

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização Molecular de Acessos de Morangueiro do Banco Ativo de
Germoplasma da Embrapa Clima Temperado utilizando Marcadores
Microssatélites**

Carolina da Silva Silveira

Pelotas, 2014

CAROLINA DA SILVA SILVEIRA

Caracterização Molecular de Acessos de Morangueiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado utilizando Marcadores Microsatélites

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Professor Dr. Luciano da Silva Pinto

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S587c Silvera, Carolina da Silva

Caracterização molecular de acessos de morangueiro do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado utilizando marcadores microssatélites / Carolina da Silva Silvera. – 29f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Luciano da Silva Pinto.

1.Biotecnologia. 2.Fragaria. 3.Rosaceae. 4. Microssatelite.
5.Morangueiro. I.Pinto, Luciano da Silva. II.Título.

CDD: 634.75

BANCA EXAMINADORA

Pesquisador Dr. Sandro Bonow – Embrapa Clima Temperado

Pós-doutoranda Naciele Marini – Embrapa Clima Temperado

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família. Sem eles, não teria chegado até aqui”.

Agradecimentos

À Deus, por me conceber sabedoria e serenidade para enfrentar momentos difíceis e pelas conquistas alcançadas até agora.

À minha família, minha mãe Marilda Silveira, meu pai João Flor Silveira e meu irmão Rodrigo Silveira, por me apoiarem, me instruírem, pelo amor incondicional e pelo incentivo em todos os momentos da minha vida. Vocês são a minha base. Amo vocês!

Ao Marcos Bueno, por todo amor, companheirismo e dedicação em me ouvir, por acreditar em mim, me aconselhar e me incentivar sempre. Tu é essencial na minha vida!

À Embrapa Clima Temperado, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional durante o estágio.

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela dedicação em capacitar seus estudantes.

Ao meu orientador Pesquisador Dr. Sandro Bonow, pela confiança depositada em mim para a realização dos trabalhos, pela oportunidade de aprender e crescer durante o tempo de estágio. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos!

À Pesquisadora Dra. Miriam Valli Büttow, por todo incentivo, paciência e apoio em todos os momentos do meu estágio. Muito obrigada!

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular, por todo o auxílio dedicado para o meu aprendizado, Angela, Liane, Raquel, Roberta, Natércia, Naciele e Joyce, pela amizade, ajuda, palavras de incentivo, estímulo e pelo convívio agradável.

Muito obrigada!

Resumo

SILVEIRA, Carolina S. **Caracterização Molecular de Acessos de Morangueiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado utilizando Marcadores Microssatélites**. 2014. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O morangueiro é amplamente cultivado em todo o mundo. Possui um genoma octaploides e é propagado vegetativamente. O objetivo do presente estudo foi caracterizar 29 acessos pertencentes ao BAG de morangueiro mantido pela Embrapa Clima Temperado. Foram utilizados, no estudo, 13 marcadores microssatélites. Em espécies poliploides, a frequência alélica não pode ser calculada diretamente, deste modo foram avaliados o número total de alelos por loco (N_l), número total de alelos para cada *primer* (N_A), a heterozigosidade esperada (HZ) e o poder de resolução (R_p) dos *primers*. Foi construído um dendrograma baseado no método UPGMA e a estrutura genética foi determinada por meio de uma análise Bayesiana, por meio do *software* Structure. Também foi observada a partição hierárquica da variação genética entre os subgrupos formados pelo Structure através da AMOVA. Considerando todos os acessos, foi encontrada uma média de 6,8 alelos por loco com um total de 115 alelos. O valor médio da HZ foi de 0,34, e o R_p variou de 1,57 até 7,14. Com a combinação dos alelos de três marcadores (CHFAM23, EMFN170 e EMFN182) foi possível obter um perfil diferenciado para os 29 acessos do BAG. Alguns acessos apresentaram uma similaridade genética alta, de 95% entre a cultivar 'Santa Clara' e o acesso MOR24 do BAG. A estrutura genética foi determinada por meio de análise Bayesiana, onde foi possível observar dois subgrupos genéticos, entretanto, alguns genótipos obtiveram um nível de mistura, indicando o compartilhamento de alelos dos dois subgrupos. A AMOVA demonstrou que a maior parte da variabilidade genética (64%) encontra-se dentro do subgrupo, indicando que a grande maioria da variabilidade genética é devida a diferenças entre indivíduos. O trabalho permite concluir que com a análise de apenas três locos microssatélites é possível individualizar os 29 genótipos estudados, podendo os mesmos ser indicados na identificação de cultivares de morangueiro.

Palavras-chave: *Fragaria*, microssatelite, Rosaceae, morangueiro.

Abstract

SILVEIRA, Carolina S. **Molecular characterization of Strawberry accesses of Active Germplasm Bank of Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) evaluated through microsatellite markers.** 2014. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Strawberry is widely grown throughout the world. It has an octoploid genome and is vegetatively propagated. The aim of this study was to obtain the molecular characterization of 29 accessions of strawberry accessions from the Active Germplasm Bank (AGB) maintained by Embrapa, through 13 SSR. In polyploid species, allelic frequency cannot be directly calculated, thus total number of alleles per locus (N_i), total number of alleles (N_A) for each primer, expected heterozygosity (HZ) and resolution power (R_p) were evaluated. A dendrogram was constructed based in UPGMA and genetic structure was determined by a Bayesian analysis with the *software* Structure. Hierarchical partition of genetic variation (AMOVA) were evaluated among subgroups formed by Structure. Considering all accessions, an average of 6.8 alleles per locus with a total of 115 alleles were found. Average HZ was 0.34 and R_p ranged from 1.57 to 7.14. Combination of SSR loci (CHFAM23, EMFN170 and EMFN182) has achieved a distinct profile for all 29 AGB accessions. A very high genetic similarity were found (95%) between cultivar 'Santa Clara' and a local variety grown in "Serra Gaúcha". Genetic structure determined by Bayesian analysis, defined two genetic subgroups, however, some genotypes obtained a mixture level indicating alleles share between subgroups. AMOVA showed most of the genetic variability (64%) within the subgroups, indicating that most of genetic variability is due to genetic differences between individuals. This study shows that the analysis of only three SSR is capable to identify 29 genotypes, and should be indicated for cultivar identification.

Keywords: *Fragaria*, microsatellite, Rosaceae, strawberry

Lista de Figuras

- FIGURA 1 POLIMORFISMO DE 25 GENÓTIPOS DE MORANGUEIRO DO BAG DA EMBRAPA PARA O MARCADOR EMFVI136.....22
- FIGURA 2 VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL EM 29 GENÓTIPOS DE *FRAGARIA X ANANASSA* COM BASE EM 13 LOCOS SSR. DENDROGRAMA OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO UPGMA (A) E ESTRATIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO COM $K=2$. CADA COR REPRESENTA UMA DIFERENTE SUBPOPULAÇÃO (B).25

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| TABELA 1 CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DO BAG, DENOMINAÇÃO DOS ACESSOS, ESPÉCIE, LOCAL/PAÍS DE ORIGEM E CÓDIGO DE REGISTRO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. | 18 |
| TABELA 2 DENOMINAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR; TEMPERATURA DE ANELAMENTO EM °C; E SUAS RESPECTIVAS REFERÊNCIAS. | 19 |
| TABELA 3 HETEROZIGOSIDADE ESPERADA (HZ); PODER DE RESOLUÇÃO DOS MARCADORES (Rp); N_i : NÚMERO DE ALELOS POR INDIVÍDUO N_A : NÚMERO TOTAL DE ALELOS; E NÚMERO DE GENÓTIPOS ÚNICOS DETERMINADOS POR MARCADOR, NOS 29 ACESSOS DE MORANGUEIRO ANALISADOS COM 13 LOCOS DE MICROSSATÉLITES..... | 23 |
| TABELA 4 COMBINAÇÕES DE MARCADORES PARA A DISTINÇÃO ENTRE GENÓTIPOS..... | 24 |
| TABELA 5 DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE GRUPOS DE F. X ANANASSA FORMADOS PELO STRUCTURE: DOIS GRUPOS PUROS E DEMAIS GENÓTIPOS COM PROPORÇÃO DE MISTURA ACIMA DE 90%, BASEADO EM 29 ACESSOS E 13 MARCADORES MICROSSATÉLITES..... | 26 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|---------------|--|
| μL | microlitro |
| μm | micrômetro |
| AFLP | polimorfismo de fragmentos amplificados |
| BAG | banco ativo de germoplasma |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| HZ | heterozigosidade esperada |
| mA | miliampere |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| ng | nanograma |
| pb | pares de base |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| RAPD | DNA polimórfico amplificado ao acaso |
| R_p | poder de resolução |
| SSR | sequências simples repetidas |
| UPGMA | <i>unweighted pair-group method with arithmetic averages</i> |
| V | volts |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 Introdução | 13 |
| 2 Objetivos | 14 |
| 2.1 Objetivo geral | 14 |
| 2.2 Objetivos específicos | 14 |
| 3 Revisão bibliográfica | 14 |
| 4 Material e Métodos | 18 |
| 4.1 Material vegetal e extração de DNA..... | 18 |
| 4.2 PCR e análise dos marcadores..... | 19 |
| 4.3 Análise da variabilidade genética e estrutura de população | 20 |
| 5 Resultados e discussão..... | 22 |
| 5.1 Análise da variabilidade genética | 22 |
| 5.2 Relações genéticas e estrutura de população | 24 |
| 7 Conclusão e perspectivas | 26 |
| 8 Referências bibliográficas | 27 |

1 Introdução

O morangueiro é uma cultura de grande importância econômica devido às suas características organolépticas, cultivado em diversos países. Como resultado, existem atualmente mais de 100 programas de melhoramento em todo o mundo, com o objetivo de desenvolver cultivares superiores com melhor sabor e textura, aumento do período de colheita, e uma vida útil mais longa pós-colheita (Faedi et al., 1999).

Normalmente, o morangueiro é propagado por clonagem vegetativa, e isto acarreta um grande desafio na comercialização correta de cultivares comercialmente importante. O fenótipo do morango é bastante similar, sendo assim, difícil distinguir cultivares a partir de descritores, podendo levar a perdas substanciais de lucro e produção se as cultivares erradas forem cultivadas (BRUNINGS et al., 2010). Além disso, as cultivares comercialmente importantes lançados a partir de programas de melhoramento são protegidos por propriedade intelectual, exigindo royalties a ser pago aos obtentores, para cada planta que é propagada e cultivada comercialmente. Para proteger os direitos de obtentores de plantas, seria vantajoso ter um sistema robusto e confiável para o auxílio à identificação de cultivares a partir de descritores morfológicos (GOVAN et al., 2008).

Os marcadores moleculares microssatélites, são ideais para a produção de um banco de dados *fingerprint* para a identificação de cultivares, uma vez que são gerados a partir de pares de iniciadores de sequência conhecida e, por conseguinte, são altamente reprodutíveis (WHITAKER, 2011).

Govan (2008) analisou mais de 100 marcadores microssatélites distribuídos por todo o genoma, para duas cultivares de morangueiro. A partir disso, foram selecionados dez SSR mais polimórficos, no qual são indicados para utilização da identificação de cultivares em todos os países. O presente trabalho teve como objetivo geral, a utilização destes marcadores para a identificação dos acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Morangueiro (BAG) mantido pela Embrapa Clima Temperado. Para este estudo, utilizamos, além dos marcadores

indicados por Govan (2008), mais três SSR recomendados na literatura pelo alto grau de polimorfismo (LEWERS; HOKANSON; BASSIL, 2005).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi fazer a caracterização molecular dos acessos pertencentes ao BAG de morangueiro da Embrapa, visando à identificação de cultivares.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar um conjunto de marcadores microssatélites polimórficos capazes de caracterizar a variabilidade genética entre os acessos presentes no BAG de morangueiro da Embrapa Clima Temperado;
- Avaliar o polimorfismo apresentado por cada cultivar para cada marcador;
- Estabelecer um conjunto mínimo de marcadores que individualizem molecularmente os acessos.
- Verificar a distância genética e os grupos formados pelos acessos de morangueiro;

3 Revisão bibliográfica

O morangueiro, *Fragaria × ananassa* Duchesne ex Rozier ($2n = 8x = 56$), é amplamente cultivado em todo o mundo. Pertence à família Rosaceae, assim como outras espécies de importância econômica como o pessegueiro, a ameixeira, a nectarineira, pereira, amoreira, framboeseira e a roseira, essa última de grande importância ornamental. Historicamente, o morangueiro foi utilizado como uma

cultura perene para regiões temperadas; no entanto, no século passado, o morangueiro foi adaptado para os sistemas de produção anual e para as regiões de crescimento subtropicais e do Mediterrâneo através do melhoramento genético e dos sistemas de cultivo (WHITAKER, 2011). Em 2013, a América do Norte e a América do Sul foram os maiores responsáveis pela produção mundial, com mais de 42% da produção, seguidos pela Europa (29%), Ásia (18%) e África (9%). A produção em 2013 no Brasil foi de 3.200 t, com uma produtividade média de 8,4 t ha⁻¹, sendo os Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul os maiores produtores (FAOSTAT, 2013).

O morangueiro é uma espécie originada em meados do século 18 através de hibridação entre os seus progenitores octaploides *F. virginiana* (L.) Miller subsp. *virginiana* coletados na América do Norte e *F. chiloensis* Miller subsp. *chiloensis* coletadas na América do Sul (DARROW, 1966)

Três fórmulas hipotéticas para o genoma octaploide foram sugeridas: AABBBBCC, AAA'A'BBBB e por último AAA'A'BBB'B' (HUMMER; HANCOCK, 2009). A partir de um estudo comparativo de mapeamento genético entre o morangueiro cultivado, *F. ananassa*, e seus parentes diploides, foi possível observar altos níveis de colinearidade entre os dois grupos, revelando que a poliploidização que ocorreu ao longo da evolução do gênero *Fragaria*, não provocou grandes rearranjos cromossômicos (ROUSSEAU-GUEUTIN et al., 2008).

As cultivares de morangueiro atualmente plantadas apresentam uma estreita base genética, tendo aproximadamente 50 genótipos como base (Dale e Sjulín, 1990). Esse fato acarreta uma grande similaridade morfológica entre as cultivares, principalmente durante a fase vegetativa, o que mesmo para os olhos treinados de um melhorista pode causar dificuldade para a diferenciação entre genótipos. Além disso, os descritores morfológicos podem variar com diferentes condições ambientais e práticas culturais.

O uso de marcadores de DNA em morangueiro é utilizado no estudo de diversidade genética e estrutura de população, identificação de cultivares, mapas de ligação e estrutura genômica. Marcadores ligados à característica de interesse como resistência a doenças e fotoperíodo de floração são utilizados na seleção assistida por marcadores (ALBANI; BATTEY; WILKINSON, 2004; ASHMAN, 2003; BRUNINGS et al., 2010; CARRASCO et al., 2007; SARGENT; HADONOU;

SIMPSON, 2003). Existem muitos programas de melhoramento genético de morangueiro, no qual o uso da biotecnologia tem sido cada vez mais comum, sendo os marcadores moleculares a principal ferramenta para identificação precisa de genótipos. Isto é particularmente importante para a prevenção de erros de identificação de variedades durante a propagação, pois permite identificar acessos com precisão em bancos de germoplasma e auxilia a identificação de cultivares protegidas por propriedade intelectual (WHITAKER, 2011).

Cultivares de morangueiro, usualmente, são propagadas vegetativamente (HONJO et al., 2011). Recentemente, a propagação irregular e a distribuição sem o pagamento dos devidos royalties de cultivares protegidas tornaram-se um sério problema (KUNIHISA, 2011). Os métodos morfológicos apresentam algumas limitações devido a grande similaridade morfológica das cultivares e a uma ferramenta para o auxílio desta limitação é a caracterização molecular. Sendo assim, para proteger os direitos de propriedade intelectual dos obtentores, bem como manter a integridade genética, vários sistemas de marcadores moleculares têm sido desenvolvidos visando à identificação de cultivares de morangueiro (ALBANI; BATTEY; WILKINSON, 2004; FOLTA et al., 2005; KUNIHISA; FUKINO; MATSUMOTO, 2003). O primeiro caso importante de proteção de propriedade intelectual utilizou marcadores RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) para estabelecer um processo legal sobre a comercialização ilegal de uma variedade de morangueiro patentado (CONGIU, 2000).

No entanto, com o aumento da disponibilidade de bibliotecas genômicas e bancos de dados, marcadores do tipo microssatélites foram rapidamente desenvolvidos a partir de espécies silvestres e cultivadas e adotados para múltiplas aplicações (ASHMAN, 2003; DAVIS; DIMEGLIO, 2006; FOLTA et al., 2005).

Os marcadores microssatélites são sequências de DNA sujeitas a mutações, com repetições simples de di-, tri- ou tetranucleotídeos (WATSON et. al., 2006). Estes marcadores são os mais utilizados por apresentarem herança co-dominante combinada com níveis elevados de polimorfismos, sendo esta uma grande vantagem sobre outros marcadores, como RAPD e AFLP (*amplified fragmente length polimorphism*) (ASHMAN, 2003), os quais apresentam baixa reprodutibilidade e uma distribuição desigual em alguns genomas de plantas, respectivamente.

Em 2007, a Universidade da Califórnia desenvolveu um “Novo sistema para identificação de cultivares de morangueiro” desenvolvido pela FPS, Foundation Plant Services (Dangl et al., 2008). Esse sistema é baseado na análise de um grupo pré-definido de microssatélites. Os autores inicialmente testaram um grupo de 16 primers flanqueadores de microssatélites previamente publicados, e concluíram que todos os primers testados amplificaram fragmentos com consistência, produzindo picos de tamanhos variáveis em 45 cultivares e seleções estudadas. Devido à alta especificidade dos marcadores, este sistema é apurado e reprodutível entre laboratórios. Um eficiente sistema para identificação rotineira de cultivares de morangueiro, com padrões que sejam altamente variáveis dentro da população a ser testada. É interessante considerar o aspecto do nível de ploidia do morangueiro, octaploide, o que por vezes pode dificultar a interpretação dos dados obtidos.

Atualmente, existem 51 cultivares de morangueiro registradas no Brasil (Registro Nacional de Cultivares), porém muitas delas não mais cultivadas comercialmente. Existem, ainda, variedades locais e variedades silvestres que são cultivadas principalmente por pequenos agricultores, no qual estes genótipos possuem características de rusticidade e podem ser fontes de genes de características de interesse para o melhoramento genético. Para garantir a identificação rápida destas cultivares, o incremento de marcadores genéticos é de grande utilidade (GOVAN et al., 2008).

Como forma de preservação da diversidade e fomento para programas de melhoramento genético, Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) foram estabelecidos para várias espécies. O BAG de morangueiro mantido pela Embrapa Clima Temperado está vinculado ao programa de melhoramento genético de morangueiro da Embrapa Clima Temperado e possui as principais cultivares atualmente cultivada no Brasil, além de algumas variedades locais coletadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Estudos recentes no morango cultivado identificaram um conjunto de marcadores microssatélites que permitem a identificação de genótipos estreitamente relacionados (BRUNINGS et al., 2010; GOVAN et al., 2008; LEWERS; STYAN; HOKANSON, 2005). Sendo assim, neste trabalho, foi utilizado um conjunto de

marcadores microssatélites para realizar a caracterização de acessos de morangueiros provenientes do BAG mantido pela Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, com o objetivo de identificar os acessos no BAG mantido na Embrapa Clima Temperado, além de estimar a variabilidade genética e relações genéticas entre estes acessos.

4 Material e Métodos

4.1 Material vegetal e extração de DNA

O DNA foi extraído de folhas jovens, coletadas, identificadas e armazenadas a -80 °C, de acessos de *Fragaria x ananassa* provenientes do BAG da Embrapa Clima Temperado (Tabela 1). Para a extração de DNA genômico foi utilizado o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), sendo utilizadas 150 mg de tecido foliar. A integridade e concentração do DNA foram determinados por Fluorômetro (Qubit™, Invitrogen) e por eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 1 Código de identificação do BAG, denominação dos acessos, espécie, local/país de origem e Código de Registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

| Id. BAG | Nome | Espécie | Origem | R. MAPA |
|---------|------------------|----------------------|-----------------|---------|
| MOR1 | Albion | <i>F. x ananassa</i> | Califórnia | 22621 |
| MOR2 | Aromas | <i>F. x ananassa</i> | UC/USA | 11875 |
| MOR33 | Benícia | <i>F. x ananassa</i> | Bioagro | 30004 |
| MOR3 | Bürckley | <i>F. x ananassa</i> | Embrapa-CPACT | 02472 |
| MOR4 | Camarosa | <i>F. x ananassa</i> | UC/USA | 02066 |
| MOR5 | Camino Real | <i>F. x ananassa</i> | UC/USA | 18343 |
| MOR6 | Campidover | <i>F. x ananassa</i> | USA | S/R |
| MOR7 | IAC-2712 | <i>F. x ananassa</i> | IAC | 02060 |
| MOR32 | Ceará | <i>F. x ananassa</i> | Brasil | S/R |
| MOR8 | Diamante | <i>F. x ananassa</i> | UC/USA | 11877 |
| MOR9 | Dover | <i>F. x ananassa</i> | U. Florida/USA | 02061 |
| MOR10 | Florida Festival | <i>F. x ananassa</i> | U. Florida/USA | 21234 |
| MOR26 | IAC Guarani | <i>F. x ananassa</i> | IAC/Brasil | 02067 |
| MOR11 | Milse-tudla | <i>F. x ananassa</i> | Espanha | 04315 |
| MOR29 | Monterey | <i>F. x ananassa</i> | Califórnia/USA | 25909 |
| MOR21 | - | <i>F. x ananassa</i> | Variedade local | S/R |
| MOR12 | Oso Grande | <i>F. x ananassa</i> | UC/USA | 02063 |
| MOR31 | Palomar | <i>F. x ananassa</i> | Califórnia/USA | 25307 |
| MOR28 | Portola | <i>F. x ananassa</i> | Califórnia/USA | 25907 |
| MOR13 | Sabrosa | <i>F. x ananassa</i> | Espanha | 20580 |
| MOR30 | San Andreas | <i>F. x ananassa</i> | Califórnia/USA | 25908 |

Continuação Tabela 1

| | | | | |
|-------|---------------|----------------------|-----------------|-------|
| MOR14 | Santa Clara | <i>F. x ananassa</i> | Embrapa-CPACT | 02475 |
| MOR27 | - | <i>F. x ananassa</i> | Variedade local | S/R |
| MOR15 | Sweet Charlie | <i>F. x ananassa</i> | U. Florida/USA | 04314 |
| MOR16 | Toyonoka | <i>F. x ananassa</i> | Japão | 02064 |
| MOR17 | Ventana | <i>F. x ananassa</i> | UC/USA | 18342 |
| MOR18 | Vila Nova | <i>F. x ananassa</i> | Embrapa-CPACT | 02471 |
| MOR19 | - | <i>F. x ananassa</i> | Variedade local | S/R |
| MOR24 | - | <i>F. x ananassa</i> | Variedade local | S/R |

* S/R – sem registro no MAPA; R – registro; Id – identificação.

4.2 PCR e análise dos marcadores

Primeiramente, foi realizada a escolha dos marcadores microssatélites descritos anteriormente como os mais polimórficos e informativos na discriminação de acesos. Além destes, foram acrescentados três marcadores com alto grau de polimorfismo, listados na Tabela 2 (BRUNINGS et al., 2010; GOVAN et al., 2008; LEWERS; STYAN; HOKANSON, 2005).

As reações de PCR foram feitas com 20 ng de DNA, 0,1 µm de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,07 µm do *primer* universal M-13(-21) marcado com fluorescência FAM (6-carboxy-fluorescine), 1x GoTaq Green Master Mix (Promega) em um volume final de 10 µL.

A amplificação foi executada em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) da seguinte forma: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, anelamento de 54°C a 60°C por 45 segundos, de acordo com a temperatura ideal de cada *primer* (Tabela 2) e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos. Os *primers forward* estavam adaptados com uma cauda universal M-13(-21) (SCHUELKE, 2000).

Tabela 2 Denominação do marcador molecular; temperatura de anelamento em °C; e suas respectivas referências.

| Marcador | TA (°C) | Referência |
|----------|---------|-------------------------------|
| ARSFL09 | 55 | Lewers; Styan; Hokanson, 2005 |
| ARSFL11 | 60 | Govan et al. 2008 |
| ARSFL15 | 55 | Lewers; Styan; Hokanson, 2005 |

Continuação Tabela 2

| | | |
|----------|----|-------------------------------|
| ARSFL17 | 55 | Lewers; Styan; Hokanson, 2005 |
| CHFAM23 | 60 | Govan et al. 2008 |
| EMFN111 | 57 | Govan et al. 2008 |
| EMFN121 | 55 | Govan et al. 2008 |
| EMFN170 | 55 | Govan et al. 2008 |
| EMFN181 | 54 | Govan et al. 2008 |
| EMFN182 | 54 | Govan et al. 2008 |
| EMFV104 | 58 | Govan et al. 2008 |
| EMFVi136 | 55 | Govan et al. 2008 |
| EMFVi166 | 55 | Govan et al. 2008 |

As reações de amplificação via PCR foram diluídas com água ultrapura estéril para uma concentração desejável que permitisse uma clara visualização dos fragmentos amplificados, numa proporção de 1:10 a 1:40, de acordo com a intensidade de fluorescência de cada *primer*. Após ajustada a concentração ideal, 2 µL da diluição da reação de PCR e solução Blue Stop (LI-COR) numa proporção de 1:1 foram desnaturadas a 94 °C por 3 minutos. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6,5% (LI-COR), utilizando o sequenciador 4300 DNA Analyzer LI-COR, sendo carregados no gel 0,8 µL de cada reação e a corrida programada para um período de 1 hora e 30 minutos a 1500 V e 40 mA. O tamanho dos alelos foi dimensionado com o marcador de DNA de peso molecular de 50-350 pb IRDye 800 (LI-COR).

Os produtos de PCR foram analisados a partir de uma matriz binária, como “1” para presença e “0” para ausência de bandas.

4.3 Análise da variabilidade genética e estrutura de população

Para avaliar as informações obtidas a partir dos 13 locos estudados, foram calculados os seguintes parâmetros: número de alelos por indivíduo (N_i), número total de alelos (N_A), heterozigosidade esperada (HZ) identificada de acordo com a fórmula:

$$HZ_i = 1 - (P_{ip}^2 + P_{ia}^2)$$

onde P_{ip} e P_{ia} são a frequência de presença e ausência de banda (ISOBE et al., 2013). Além disso, foi calculado o R_p , poder de resolução do *primer*, dado pela fórmula:

$$R_p = \sum I_b, \text{ onde } I_b = 1 - (2x|0,5 - p|)$$

e p é a proporção dos genótipos que contém a banda I. Este índice possui uma forte correlação com a capacidade de distinguir entre genótipos (DEBNATH et al., 2008).

Para designar o número de genótipos únicos determinados por marcador, foi utilizado procedimento Multilocus/Matches no *software* GenAlEx v. 6.5 (PEAKEL; SMOUSE, 2012).

A partir da matriz binária de presença e ausência de bandas, foi estimada a similaridade genética entre genótipos de acordo com coeficiente de similaridade de Jaccard. Foi construído um dendrograma utilizando o método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*). O ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) (SOKAL; ROHLF, 1962). Essas análises foram realizadas com o auxílio do *software* NTSYSpc 2.1 (ROHLF, 2005).

A estrutura genética foi determinada por meio de análise Bayesiana utilizando o *software* STRUCTURE versão 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000). Esta análise utiliza um método de agrupamento que identifica K grupos de genótipos com frequências alélicas distintas. O programa foi executado com uma predefinição de número de grupos (K) variando de 1 a 10 e vinte simulações independentes para cada K, usando o modelo de ancestralidade comum (*Admixture Model*).

Cada simulação teve um período de *burn-in* de 10.000 e posteriormente 100.000 iterações. Utilizou-se a estatística ΔK (em que K especifica o número mais provável de subgrupos), com base na taxa de variação da probabilidade *log* dos dados (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) para selecionar o número correto de agrupamentos (K).

A partição hierárquica da variação genética entre populações foi estabelecida pela análise molecular da variância (AMOVA) das subpopulações identificadas com o STRUCTURE. A AMOVA foi calculada usando o GenAlEx 6.5 (PEAKEL; SMOUSE, 2012) com 999 permutações para testar a significância.

5 Resultados e discussão

5.1 Análise da variabilidade genética

Todos os 13 locos SSR utilizados neste estudo foram polimórficos e amplificaram entre 1 a 3 alelos para o ARSFL17, e, como mostra a Figura 1, para o EMFVi136, 2 a 8 alelos por indivíduo (N_A). Considerando todos os acessos, foi encontrada uma média de 6,8 alelos por loco com um total de 115 alelos (N_I) (Tabela 3).

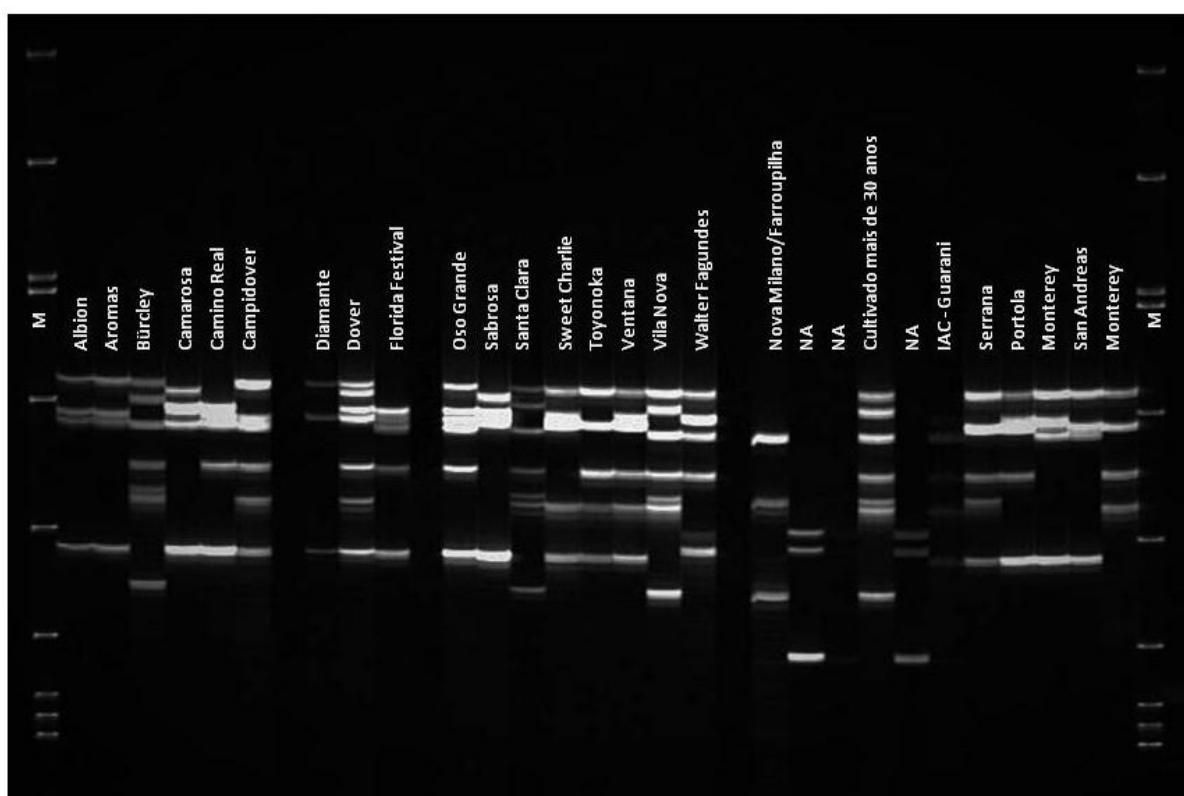


Figura 1 Polimorfismo de 25 genótipos de morangueiro do BAG da Embrapa para o marcador EMFVi136.

Em espécies poliploides, a frequência alélica não pode ser calculada diretamente, mesmo com marcadores co-dominantes como os microssatélites. Sendo assim, os parâmetros analisados, podemos observar que o valor da heterozigosidade esperada (HZ) variou de 0,25 a 0,40 para o marcador EMFVi166 para o ARSFL09, respectivamente. O valor médio da HZ foi de 0,34. A habilidade

dos marcadores em diferenciar os genótipos de morangueiro foi acessada através do valor de R_P . Os valores de R_P para o marcador EMFvi166 foi de 1,57 até 7,14 para o marcador CHFAM23 (Tabela 3).

O marcador com o mais alto R_P , CHFAM23, separou o maior número de genótipos, sendo possível diferenciar 21 genótipos. Em seguida, os marcadores EMFVi136 e o EMFN170 identificaram 18 genótipos cada um. Os marcadores menos eficientes para a distinção de genótipos foram o EMFVi166 (distinguiu apenas três genótipos) e ARSFL17 (distinguiu quatro genótipos) (Tabela 3), nos quais apresentaram os menores valores de R_P .

Tabela 3 Heterozigosidade esperada (HZ); poder de resolução dos marcadores (R_P); N_i : número de alelos por indivíduo N_A : número total de alelos; e número de genótipos únicos determinados por marcador, nos 29 acessos de morangueiro analisados com 13 locos de microssatélites.

| Marcador | H _Z | R _P | N _i | N _A | Número de genótipos únicos determinados |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|
| ARSFL09 | 0,40 | 4,88 | 8 | 2-5 | 14 |
| ARSFL11 | 0,36 | 4,28 | 8 | 2-6 | 12 |
| ARSFL15 | 0,37 | 5,07 | 9 | 2-5 | 11 |
| ARSFL17 | 0,28 | 2,07 | 5 | 1-3 | 4 |
| CHFAM23 | 0,38 | 7,14 | 12 | 3-8 | 21 |
| EMFN111 | 0,34 | 4,07 | 7 | 2-7 | 9 |
| EMFN121 | 0,33 | 3,71 | 8 | 2-5 | 8 |
| EMFN170 | 0,34 | 6,57 | 12 | 2-4 | 18 |
| EMFN181 | 0,34 | 5,14 | 10 | 4-7 | 15 |
| EMFN182 | 0,33 | 4,80 | 9 | 2-7 | 9 |
| EMFV104 | 0,33 | 5,78 | 11 | 1-5 | 16 |
| EMFVi136 | 0,36 | 6,71 | 12 | 2-8 | 18 |
| EMFVi166 | 0,25 | 1,57 | 4 | 1-3 | 3 |
| Média | 0,34 | 4,75 | 6,8 | | |
| Total | | | 115 | | |

Com a combinação de dois marcadores (CHFAM23 e EMFN170), o número máximo de indivíduos identificados foi 26. Com a adição de mais um marcador foi possível distinguir os 29 acessos de morangueiro presentes atualmente no BAG, sendo possível determinar os marcadores CHFAM23, EMFN170 e EMFN182 como a combinação de três marcadores mais eficiente para distinção entre os genótipos (Tabela 4). A combinação dos marcadores CHFAM23, EMFN170 e EMFVi136, por sua vez, distinguiu 26 dos 29 genótipos.

Tabela 4 Combinações de marcadores para a distinção entre genótipos.

| Combinações de marcadores | | | Nº de genótipos únicos determinados |
|---------------------------|------------|------------|-------------------------------------|
| Marcador 1 | Marcador 2 | Marcador 3 | |
| CHFAM23 | EMFN182 | - | 25 |
| CHFAM23 | EMFVi136 | - | 25 |
| CHFAM23 | EMFN170 | - | 26 |
| CHFAM23 | EMFN170 | EMFVi136 | 26 |
| CHFAM23 | EMFN170 | EMFN182 | 29 |

5.2 Relações genéticas e estrutura de população

As relações genéticas entre os acessos de morangueiro do BAG da Embrapa podem ser visualizadas na Figura 2. O valor do coeficiente de correlação cofenético foi alto (0,91) indicando um bom ajuste da figura com os valores de similaridade genética e a similaridade média obtida entre os genótipos foi de 41%. Não foi possível verificar uma separação clara entre subgrupos, nem mesmo entre acessos com origens geográficas semelhantes. De acordo com a matriz de similaridade (dados não apresentados), a menor similaridade foi de 0,19 entre os genótipos 'Walter Fagundes' e 'Bürckley', e a maior, 0,95, entre as cultivares 'Santa Clara' e o acesso MOR24. Todos os 29 genótipos de *F. ananassa* foram avaliados quanto à estratificação da população. Os dados foram analisados sucessivamente, aumentando o número de subpopulações (K) de 1 a 10. O valor de K que melhor representou o conjunto de genótipos analisados, baseado na estatística do ΔK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) foi quando K=2 (Figura 2).

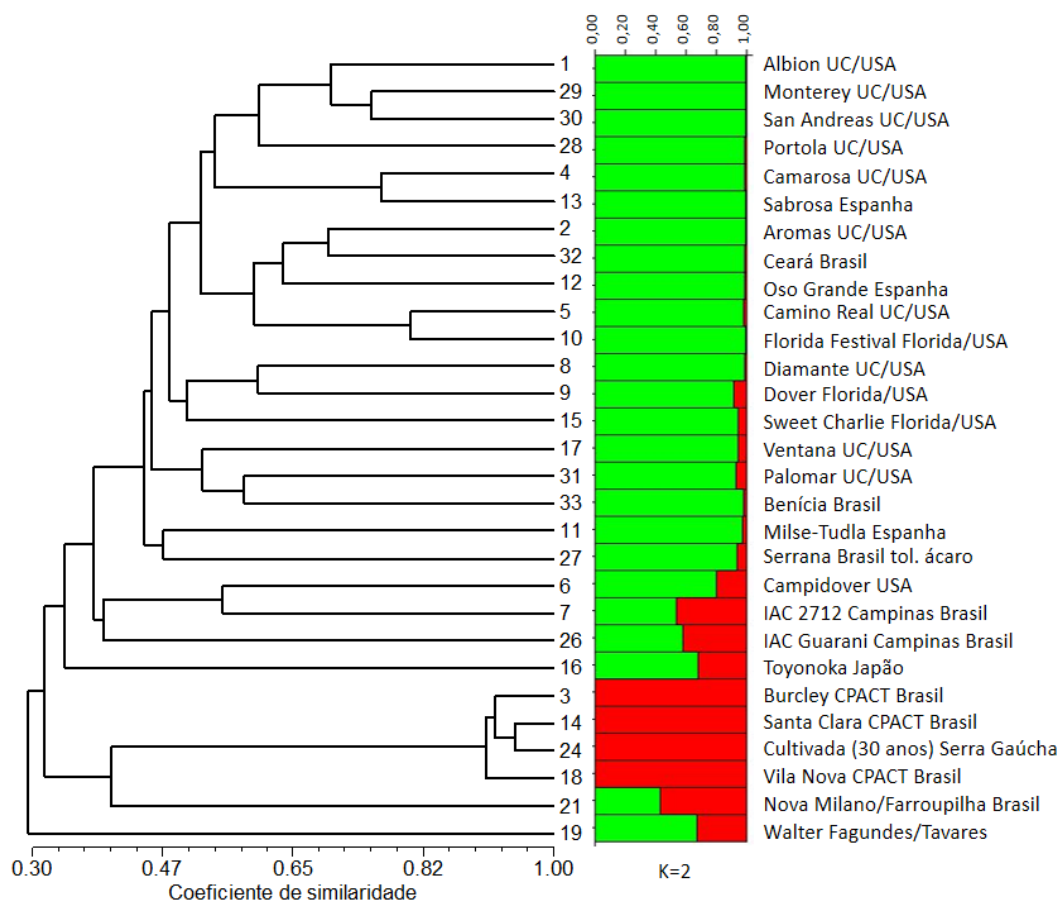


Figura 2 Variabilidade genética e estrutura populacional em 29 genótipos de *Fragaria x ananassa* com base em 13 locos SSR. Dendrograma obtido através da análise de agrupamento UPGMA (a) e estratificação da população com K=2. Cada cor representa uma diferente subpopulação (b).

Um acesso foi considerado como pertencente a um subgrupo quanto o seu coeficiente de adesão era maior do que 0,90. Deste modo, quatro acessos ficaram dentro de um subgrupo (Bürckley, Santa Clara, Vila Nova e o acesso MOR24), seis acessos apresentaram proporção de mistura entre os grupos (Campidover, IAC 2712, IAC Guarani, Toyonoka e os acessos MOR21 e MOR19) e os demais 19 acessos formaram outro subgrupo genético, englobando cultivares americanas, espanholas e algumas brasileiras.

Podemos observar duas populações bem formadas na Figura 2. No entanto, três cultivares lançadas pela Embrapa, 'Santa Clara', 'Bürckley' e 'Vila Nova', e o acesso MOR24, formaram um grupo com alta similaridade genética. Uma das formas de aumentar a variabilidade genética seria cruzamentos com genótipos contrastantes para características de interesse, como produtividade, vigor e sabor e cor da polpa, entre outros, com finalidade de aumentar o *pool* gênico dos acessos para obtenção de novas cultivares (BONOW; OLIVEIRA, 2012).

A análise molecular da variância (AMOVA) foi feita baseada no modelo de estrutura genética de k=2. Assim, verificou-se que 64% da variabilidade genética

está dentro dos subgrupos, indicando que a grande maioria da variabilidade genética é devido as diferenças entre indivíduos. No entanto, uma parcela considerável da variabilidade genética pode ser atribuída a variabilidade entre subgrupos (36%).

Tabela 5 Distribuição da variabilidade genética entre e dentro de grupos de F. x ananassa formados pelo STRUCTURE: dois grupos puros e demais genótipos com proporção de mistura acima de 90%, baseado em 29 acessos e 13 marcadores microssatélites.

| Fonte de variação | GL | SQ | Componentes da variância | Porcentagem % |
|-------------------|----|---------|--------------------------|---------------|
| Entre grupos | 2 | 166.384 | 9,101 | 36* |
| Dentro de grupos | 26 | 416.881 | 16,034 | 64* |
| Total | 28 | 583.265 | 25,135 | 100 |

*Valores significativos ao nível de 1% de probabilidade.

Em trabalhos anteriores (BRUNINGS et al., 2010; GOVAN et al., 2008; SARGENT et al., 2004), foram estabelecidos conjuntos de marcadores moleculares capazes de diferenciar acessos de morangueiro. Esses recursos são extremamente importantes não apenas para genotipar plantas em uma coleção, mas eles possuem potencial para acessar a variabilidade genética, assim como a identificação de cultivares em pouco tempo.

O presente trabalho levou em consideração os estudos de Govan (2008), Brunings (2010) e Lewers (2005) e testou a sua aplicação no BAG da Embrapa Clima Temperado. Os marcadores utilizados apresentaram altos níveis de polimorfismo, sendo possível diferenciar os 29 acessos do BAG da Embrapa com apenas três marcadores.

Caso surjam novos acessos no BAG, seria realizado teste inicial com o conjunto de três *primers* estabelecidos aqui, e considerados os mais polimórficos para estes genótipos.

7 Conclusão e perspectivas

Os resultados aqui apresentados demonstram a eficiência de SSRs na identificação de genótipos de morangueiro. O banco ativo de germoplasma da

Embrapa possui desde cultivares registradas até variedades locais, cultivadas em pequena escala por produtores rurais. Foi possível, neste estudo, acessar a variabilidade e as relações genéticas entre os acessos do BAG. As cultivares lançadas pela Embrapa na década de 70, por exemplo, compartilham grande parte do seu *pool* gênico, demonstrando a necessidade de inclusão de novos acessos que possam aumentar a base genética existente no BAG.

Os SSR relatados aqui são eficazes em discriminar cultivares de morangueiros registrados no Brasil (Ministério da Agricultura - Registro Nacional de Cultivares) em diferentes pontos-chave no processo de comercialização. Quando utilizados em conjunto, foi possível observar a alta eficiência e reprodutibilidade da técnica. Essas informações irão permitir o desenvolvimento de um banco de dados do *fingerprint* das principais cultivares existentes no BAG (Embrapa), sendo estas de grande importância econômica no Brasil, sendo útil para a comunidade de pesquisa tanto quanto para os produtores de morango. Com a indústria do morango em ascensão, os produtores estão se tornando cada vez mais dependentes de cultivares específicas para cada região. Portanto, é essencial que os genótipos corretos sejam fornecidos, pois pode acarretar em grandes perdas financeiras para os produtores, assim como para a indústria.

Com a fenotipagem é possível uma discriminação de cultivares apenas após o florescimento, e os SSRs mostraram-se uma ferramenta conveniente, com alta eficácia e reprodutibilidade para o auxílio da correta identificação de cultivares, sendo importante a identificação em qualquer estágio de florescimento.

8 Referências bibliográficas

ALBANI, M. C.; BATTEY, N. H.; WILKINSON, M. J. The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 109, n. 3, p. 571–579, ago. 2004.

ASHMAN, T. L. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). p. 1201–1207, 2003.

BONOW, S.; OLIVEIRA, A. C. B. Marcadores moleculares em morangueiro. Pelotas: Embrapa /clima Temperado, 2012. 22 p.

BRUNINGS, A. M. et al. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. **Euphytica**, v. 173, n. 1, p. 63–75, 12 jan. 2010.

CARRASCO, B. et al. The Chilean Strawberry [*Fragaria chiloensis* (L .) Duch .]: Genetic Diversity and Structure. v. 132, n. 4, p. 501–506, 2007.

CONGIU, L. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties : a forensic. p. 229–232, 2000.

DAVIS, T. M.; DIMEGLIO, L. M. Assessment of SSR Marker Transfer from the Cultivated Strawberry to Diploid Strawberry Species : Functionality , Linkage Group Assignment , and Use in Diversity Analysis. v. 131, n. 4, p. 506–512, 2006.

DEBNATH, S. C. et al. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 88, n. 2, p. 313–322, 2008.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–20, jul. 2005.

FAO. Food and Agriculture. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 10 de nov. 2014.

FOLTA, K. et al. Expressed sequence tags (ESTs) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). **BMC Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. 12, jan. 2005.

GOVAN, C. L. et al. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. x ananassa* cultivars. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 4, p. 649–661, 17 jul. 2008.

HONJO, M. et al. Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. **Breeding Science**, v. 61, n. 4, p. 420–425, dez. 2011.

HUMMER, K. E.; HANCOCK, J. Strawberry Genomics: Botanical History, Cultivation, Traditional Breeding, and New Technologies. **Plant Genetics and Genomics: Crops and Models**, p. 413-435, 2009.

ISOBE, S. A. N. et al. Construction of an Integrated High Density Simple Sequence Repeat Linkage Map in Cultivated Strawberry (*Fragaria* 3 *ananassa*) and its Applicability. n. December 2012, p. 79–92, 2013.

KELLERHALS, M. Genetics and Genomics of Rosaceae. **Genomics**, p. 73–84, 2009.

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

KUNIHISA, M.; SCIENCE, T. Studies Using DNA Markers in *Fragaria × ananassa*: Genetic Analysis, Genome Structure, and Cultivar Identification. v. 80, n. 3, p. 231–243, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. Genealex 6: Genetic analysis in Excel. Population Genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 288-295, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHEN, P.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

RCN. Registro Nacional de Cultivares. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registo-nacional-cultivares>>. Acesso em: 8 nov. 2014.

LEWERS, K. S.; HOKANSON, S. C.; BASSIL, N. V. Strawberry GenBank-derived and Genomic Simple Sequence Repeat (SSR) Markers and Their Utility with Strawberry, Blackberry, and Red and Black. v. 130, n. 1, p. 102–115, 2005.

ROUSSEAU-GUEUTIN, M. et al. Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. **Genetics**, v. 179, n. 4, p. 2045–60, ago. 2008.

SARGENT, D. J. et al. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 109, n. 7, p. 1385–91, nov. 2004.

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

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments: A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. v. 18, n. February, p. 1–2, 2000.

WATSON, James D.; BAKER, Tania A.; BELL, Stephen P.; GANN, Alexandre; LEVINE, Michael; LOSOCK, Richard. **Biologia molecular do gene**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 760 p.

WHITAKER, V. M. Applications of molecular markers in strawberry. v. 1, p. 115–127, 2011.