou pigmentação fraca [cv. Sweet Charlie]; b) pigmentação em parte da estípula [cv. Camarosa]; c) pigmentação forte [cv. Oso Grande].

ANEXO XI



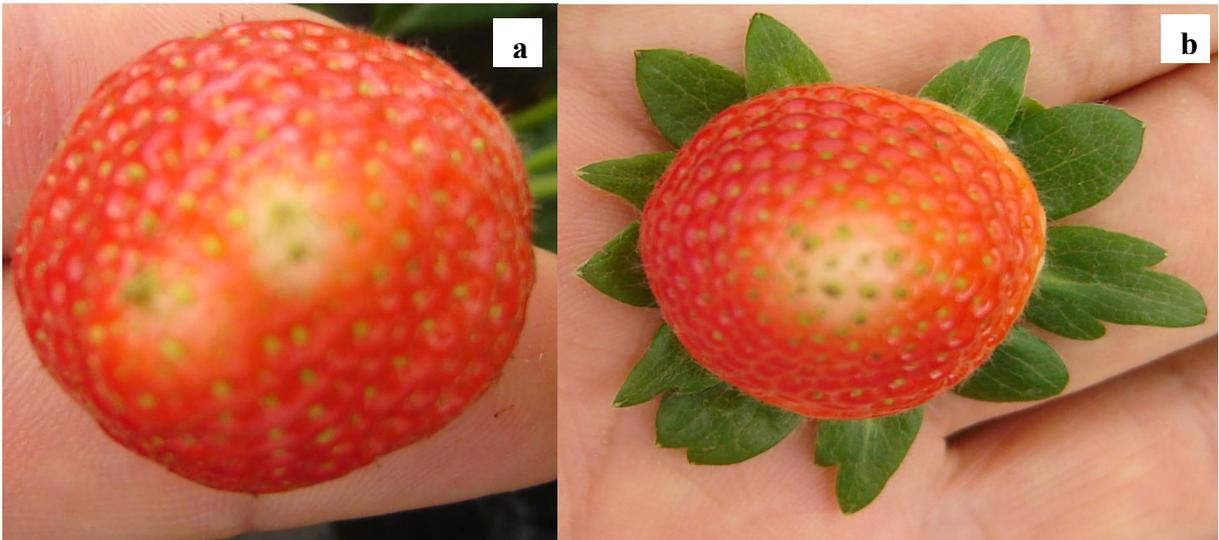
Posição da inflorescência em relação à folhagem do morangueiro. a) no nível do dossel [cv. Sweet Charlie]; b) fora do dossel foliar [cv. Tudla].

ANEXO XII



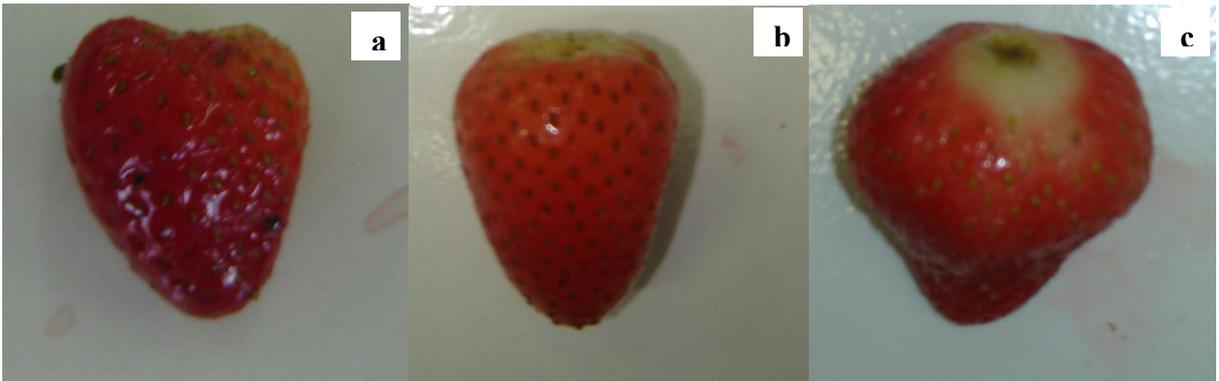
Tamanho do cálice em relação à corola. a) Cálice menor do que a corola [cv. Dover]; b) cálice do mesmo tamanho que a corola [cv. Campinas]; cálice maior que a corola [cv. Tudla].

ANEXO XIII



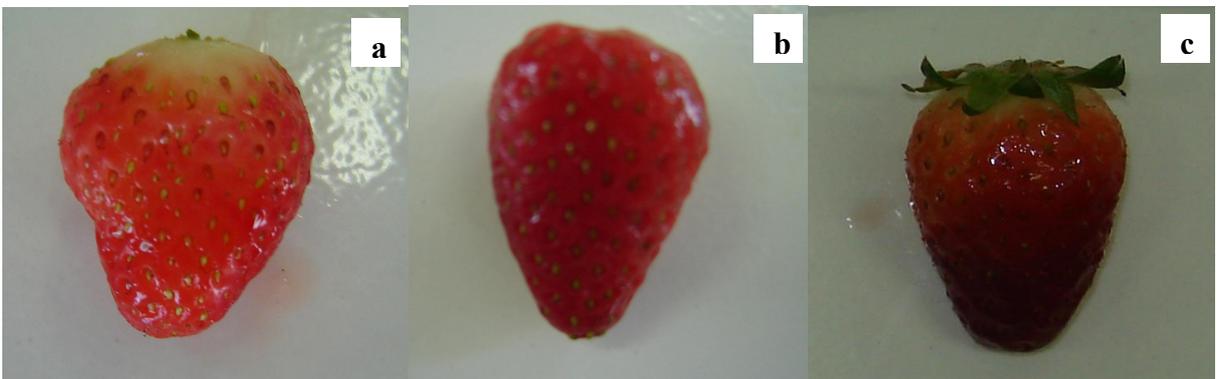
Tamanho do fruto em relação ao cálice. a) menor [cv. Camarosa]; b) maior [cv. Tudla].

ANEXO XIV



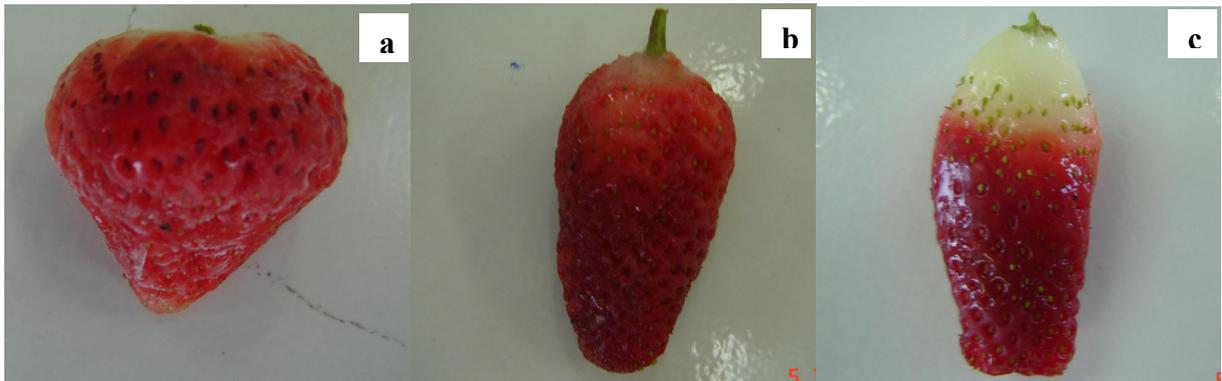
Inserção do cálice nos frutos. a) cálice incluso no fruto, deixando-o em forma de coração [cv. Sweet Charlie]; b) cálice plano em relação ao fruto [cv. Diamante]; c) cálice protuberante em relação ao fruto, deixando-o com uma leve protuberância na base [cv. Toyonoka].

ANEXO XV



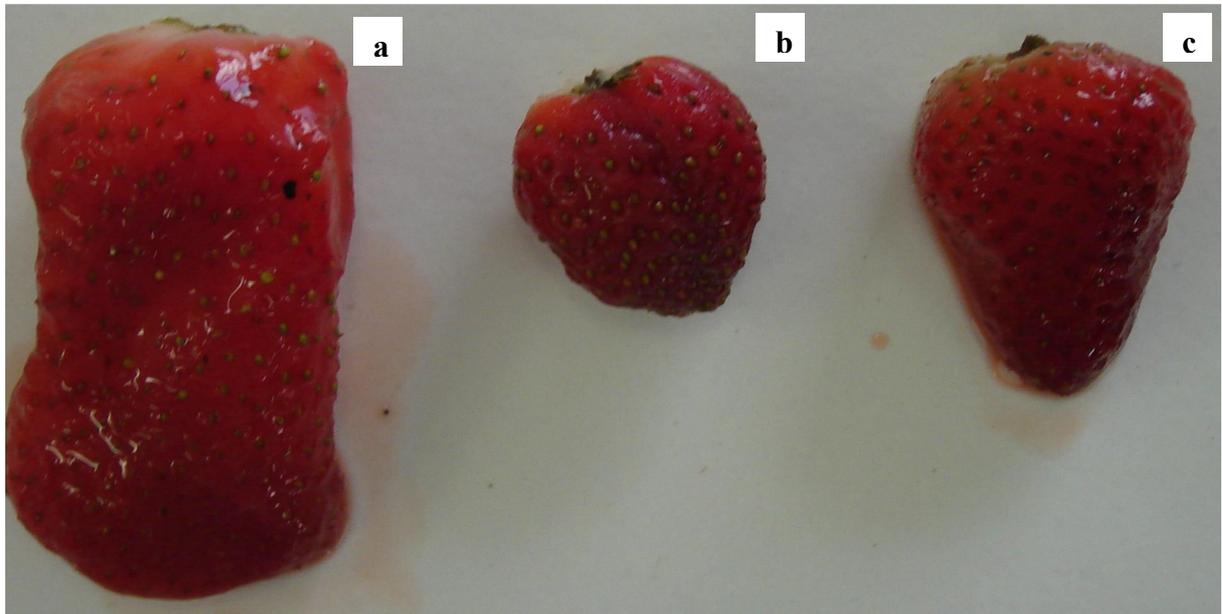
Coloração dos frutos do morangueiro. a) coloração vermelho-alaranjada [cv. Campinas]; coloração vermelho-escuro [cv. Dover]; c) coloração vermelho-negro [cv. Ventana].

ANEXO XVI



Formato mais frequente de frutos de morango. a) cônico [cv. Toyonoka]; b) quase cilíndrico [cv. Camino Real]; c) cuneiforme [cv. Tudla].

ANEXO XVII



Tamanho relativo dos frutos do morangueiro. a) fruto grande [cv. Tudla]; b) frutos pequenos [cv. Aromas]; c) frutos medianos [cv. Dover].

ANEXO XVIII



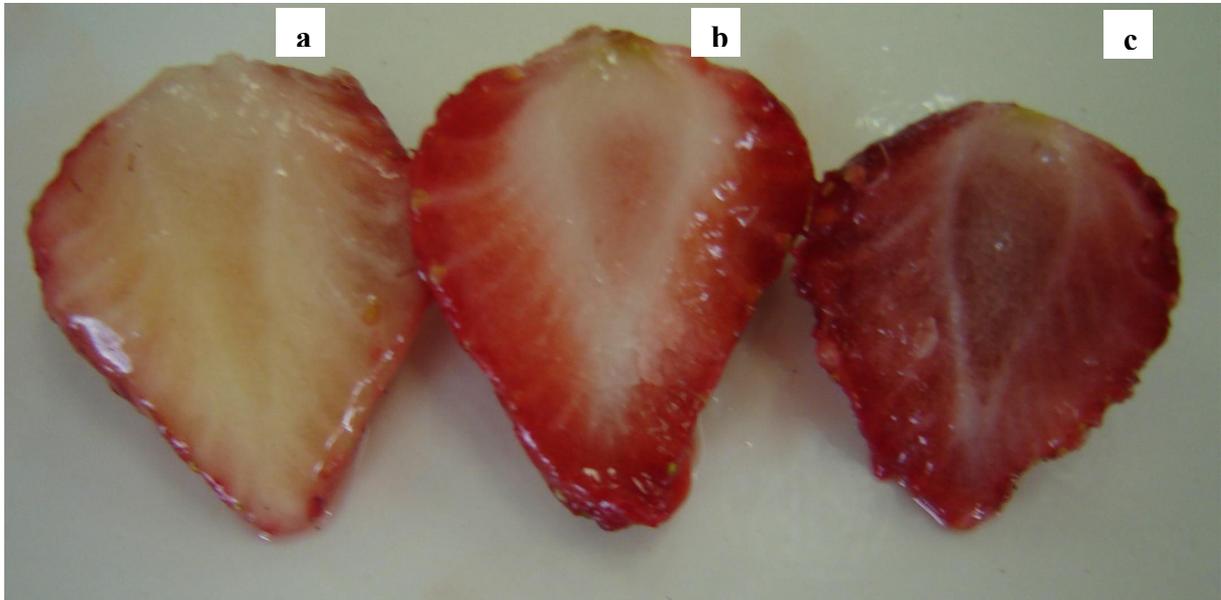
Implantação e coloração dos aquênios em fruto de morango. a) aquênio incluído no fruto e de coloração verde [cv. Camino Real]; b) aquênios emergentes em relação à polpa do fruto e de coloração verde [cv. Aromas]; c) aquênios salientes em relação a polpa do fruto e de coloração avermelhada [cv. Toyonoka].

ANEXO XIX



Cavidade central em frutos de morango. a) ausência de cavidade central [cv. Campinas]; b) cavidade central pequena [cv. Camino Real]; c) cavidade central grande [cv. Tudla].

ANEXO XX



Regularidade da cor vermelha na polpa de frutos de morango. a) coloração vermelha apenas na margem [cv. Ventana]; b) coloração vermelha na margem em direção ao centro [cv. Dover]; c) coloração vermelha uniforme em toda a polpa [cv. Campinas].

ANEXO XXI

Resumo da análise de variância dos 29 caracteres morfoagronômicos avaliados nas 11 cultivares de morangueiro.

| VARIÁVEIS | Coeficiente de Variação (%) | Quadrado médio do erro | Quadro médio das cultivares |
|---|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 1) Planta: produção de frutos | 35,34 | 0,88 | 1,01 ^{ns} |
| 2) Peso médio de frutos | 32,89 | 0,75 | 1,25 ^{ns} |
| 3) Planta: densidade | 12,56 | 0,34 | 8,61** |
| 4) Planta: vigor | 30,72 | 0,76 | 0,24 ^{ns} |
| 5) Planta: Época de floração | 12,75 | 0,04 | 0,89** |
| 6) Folha: cor | 10,81 | 0,11 | 3,38** |
| 7) Folha: Brilho | 34,27 | 2,79 | 1,48 ^{ns} |
| 8) Folha: forma da secção transversal | 25,79 | 1,92 | 21,11** |
| 9) Foliolo Terminal: relação comp/larg | 12,76 | 0,07 | 0,47** |
| 10) Foliolo Terminal: forma da base | 29,43 | 0,22 | 1,43** |
| 11) Foliolo Terminal: forma do recorte | 22,08 | 0,13 | 0,61** |
| 12) Estípula: pigmentação antociânica | 34,69 | 0,39 | 4,08** |
| 13) Inflorescência: posição na folhagem | 15,66 | 0,13 | 0,72** |
| 14) Flor: tamanho do cálice/corola | 18,91 | 0,13 | 0,83** |
| 15) Flor: Tamanho | 37,24 | 3,29 | 2,02 ^{ns} |
| 16) Pétala: Relação comprimento/largura | 32,00 | 0,79 | 0,09 ^{ns} |
| 16) Fruto: tamanho em relação ao cálice | 17,39 | 0,25 | 7,29** |
| 18) Fruto: remoção do cálice | 25,31 | 0,17 | 1,64** |
| 19) Fruto: tamanho | 17,25 | 0,55 | 11,54** |
| 20) Fruto: inserção no cálice | 19,67 | 0,01 | 1,79** |
| 21) Fruto: formato mais frequente | 6,53 | 0,17 | 9,54** |
| 22) Fruto: cor | 8,79 | 0,26 | 4,74** |
| 23) Fruto: brilho | 16,3 | 0,14 | 4,82** |
| 24) Fruto: zona sem Aquênios | 53,03 | 6,80 | 7,06 ^{ns} |
| 25) Fruto: implantação dos aquênios | 22,84 | 0,19 | 2,38** |
| 26) Fruto: cor dos aquênios | 10,67 | 0,16 | 0,47** |
| 27) Fruto: cavidade central | 10,31 | 0,08 | 0,64** |
| 28) Fruto: distribuição da cor na polpa | 36,31 | 0,41 | 1,87** |
| 29) Fruto: regularidade da cor da polpa | 44,96 | 0,65 | 0,13 ^{ns} |

**Significativo pelo teste F ($p < 0,05$); ^{ns} - não significativo.

ANEXO XXII

Resultado da avaliação dos 21 caracteres morfoagronômicos nas 11 cultivares de morangueiro.

| VARIÁVEIS* ¹ | Aromas | Camino Real | Camarosa | Campinas | Diamante | Dover | Oso Grande | Sweet Charlie | Toyonoka | Tudla | Ventana |
|-------------------------------------|--------|-------------|----------|----------|----------|-------|------------|---------------|----------|-------|---------|
| Planta: densidade | 5 | 5 | 5 | 7 | 3 | 5 | 3 | 3 | 7 | 7 | 4 |
| Época de floração | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| Folha: cor | 5 | 1 | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 3 | 5 |
| Folha: forma da secção transversal | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| Folíolo Terminal: relação comp/larg | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Folíolo Terminal: forma da base | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| Folíolo Terminal: forma do recorte | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| Estípula: pigmentação antociânica | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Inflorescência: posição na folhagem | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Flor: tamanho do cálice/corola | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| Fruto: tamanho em relação ao cálice | 2 | 5 | 5 | 2 | 2 | 3 | 4 | 2 | 1 | 5 | 2 |
| Fruto: remoção do cálice | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Fruto: tamanho | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 5 | 4 | 3 | 7 | 9 | 4 |
| Fruto: inserção no cálice | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 |
| Fruto: formato mais frequente | 8 | 7 | 7 | 4 | 4 | 4 | 8 | 7 | 4 | 8 | 4 |
| Fruto: cor | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 |
| Fruto: brilho | 2 | 1 | 2 | 4 | 4 | 3 | 1 | 4 | 1 | 2 | 2 |
| Fruto: implantação dos aquênios | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| Cor dos Aquênios | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| Fruto: cavidade central | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| Fruto: distribuição da cor na polpa | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 |

*Valor médio de quatro repetições.

*¹Apenas variáveis significativas pelo teste F (p<0,05).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto os caracteres morfoagronômicos como os marcadores moleculares têm sua importância reconhecida para estudos de divergência genética. Porém, de maneira geral, neste estudo os marcadores moleculares foram mais eficientes, corroborando com diversos trabalhos encontrados na literatura.

O país de origem e a genealogia das cultivares demonstraram ser parâmetros interessantes para interpretação e discussão dos dendogramas e das matrizes de similaridade. Porém, esses parâmetros apresentam muitas vezes limitações, devido, principalmente, à complexidade do genoma da espécie *F. x ananassa* Duch.. A presença de cultivares do mesmo país de origem num agrupamento muitas vezes não é garantia de que há relação direta entre o grupo e o país de origem, pois a maioria das cultivares são provenientes dos programas de melhoramento norte americanos ou descendentes em diferentes níveis dos mesmos. Quanto à genealogia, foi possível identificar apenas os ancestrais de algumas cultivares, como, por exemplo, Oso Grande, Camarosa, Dover e Tudla. Porém, algumas cultivares, tais como Aromas, Camino Real, Diamante e Ventana, possuem como genitores clones, fator que limitou o rastreamento dos seus ancestrais, impossibilitando a discussão mais ampla dos dados. A única exceção para as duas ponderações supracitadas é a cultivar Toyonoka, onde não foi identificado parentesco com as cultivares norte americanas e possui clones ao invés de cultivares como genitores.

Os marcadores ISSR são mais eficientes que os marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos no estudo de divergência genética do morangueiro, apresentando maior coerência com a origem e a genealogia das cultivares. Por sua vez, os marcadores RAPD foram mais eficientes que caracteres morfoagronômicos.

Os resultados obtidos neste estudo serão úteis para o melhor entendimento da base genética das cultivares de morangueiro e também servirão de subsídios para programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições de solo e clima do Brasil.