

Documentos

ISSN 1516-8840
Dezembro, 2012

379

Marcadores Moleculares em Morangueiro



ISSN 1516-8840

Dezembro, 2012

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Clima Temperado

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documento 379

Marcadores Moleculares em Morangueiro

Sandro Bonow

Ana Claudia Barneche de Oliveira

Embrapa Clima Temperado

Pelotas, RS

2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221
Home Page: www.cpact.embrapa.br
e-mail: cpact.sac@embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Verneti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Eduardo Freitas de Souza
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica: Antônio Wiener Reisser (estagiário)
Fotos: Roberto Pedroso de Oliveira

1ª edição

1ª impressão (2012): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

Bonow, Sandro.

Marcadores moleculares em morangueiro/Sandro Bonow e
Ana Claudia Barneche de Oliveira.-- Pelotas: Embrapa Clima
Temperado, 2013.

33p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos,379).

ISSN 1516-8840 - CGPE 11159

1. Morango–Melhoramento genético – Marcadores moleculares– Diversidade genética– Identificação de cultivar. I. Oliveira, Ana Claudia Barneche de.II. Série.

Autores

Sandro Bonow

Eng.-agrôn., D.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, sandro.bonow@embrapa.br.

Ana Claudia Barneche de Oliveira

Eng.-agrôn., D.Sc. em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, ana.barneche@embrapa.br.

Apresentação

Os programas de melhoramento genético de morangueiro, no mundo, estimados em mais de 100, procuram de uma forma geral reunir em um mesmo genótipo o máximo possível de características desejáveis, como por exemplo sabor, textura, aumento do período de colheita e aumento do período de prateleira do fruto, além de resistência da planta aos estresses bióticos e abióticos.

Para que os objetivos desses programas de melhoramento sejam alcançados, são utilizados todos os conhecimentos técnicos e ferramentas de pesquisa disponíveis. Entre essas ferramentas é crescente a utilização dos marcadores moleculares.

Nas pesquisas com morangueiro os marcadores moleculares têm sido empregados em estudos com distintos objetivos, como aqueles visando à análise da diversidade genética, a identificação de cultivares, o mapeamento gênico e a seleção assistida por marcadores moleculares.

Considerando-se esse cenário, a Embrapa Clima Temperado disponibiliza o presente documento com o objetivo de divulgar o estado da arte do uso de marcadores moleculares na cultura do morangueiro.

Clenio Nailto Pillon
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

1. Introdução
2. Principais classes de marcadores moleculares utilizadas em morango
3. Principais aplicações dos marcadores moleculares em morango
 - 3.1. Diversidade Genética
 - 3.2. Identificação de cultivares
 - 3.3. Mapas genéticos/sequenciamento
 - 3.4. Seleção assistida por marcadores moleculares
4. Considerações finais
5. Referências

Marcadores Moleculares em Morangueiro

Sandro Bonow

Ana Cláudia Barneche de Oliveira

1. Introdução

O morangueiro pertence ao gênero *Fragaria*, família *Rosaceae*, sendo conhecidas 24 espécies, dessas, 12 são diploides ($2n = 6x = 42$), 5 tetraploides ($2n = 4x = 28$), 1 hexaploide ($2n = 6x = 42$), 2 octoploides ($2n = 8x = 56$), 1 decaploide e há 3 espécies híbridas. A espécie *Fragaria x ananassa*, octoploide, é a mundialmente cultivada, sendo originária de um híbrido entre *F. Chiloensis* e *F. virginiana* (NJUGUNA, 2010).

Os principais países produtores de morango são Estados Unidos, Turquia, Espanha, México, Coreia, Egito e Polônia (FAOSTAT, 2011). No Brasil, a produção atingiu, em 2008, em torno de 105 mil toneladas, destacando-se como principais produtores Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná (AGRIANUAL, 2009).

No mundo, são estimados que existam mais de 100 programas de melhoramento genético de morangueiro, os quais procuram, entre outras características, cultivares superiores em sabor e textura, que sejam resistentes aos principais estresses bióticos e abióticos, que permitam o aumento do período de

colheita, e que proporcionem maior período de prateleira pós-colheita (FAEDI et al., 1999). Para que esses objetivos possam ser alcançados, os programas de melhoramento genético têm utilizado todo germoplasma e conhecimento disponíveis. Nesse contexto as pesquisas com morangueiro têm sido beneficiadas pela utilização das ferramentas biotecnológicas, entre as quais destacam-se os marcadores moleculares.

Principais classes de marcadores moleculares utilizadas em morangueiro

Várias classes de marcadores moleculares têm sido utilizadas em estudos envolvendo morangueiro. Entre elas destacamos RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e microssatélites (*SSR – Simple Sequence Repeat*).

Os marcadores RAPDs são de rápida detecção e como grande vantagem não exigem conhecimento prévio das sequências para a síntese dos *primers* (sequências flanqueadoras à região alvo a ser amplificada). Em morangueiro foram utilizados principalmente para as análises envolvendo taxonomia e diversidade genética (GIDONI et al., 1994; HANCOCK et al. 1994; LEVI; ROWLAND, 1997). Nesses estudos, em sua maioria, esses marcadores mostraram-se eficientes para a caracterização das cultivares. Apesar disso, seu uso, atualmente, é muito raro, pois apresentam como principal desvantagem os baixos níveis de reprodutibilidade dentro e entre

laboratórios, o que causa dificuldade de comparação de resultados gerados por diferentes laboratórios. Além disso, são marcadores dominantes e não *locus* específico, o que reduz a utilidade para a caracterização e identificação de cultivares (GARCIA et al., 2002).

Outros marcadores utilizados com destaque são os denominados AFLP. Esse tipo de marcador caracteriza-se por ser um marcador dominante, exigir DNA com alta pureza e ser altamente reprodutível entre laboratórios (JONES et al., 1997), além disso, não necessita de conhecimento prévio de sequências genômicas para a construção de *primers*. Potencialmente apresenta um grande número de bandas polimórficas, sendo muito informativo. O primeiro artigo publicado com AFLP em morangueiro foi realizado por Degani et al. (2001), os quais compararam as relações genéticas baseadas no pedigree, dados de RAPD e dados de AFLP de 19 genótipos. Após este, outros estudos foram realizados, como por exemplo o conduzido por Tyrka et al. (2002). Segundo Njuguna (2010), embora vários avanços tenham ocorrido na técnica de AFLP nos últimos anos, essa técnica tem sido menos utilizada do que RAPD e microssatélites na identificação de cultivares e na análise de diversidade genética em germoplasma de morangueiro.

Atualmente, os microssatélites (SSR) têm sido amplamente utilizados para estudos com morangueiro. Inicialmente os microssatélites possuíam uma grande limitação, que era a exigência da disponibilidade de *primers*, os quais necessitavam ser desenvolvidos por meio da construção de bibliotecas genômicas. Hoje, essa limitação foi superada com um grande número de *primers* para marcadores microssatélites disponíveis

em morangueiro, o que ocorreu devido à construção de várias bibliotecas genômicas (ASHLEY et al. 2003; CIPRIANI; TESTOLIN, 2004; HADONOU et al. 2004; LEWERS et al. 2005; MONFORT et al. 2006; SARGENT et al. 2003). Outra fonte de sequências de *primers* foi o desenvolvimento de estudos de transferabilidade de marcadores a partir daqueles desenvolvidos em espécies ou gêneros relacionados. Como exemplo, citamos os relatos de Gasic et al. (2009), Park et al. (2010) e Mneja et al. (2010). Além disso, alguns relatos como o de Gil-Ariza et al. (2006) mostram o uso de microssatélites em regiões expressas (EST – *Expressed Sequence Tags*), os denominados EST-SSR. No estudo os autores utilizaram dez EST-SSR derivados de *Fragaria x ananassa*. Estes marcadores mostraram altos níveis de polimorfismo dentro de cultivares de morangueiro e entre espécies de *Fragaria*, indicando o potencial para estudos genéticos não somente em morangueiro, mas também em outras espécies dentro do gênero.

Outra classe de marcadores para os quais são encontrados relatos em morangueiro são os ISSR, com trabalhos visando à análise da diversidade genética (CARRASCO et al., 2007; DEBNATH et al., 2008; MORALES, 2010).

Principais aplicações dos marcadores moleculares em morangueiro

Em morangueiro os principais estudos com marcadores moleculares concentram-se na análise da diversidade genética, na

identificação de cultivares, na construção de mapas genéticos e na seleção assistida por marcadores moleculares.

A) **Diversidade genética**

Uma das principais aplicações dos marcadores moleculares em morangueiro tem sido a análise da diversidade genética. A caracterização de germoplasma utilizando marcadores moleculares tem proporcionado o aumento do conhecimento sobre populações naturais, principalmente de *F. Chiloensis* e *F. virginiana*, considerados como parte do *pool* gênico primário da cultura e conseqüentemente importantes para uso facilitado em programas de melhoramento genético. Carrasco et al. (2007) utilizaram marcadores ISSR para acessar a diversidade genética de 216 acessos de *F. chiloensis*. Os resultados mostraram alta diversidade genética no nível de espécie. O mesmo tipo de marcador, ISSR, foi utilizado por Debnath et al. (2008) para estimar a diversidade genética de cultivares de morangueiro e linhas melhoradas em programa de melhoramento no Canadá.

Muitos desses estudos mostraram que, quando comparados com germoplasma utilizado dentro dos programas de melhoramento genético, acessos silvestres são uma potencial fonte de variabilidade genética. Exemplo disso foi o estudo conduzido por Becerra et al. 2005, que analisaram, utilizando marcadores AFLP, a diversidade genética de 61 genótipos representando as regiões geográficas e as regiões climáticas nas quais o morangueiro foi encontrado no Chile. Entre os acessos de *F. Chiloensis* foi observada uma alta variabilidade, sendo esta largamente distribuída geograficamente,

indicando uma importante fonte de variabilidade genética aos melhoristas.

Nos últimos anos vários trabalhos foram conduzidos visando também à análise da diversidade genética em genótipos cultivados. Radmann et al. (2006), utilizando RAPD, avaliaram a diversidade genética de dez cultivares de morangueiro plantadas no Brasil. Foram analisados 26 *primers* que separaram as cultivares em dois grupos baseados na similaridade genética. Um grupo com as cultivares destinadas à industrialização e outro com as cultivares destinadas ao mercado in natura.

Morales (2010) avaliou, por meio de marcadores moleculares RAPD e marcadores ISSR, a divergência genética de 11 cultivares de morangueiro cultivadas no Brasil. A análise dos dados gerados a partir da análise de marcadores RAPD separou as cultivares em três grupos enquanto os marcadores ISSR separaram em dois grupos, não existindo relação direta na comparação entre os dois grupos. Segundo os autores o agrupamento gerado pelo método ISSR foi mais coerente com a origem e a genealogia das cultivares do que aquele proposto pelo método RAPD, podendo ser considerado mais eficiente no estudo da divergência genética do morangueiro.

Além dos trabalhos citados acima, existe uma série de outros relatos de estudos visando à análise da diversidade genética na literatura mundial, entre os quais destacamos aqueles realizados por Sjulín e Dale (1987), Harrison et al. (1997), Porebski e Catling (1998) e Milella et al. (2006).

Com a evolução dos programas de melhoramento é esperada a redução na diversidade genética, especialmente dentro de uma cultura recentemente domesticada. Desta maneira

é importante permanecer alerta, realizar o monitoramento da diversidade do germoplasma dos programas de melhoramento e ter o conhecimento da diversidade genética disponível visando assegurar a introdução de novos alelos sempre que for considerado necessário (WHITAKER, 2011).

B) Identificação de cultivares

Novas plantas são clonalmente propagadas para a produção de mudas. No processo de propagação a manutenção da integridade genética é crítica, pois produtores de mudas e produtores de frutos compram determinada variedade com a expectativa de cultivar um genótipo com potenciais e limitações conhecidas. Características como tempo para florescimento e colheita, qualidade do fruto e suscetibilidade a doenças estão entre as principais que levam o produtor à escolha de uma determinada cultivar em detrimento de outra.

As cultivares de morangueiro atualmente plantadas apresentam uma estreita base genética, tendo aproximadamente 50 genótipos como base (DALE; SJULIN, 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. Segundo Brunings et al. (2010), em 2007, foi relatado no Sudeste dos Estados Unidos um erro que levou à entrega de plantas identificadas incorretamente, acarretando

substanciais perdas para o produtor. Assim, é muito importante a disponibilidade de um método eficiente de identificação de cultivares de morangueiro. Nesse contexto, a identificação de cultivares por meio de marcadores moleculares tem sido eficiente.

Várias classes de marcadores, RAPD, AFLP, ISSR e microssatélites, foram utilizadas na identificação de cultivares. Congiu et al. (2000) utilizaram marcadores RAPD para a identificação de cultivares de morangueiro, sendo que as evidências obtidas foram aceitas em um processo judicial envolvendo a utilização de uma variedade patenteada de forma indevida. Ainda com RAPD ressaltamos os relatos de Gidoni et al. (1994) e Kuras et al. (2004). Utilizando ISSR destacamos o trabalho realizado por Arnau et al. (2002) e com AFLP por Tyrka et al. (2002).

Apesar dos casos relatados acima confirmando a utilidade de várias classes de marcadores, a abundância de *primers* disponíveis, a variabilidade alélica e o caráter codominante têm tornado os microssatélites os marcadores preferenciais para estudos de identificação de cultivares.

Assim, com o grande número de marcadores moleculares disponíveis para uso em morangueiro, segundo Whitaker (2011), o próximo passo seria naturalmente a identificação de um pequeno grupo de marcadores que sejam altamente reprodutíveis entre laboratórios. Govan et al. 2008 encontraram dez *primers* flanqueadores a regiões microssatélites altamente polimórficas. Esses marcadores foram utilizados na caracterização de 60 genótipos de morangueiro e foram capazes de distinguir todos os genótipos analisados, incluindo cultivares oriundas dos mesmos

parentais. Os autores ainda relatam que os referidos *primers* foram combinados em três reações multiplex e representam uma alternativa de identificação de cultivares que pode ser utilizada, assim como os resultados podem ser comparados entre laboratórios.

O mesmo grupo de *primers* recomendados por Govan et al. (2008) foi estudado por Brunings et al. (2010). Esses autores empregaram nove *primers* microsatélites para a caracterização de importantes cultivares plantadas na Flórida, Estados Unidos, além de seleções avançadas do programa de melhoramento de morangueiro da Universidade da Flórida, e assim determinar a utilidade desse grupo de *primers* em uma população distinta da inicialmente utilizada. Foi possível a identificação/individualização de todas as cultivares estudadas. Esse resultado mostra a potencialidade da utilização dos marcadores moleculares, particularmente os microsatélites, na identificação de cultivares de morangueiro.

Também com foco nesse cenário, a Universidade da Califórnia desenvolveu, em 2007, o que denominou de “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 microsatélites. Os autores inicialmente testaram um grupo de 16 *primers* flanqueadores de microsatélites previamente publicados, e concluíram que todos os *primers* testados amplificaram fragmentos com consistência, produzindo picos de tamanhos variáveis em 45 cultivares e seleções

estudadas. Destaca-se que um único *primer* encontrou 29 perfis únicos nos 45 genótipos testados. Todas as cultivares puderam ser individualizadas facilmente com o uso de outros três *primers*. O sistema proposto analisou os fragmentos como marcadores dominantes. Devido à alta especificidade dos marcadores, este sistema é apurado e reprodutível entre laboratórios. Um eficiente sistema para identificação rotineira de cultivares de morangueiro necessita de um protocolo uniforme que produza consistentes picos, com padrões que sejam altamente variáveis dentro da população a ser testada. É interessante considerar o aspecto do nível de ploidia do morangueiro, octoploide, o que por vezes pode dificultar a interpretação dos dados obtidos.

Atualmente, o FPS possui um banco de dados com padrões moleculares (*fingerprinting*) de mais de 40 cultivares, sendo essa ferramenta usada rotineiramente como medida de controle de qualidade (IMPACT...). Esse serviço de identificação de cultivares de morangueiro é oferecido pelo FPS para produtores, melhoristas, indústria e outros interessados. Apesar de esse teste ser poderoso para essa finalidade, apresenta algumas limitações. A identificação da variedade não pode ser realizada se o padrão molecular encontrado na amostra não for compatível com o banco de dados disponível. A tecnologia não identifica variantes dentro de uma cultivar, principalmente oriundos de variação somaclonal.

Ressalta-se que os microssatélites são especialmente úteis na análise de cultivares de morangueiro devido à espécie possuir um genoma octoploide (ASHLEY et al.; 2003).

C) Mapas genéticos/sequenciamento

Em morangueiro o primeiro mapa genético foi construído com diploides, utilizando-se uma população F_2 oriunda de um cruzamento entre acessos de *F. vesca*, sendo empregados marcadores RAPD (DAVIS; YU, 1997). Para octoploides, utilizando-se germoplasma cultivado, o primeiro mapa genético foi construído por meio de marcadores AFLP (LERCETEAU-KPHLER et al., 2003). Após, em 2004, foi construído um mapa com auxílio utilizando marcadores microssatélites. Nesse último, foram mapeados inicialmente 68 microssatélites e 6 marcadores de genes específicos em uma população de 94 *seedlings* obtidos a partir de um cruzamento interespecífico entre diploides *F. vesca* x *F. bucharica* L. (FV x FB). Esse é, atualmente, o mapa de referência em morangueiro. Novos microssatélites, desenvolvidos em estudos recentes (BASSIL et al. 2006; LEWERS et al. 2005; MONFORT et al. 2006), foram agregados a esse mapa de referência proposto por Sargent et al. (2004), aumentando a sua densidade de marcadores. O mapa de referência (FV x FB) tem sido utilizado em vários estudos como os de Nier et al. (2006) e Sargent et al. (2009). Atualmente o mapa possui 296 marcadores, sendo 270 microssatélites e 22 marcadores gene-específico (WHITAKER, 2011). Esse mapa é uma importante fonte de informação para vários estudos utilizando marcadores moleculares.

Quanto ao sequenciamento do genoma do morangueiro, o mesmo foi publicado em 2010 (SHULAEV et al., 2010). Foi sequenciado o genoma diplóide de *F. vesca* e foram identificados

preliminarmente 34.809 genes. As informações oriundas do sequenciamento encontram-se disponíveis em <http://www.strawberrygenome.org/>.

D) **Seleção assistida por marcadores moleculares**

Vários estudos têm sido conduzidos visando à identificação de marcadores moleculares ligados a características de interesse em morangueiro. Dentro desses estudos, grande atenção tem sido concentrada na busca de marcadores associados à resistência a doenças. Exemplo disso são os estudos conduzidos por Haymes et al. (1997), Haymes et al. (2000) e Van de Weg (1997), os quais encontraram marcadores moleculares associados a regiões genômicas envolvidas com a resistência a *Phytophthora fragariae*. Na mesma linha, outros estudos (DENOYES-ROTHAN et al., 2005; LERCETEAU-KOHLER et al., 2005) identificaram marcadores associados à resistência a *Colletotrichum acutatum*, causador da antracnose.

Sensibilidade ao fotoperíodo foi outra característica de interesse estudada e para a qual foram identificados marcadores associados. Estudos com esse objetivo foram conduzidos por Albani et al. (2004), Shaw e Famula (2005), Sugimoto et al. (2005) e Weebadde et al. (2008). Além dessa característica a esterilidade floral, da parte masculina ou feminina, foi estudada, sendo relatada por dois trabalhos, Spigler et al. (2008) e Spigler et al. (2010). Além dessas características, foram estudados marcadores relacionados à cor do fruto (Deng; Davis, 2001).

Ressalta-se que a maioria dos estudos envolvendo a busca de marcadores associados a características de interesse foi realizada em diploides, principalmente *F. vesca*.

Quanto ao uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético de morangueiro, essa tem sido pouco observada e, as observadas têm se concentrado no setor privado, onde marcadores estão sendo utilizados principalmente para auxílio na seleção de genótipos resistentes a doenças. Um dos motivos da pouca utilização tem sido a falta de marcadores proximamente ligados às características de interesse e que sejam de fácil obtenção. Essa constatação foi obtida por estudos conduzidos por Byrne (2007) e Bassil e Lewers (2009) quando, por meio de questionário respondido por melhoristas da área avaliaram o cenário mundial. Além disso, foi concluído que as características de maior interesse para o uso de seleção assistida como ferramenta auxiliar são a resistência a doenças e a qualidade do fruto.

Uma iniciativa visando à obtenção de marcadores moleculares para uso em seleção assistida, inicialmente para a qualidade do fruto, é o projeto denominado Rosbreed (www.rosbreed.org) conduzido de forma colaborativa por melhoristas de várias universidades americanas, juntamente com parceiros internacionais. Nesse projeto os principais genótipos de interesse dos programas de melhoramento das instituições envolvidas estão sendo fenotipados em múltiplos locais. Simultaneamente estão sendo gerados marcadores SNPs visando à procura de associação marcador-característica.

Considerações finais

O principal uso dos marcadores moleculares em morangueiro, atualmente, concentra-se na análise da diversidade genética, no mapeamento genético e na identificação de cultivares. Dentro dessas, segundo Whitaker (2011), a identificação de cultivares é o mais importante uso, principalmente em questões envolvendo a proteção de cultivares e a confirmação da identidade genética de genótipos oriundos de ciclos de multiplicação assexuada.

Referências

AGRIANUAL. **MORANGO balanço mundial**. São Paulo, p. 419, 2008.

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*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.109, p. 571–579, 2004.

ASHLEY, M.V.; WILK, J.A.; STYAN, S.M.N.; CRAFT, K.J. ; JONES, K.L.; FELDHEIM, K.A. ; LEWERS, K.S.; ASHMAN, T.L. High variability and disomic segregation of microsatellites in octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae), **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.107, p. 1201–1207, 2003.

ARNAU, G.; LALLEMANT, J.; BOURGOIN, M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Euphytica**, Dordrecht, v. 129, p. 69-79, 2002.

BASSIL, N. V.; GUNN, M. FOLTA, K.; LEWERS, K. Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, p. 473–476, 2006.

BASSIL, N. V.; LEWERS, K. Genomic opportunities, new crops and new products. In: FOLTA, K. M.; GARDINER, S. E.; **Genetics and Genomics of Rosaceae**. Plant genetics and genomics. Crops and Models, New York: Springer- Verlag, v. 6, p. 55–70, 2009.

BECERRA, V.; PAREDES, M.; LAVIN, A. Biochemical and molecular diversity in the Chilean strawberry and its implications for plant breeding. **HortScience**, v. 40, n. 6, p. 1642-1643, Alexandria, outubro, 2005.

BRUNINGS, A. M.; MOYER, C.; PERES, N.; FOLTA, K. M. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. **Euphytica**, Dordrecht, v. 173, n. 1, p. 63-75, maio 2010.

BYRNE, D. Molecular marker use in perennial plant breeding. **Acta Horticulturae**, Alexandria, n. 751, p 163–167, 2007.

CARRASCO, B.; GARCES, M.; ROJAS, P.; SAUD, G.; HERRERA, R.; RETAMALES, J. B.; CALIGARI, P. D. S. The Chilean strawberry *Fragaria chilensis* (L.) Duch.: genetic diversity and structure. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 132, n. 4, p. 501-506, julho 2007.

CIPRIANI, G. TESTOLIN, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, p. 366–368, 2004.

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

DALE, A.; SJULIN, T.M. Few cytoplasm contribute to North-American strawberry cultivars. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 1341–1342, 1990.

DANGL, G. S.; LEE, E. W.; SIM, S. T.; GOLINO, D. A. A new system for strawberry cultivar identification developed at Foundation Plant Services (FPS). University of California, Davis, using simple sequence repeat (SSR) *primers*. In: NORTH AMERICAN STRAWBERRY SYMPOSIUM, 2008, Canada. **Proceedings...** Kemptville: North American Strawberry Growers Association, 2008. p. 118–121.

DAVIS, T. M.; YU, H. A linkage map of the diploid strawberry *Fragaria vesca*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 88, p. 215–221, 1997.

DEBNATH, S. C.; KHANIZADEH, S.; JAMIESON, A. R.; KEMPLER, C. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 88, n. 2, p. 313-322, março 2008.

DEGANI, C.; ROWLAND, L. J.; SAUNDERS, J. A.; HOKANSON, S. C.; OGDEN, E. L.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; GALLETTA, G. J. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. **Euphytica**, Dordrecht, v. 117, n. 1, p. 1-12, 2001.

DENG, C.; DAVIS, T. M. Molecular identification of the yellow fruit color (c) locus in diploid strawberry: a candidate gene approach. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.103, p.316–322, 2001.

DENOYES-ROTHAN, B.; GUÉRIN, G.; LERCETEAU-KÖHLER, E.; RISSER, G. Inheritance of a race-specific resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria* × *ananassa*. **Phytopathology**, v. 95, p. 405–412, 2005.

FAEDI, W.; MOURGUES, F.; ROSATI, C. Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. **Acta Horticola**, Alexandria, v. 567, p. 51–60, 1999.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO STATISTICS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em 17 nov. 2011.

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

GASIC, K.; HAN, Y. P.; KERTBUNDIT, S.; SHULAEV, V.; IEZZONI,

A. F.; STOVER, E. W.; BELL, R. L.; WISNIEWSKI, M. E.; KORBAN, S. S. Characteristics and transferability of new apple EST-derived SSRs to other *Rosaceae* species. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 397-411, abril 2009.

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**, Berlim, v. 113, n. 4, p. 339-342, dezembro 1994.

GIL-ARIZA, D. J.; AMAYA, I.; BOTELLA, M. A.; BLANCO, J. M.; CABALLERO, J. L.; LOPEZ-ARANDA, J. M.; VALPUESTA, V.; SANCHEZ-SEVILLA, J. F. EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford v. 6, n. 4, p. 1195-1197, dezembro 2006.

GOVAN, C. L.; SIMPSON, D. W.; JOHNSON, A. W.; TOBUTT, K. R.; SARGENT, D. J. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. x ananassa* cultivars. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 649-661, novembro 2008.

HADONOU, A. M.; SARGENT, D. J.; WILSON, F.; JAMES, C. M.; SIMPSON, D. W. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. **Genome**, Ottawa v. 47, n. 3, p. 429-438, 2004.

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

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

HAYMES, K.M.; HENKEN, B.; DAVIS, T.M.; VAN DE WEG, W.E.; Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpf1) in the cultivated strawberry. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 1097–1101, 1997.

HAYMES, K.M.; VAN DE WEG, W.E.; ARENS, P.; MAAS, J.L.; VOSMAN, B.; DEN NIJS, A.P.M. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, n. 125, p. 330–339, 2000.

College of Agricultural and environmental sciences

Impact identifying Strawberry varieties. Disponível em: <<http://caes.ucdavis.edu/NewsEvents/News/Impact>>. Acesso em: 17 nov. 2011.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALA, F.; WIEL, C. V. D.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSKI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, p. 381 - 390, 1997.

KURAS, A.; KORBIN, M.; ZURAWICZ, E. Comparison of suitability of RAPD and ISSR techniques for determination of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) relationship. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 79, p.189–193, 2004.

LERCETEAU-KÖHLER, E.; GUÉRIN, G.; DENOYES-ROTHAN, B. Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.111, p. 862 -870, 2005.

LEVI, A.; ROWLAND, L.J. Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat- (SSR-) anchored *primers*. **American Journal for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, p. 74-78, 1997.

LEWERS, K.S.; STYAN, S. M. N.; HOKANSON, S. C. Strawberry GenBank-derived and genomic simple sequence repeat (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.130, p. 102–115, 2005.

MILELLA, L.; SALUZZI D.; LAPELOSA, M.; BERTINO, G.; SPADA, P.; GRECO, I.; MARTELLI, G. Relationships between an Italian strawberry and its ancestor using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p. 1715 -1720, 2006.

MNEJA, M.; GARCIA-MAS, J.; AUDERGON, J.-M.; ARÚS, P. Prunus microsatellite marker transferability across rosaceous crops. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 6, n. 5, p. 689-700, 2010.

MONFORT, A.; VILANOVA, S.; DAVIS, T. M.; ARÚS, P.A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria* × *ananassa*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford v.6, p. 197–200, 2006.

MORALES, R. G. F. **Divergência genética entre cultivares de morangueiro por meio de marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicos**. 2010. 69 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava.

NIER, S.; SIMPSON, D. W.; TOBUTT, K. R.; SARGENT, D. J.A genetic linkage map of an inter-specific diploid *Fragaria* BC1 mapping population and its comparison with the *Fragaria* reference map (FV × FN). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.81, p. 645–650, 2006.

NJUGUNA, W. **Development and use of molecular tools in *Fragaria***. 2010. 389f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) -Oregon State University, Oregon.

PARK, Y. H.; AHN, S. G.; CHOI, Y. M.; OH, H. J.; AHN, D. C.; KIM, J. G.; KANG, J. S.; CHOI, Y. W.; JEONG, B. R. Rose (*Rosa hybrida* L.) EST-derived microsatellite markers and their transferability to strawberry (*Fragaria* spp.). **Scientia Horticulturae**, Dordrecht, v. 125, n. 4, p. 733-739, jul.2010.

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

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P.; FACHINELLO,

J. C. Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília - DF, n. 26, p. 84-87, 2006.

SARGENT, D. J.; DAVIS, T. M.; TOBUTT, K. R.; WILKINSON, M. J.; BATTEY, N. H.; SIMPSON, D. W. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 7, p. 1385-1391, novembro 2004.

SARGENT, D. J.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, F.; RUIZ-ROJA, J. J.; SUTHERLAND, B. G.; PASSEY, A.; WHITEHOUSE, A. B.; SIMPSON, D. W. A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 293-303, outubro 2009.

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

SHAW, D.V.; FAMULA, T. R. Complex segregation analysis of day-neutrality in domestic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Euphytica**, Dordrecht v. 145, p. 331–338, 2005.

SHULAEV, V.; et al. The genome of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*). **Nature Genetics**, New York, v. 43, p. 109–116, 2010.

SJULIN, T.M.; DALE, A. Genetic diversity of North American strawberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p. 375–385, 1987.

SPIGLER, R. B.; LEWERS, K. S.; JOHNSON, A. L.; ASHMAN, T.

Comparative mapping reveals autosomal origin of sex chromosome in octoploid *Fragaria virginiana*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 101,p.107–117, 2010.

SPIGLER, R. B.; LEWERS, K. S.; MAIN D. S.; ASHMAN, T. Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragariavirginiana*, reveals earliest form of sex chromosome. **Heredity**, New York ,v. 101,p.507–517, 2008.

SUGIMOTO, T. TAMAKI, K.; MATSUMOTO, J.; YAMAMOTO, Y.; SHIWAKU, K.; WATANABE, K. Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. **Plant Breeding**,Berlim, v.124 p. 498–501, 2005.

TYRKA, M.; DZIADCZYK, P.; HORTYNSKI, J.A. Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. **Euphytica**, Dordrecht , v. 125,p. 273–280, 2002.

VAN de WEG, W. E. Resistance to *Phytophthora fragaria* var. *fragariae* in strawberry: the *Rpf2* gene. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.94, p. 1092–1096, 1997.

WEEBADDE, C.K.; WANG, D.; FINN, C.E.; LEWERS, K.S.; LUBY, J.J.; BUSHAKRA, J.; SJULIN, T. M.; HANCOCK, J. F. Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. **Plant Breeding**, Berlim,v.127, p. 94-101, 2008.

WHITAKER, V.M. V. Applications of molecular markers in strawberry. **Journal of Berry Research**, Lansdale, v. 1, p.115-127,abril 2011.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

