

CIRCULAR TÉCNICA

n. 403 - junho 2024

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000

EPAMIG
Pesquisa Agropecuária

AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



**MINAS
GERAIS**

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Divergência genética de híbridos do morangueiro, produzidos no Norte de Minas, utilizando marcadores microsatélites¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe², Débora Ferreira de Souza³, Joana D'Ark Nunes da Silva Lima⁴, Izabela Cristina Pires Gomes⁵, Emerson Brito Ribeiro⁶, Mickaelly Jordanya Guimarães Silva⁷, Joseane Faria da Silva Souza⁸, Mário Sérgio Carvalho Dias⁹

INTRODUÇÃO

O morangueiro cultivado (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta octoploide, da família Rosaceae, valorizada por suas características organolépticas, como sabor, coloração e aroma. Sua propagação ocorre predominantemente de forma vegetativa, por meio de estolões, mas também pode ser feita de forma sexuada, usando sementes dos pseudofrutos, técnica comum no melhoramento genético (Welter, 2021).

No Brasil, a quantidade de Programas de Melhoramento Genético do Morangueiro é limitada, destacando-se a necessidade de revitalização para desenvolver cultivares mais adaptadas às condições tropicais e subtropicais (Galvão *et al.*, 2017). A dependência de cultivares importadas aumenta os custos de produção e resulta em baixa adaptabilidade, ressaltando-se a importância do melhoramento local para obter genótipos com melhor desempenho agronômi-

co e qualidade nutricional (Zeist; Resende, 2019). A caracterização da variabilidade genética, fundamental para o sucesso do melhoramento, pode ser feita com marcadores moleculares, como microsatélites, que são altamente polimórficos (Silveira, 2014).

O Banco de Germoplasma do Morangueiro, da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorutuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG, é um avanço importante, que permite o desenvolvimento de novas variedades adaptadas localmente e estudos sobre a diversidade genética. Isso facilita a criação de cruzamentos híbridos promissores e direciona as estratégias de melhoramento (Batista *et al.*, 2015). O uso de microsatélites é eficiente para identificar polimorfismos entre híbridos de morangueiro.

Esta Circular Técnica tem como objetivo avaliar a diversidade genética de híbridos de morango, produzidos por cruzamentos dialélicos, na EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG.

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR (38) 3834-1760, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista PIBIC FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, fdesouza@gmail.com.

⁴Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Bolsista CNPq/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, joanadark93_@hotmail.com.

⁵Engenheira-agrônoma, Bolsista BDCT&I Nível III FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, belapgomes@yahoo.com.br.

⁶Técnico Química, EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, emersondireito1@hotmail.com.

⁷Engenheira-agrônoma, Bolsista BDCT&I Nível IV FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, mickaellyagronomia@gmail.com.

⁸Bióloga, Bolsista BDCT&I Nível IV FAPEMIG/EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, joseanefariasilva@yahoo.com.br.

⁹Engenheiro-agrônomo, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, mariodias@epamig.br.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Labbiotec), da EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG. Foram utilizados seis genitores de morango ('Toyonoka', 'Sweet Charlie', 'Camino Real', 'Oso Grande', 'Dover' e 'Aleluia') e 37 híbridos obtidos a partir de cruzamentos dialélicos completos. Foram coletadas cinco folhas completamente desenvolvidas de cada híbrido de morango, e as amostras numeradas de 1 a 37, correspondendo a diferentes cruzamentos de híbridos gerados.

O DNA foi extraído de folhas totalmente desenvolvidas do morangueiro (Fig. 1), coletadas na EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com adaptações. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 2%, corado com corante tipo IV. A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm, e diluída para 50 ng/μL.

No experimento foram utilizados 20 primers (Tabela 1). As amostras foram submetidas a reações de amplificação, com as seguintes concentrações finais: cloreto de magnésio (MgCl₂) (1,5 μM), (hidroximetil) aminometano (Tris) (10 mM), nucleosídeo trifosfato – dinucleotide triphosphates (dNTPs) (0,2 μM), primer (1 mM), Taq DNA polimerase (0,1 U), DNA (20 ng) e água ultrapura. As amplificações ocorreram em um termociclador Life Touch, modelo TC-96/G/H(b)B, empregando-se um programa sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto; anelamento à temperatura ideal de cada primer (Tabela 1) por 2 minutos, e extensão a 72 °C por 2 minutos; extensão final a 72 °C por 60 minutos, seguido de manutenção a 4 °C até a retirada das amostras.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 2%, em tampão

Figura 1 - Híbridos pertencentes ao Banco de Germoplasma do Morangueiro da EPAMIG Norte - Campo Experimental do Gorutuba (CEGR), Nova Porteirinha, MG



Fotos: Débora Ferreira de Souza

Tabela 1 - Identificação dos primers de sequências microssatélites e temperatura de anelamento

Primer	Sequência	Temperatura de anelamento (° C)
EMFV 104 (F/R)	TGGAAACATTCTTACATAGCCAAA	58
EMFn 182 (F/R)	GCAACAAAGGAGGTTAGAGTCG	54
EMFn 111 (F/R)	GAAGCTCCTCTCACAAAGTTAAGG	56
EMFn 181 (F/R)	CCAAATTCAAATTCCTCTTTCC	54
ChFaM 023 (F/R)	AGGAGAAGACCGGCTGTGTA	56
ARSFL 11 (F/R)	GCGAAGCATAACTGGCAGTATCTG	60
EMFn 121 (F/R)	GGTCCCTAAGTCCATCATGC	55
EMFn 170 (F/R)	CAGTTTGCCCAACAACAAGG	55
EMFvi 166 (F/R)	ACCGCAAGCTGAGTTAGAGGAG	55
EMFvi 136 (F/R)	GAGCCTGCTACGCTTTTCTATG	55

Fonte: Elaboração dos autores.

Nota: F/R - Primers frente e reverso.

SB 1X, por 50 minutos, e corados com corante tipo IV e gel red. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no Locus L-Pix Touch.

Para estimar a distância genética, registraram-se as bandas polimórficas, identificadas em pelo menos duas amostras, gerando uma matriz binária (1 para presença e 0 para ausência da banda). A matriz de dissimilaridade foi calculada pelo complemento do índice de Jaccard, e a divergência genética representada por um dendrograma, pelo método de agrupamento hierárquico aglomerativo simples – unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA), que é um algoritmo genético que se baseia em distâncias genéticas. Os dados foram analisados com o software R, versão 3.5.2, utilizando os pacotes Cluster, Rcmdr e Ade4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo representam o primeiro esforço da EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, para caracterizar geneticamente híbridos de morango, estabelecendo uma base importante para entender a diversidade genética entre os híbridos. A caracterização de genótipos por meio de marcadores moleculares de DNA amplia o conhecimento sobre o germoplasma, permitindo avaliar a divergência genética e o padrão molecular de cada cultivar, o que auxilia no planejamento estratégico de cruzamentos para obter cultivares superiores rapidamente (Wendel; lastremski, 2022).

Os marcadores microssatélites são ferramentas genéticas eficazes para diferenciar indivíduos aparentados, em virtude da sua ampla quantidade,

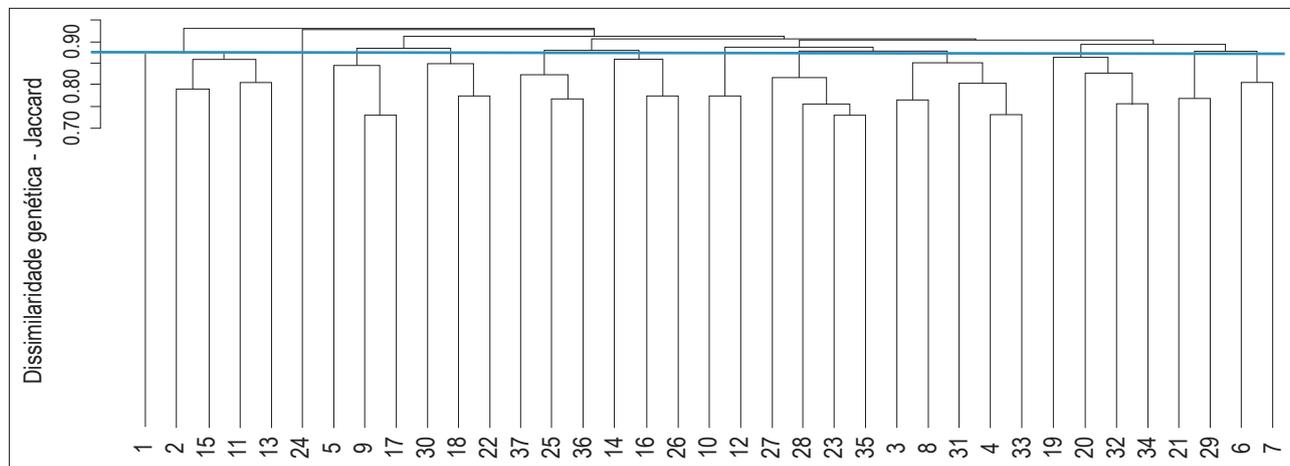
distribuição equitativa no genoma e alto polimorfismo, aumentando a precisão na identificação e diferenciação genética (Zawadneak; Schuber; Mógor, 2019). Após os cruzamentos, os genótipos são estudados, clonados e submetidos a cruzamentos sucessivos para otimizar a frequência de alelos favoráveis. Os clones selecionados passam por testes de adaptabilidade e estabilidade antes de serem lançados no mercado (Zawadneak; Schuber; Mógor, 2019).

A compreensão das informações genéticas do germoplasma é essencial para o Programa de Melhoramento Genético, obtida por meio do estudo da divergência genética, com métodos que envolvem caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares (Wendel; lastremski, 2022). Observando a dissimilaridade entre as cultivares no dendrograma, com corte na escala de 0,87, foi possível verificar a formação de 12 grupos distintos (Fig. 2).

O agrupamento das cultivares de morango, geralmente, segue um padrão relacionado com a sua origem (Silva, 2021). Alguns híbridos permanecem agrupados com seus genitores, em razão da herança de características genéticas específicas. O Grupo I inclui os híbridos 01, 02, 15, 11 e 13, com 02 e 15 compartilhando os mesmos pais. O Grupo II contém apenas o híbrido 24, que, apesar de compartilhar os mesmos genitores dos híbridos 02 e 15, apresenta divergência genética, sugerindo mutações ou recombinação (Veiga Junior *et al.*, 2023).

No Grupo III, formado pelos híbridos 05, 09 e 17, observa-se um genitor comum entre 09 e 17, apesar de algumas variações. O Grupo IV inclui os híbridos 30, 18 e 22, com 30 apresentando padrões genéticos distintos dos outros dois, indicando alta

Figura 2 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 37 híbridos de morangueiros



Nota: Resultados obtidos pelo método de agrupamento hierárquico aglomerativo simples – unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA), utilizando-se o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade.

dissimilaridade genética. O Grupo V, com os híbridos 37, 25 e 36, compartilha um genitor comum. O Grupo VI, com os híbridos 14, 16 e 26, também sugere uma origem compartilhada. No Grupo VII, os híbridos 10 e 12 vêm de grupos geneticamente distintos, refletindo combinações únicas de alelos. Híbridos com diferentes genitores podem ter maior dissimilaridade genética. O Grupo VIII inclui os híbridos 27, 28, 23 e 35, com 27 pertencendo a outro grupo genético. Outros grupos foram identificados, contendo híbridos que compartilham pelo menos um genitor, como 03, 08, 31, 34, 33, 19, 20, 32, 34, 21, 29, 06 e 07.

A análise do dendrograma de dissimilaridade genética não destaca um híbrido específico, mas sugere grupos com características genéticas semelhantes. Para uma avaliação detalhada, é necessário comparar características específicas de cada híbrido com outras informações genéticas. Os resultados indicam uma perspectiva promissora para estudos futuros que envolvam a caracterização detalhada dos híbridos, combinando dados de biologia molecular e características agrônomicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível detectar divergência genética entre genótipos do morangueiro. Uma futura caracterização agrônômica dos híbridos do Banco de Germoplasma da EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, combinada com análises de marcadores SSR, aumentará seu valor nos Programas de Melhoramento Genético. A caracterização dos 37 genótipos de morango, no estudo, permitirá aos melhoristas desenvolverem novas estratégias para incorporar mais diversidade genética em futuras cultivares.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

REFERÊNCIAS

- BATISTA, P.F. *et al.* Divergência genética entre variedades de videiras do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.46, n.4, p.800-808, out./dez. 2015.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- GALVÃO, A.G. *et al.* Breeding new improved clones for strawberry production in Brazil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.39, n.2, p.149-155, Apr./June 2017.
- SILVA, L.R. da. **Diversidade genética de genótipos de morango e obtenção de progênesis**. 2021. 66f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2021.
- SILVEIRA, C. da S. **Caracterização molecular de acessos de morangueiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado utilizando marcadores microsatélites**. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2014.
- VEIGA JUNIOR, R.C.V. *et al.* Avaliação das características vegetativas de novas matérias genéticas de morangueiro. *In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO IFSULDEMINAS*, 15.; *SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO*, 12., 2023, Inconfidentes. **[Resumos...]**. Inconfidentes: Instituto Federal Sul de Minas, 2023. Disponível em: <https://josif.ifsuldeminas.edu.br/ojs/index.php/anais/article/view/878/873>. Acesso em: 28 jun. 2024.
- WELTER, P.D. **Adaptabilidade e desempenho agrônômico de genótipos de morangueiro de origem italiana em três regiões do sul do Brasil**. 164f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2021.
- WENDEL, C.H.; IASTREMSKI, M.P. Desafios na produção e melhoramento genético do morangueiro: revisão de literatura. *In: MEDEIROS, J.A. de; NIRO, C. M. (org.). Produção animal e vegetal: inovações e atualidades*. Jardim do Seridó: Agron Food Academy, 2022. cap.52, p.612-625. Disponível em: <https://agronfoodacademy.com/e-book-producao-animal-e-vegetal-inovacoes-e-atualidades-vol-2/>. Acesso em: 28 jun. 2024.
- ZAWADNEAK M.A.C.; SCHUBER J.M.; MÓGOR A.F. (Org.). **Como produzir morangos**. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2019. 296 p. (UFPR. Série Pesquisa, 224).
- ZEIST, A.R.; RESENDE, J.T.V. de. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.37, n.1, p.7-16, Jan./Mar. 2019.