

R  
212

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BIBLIOTECA  
CCA - UFSC

E

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE RECURSOS GENÉTICOS  
E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE PLANTAS

## Testes de Ligação e Testes de Identidade em Plantas Usando Marcadores Moleculares

André Beló

Relatório do Estágio Final de Conclusão  
de Curso de Agronomia, realizado no  
Laboratório de Genética de Plantas, na  
EMBRAPA-CENARGEN, em Brasília-  
DF, no período de 02 de fevereiro a 03  
de abril de 1998.



0.283.115-8

UFSC-BU

Prof. Orientador PhD: Rubens O. Nodari

Co-Orientador PhD: Márcio E. Ferreira

Florianópolis, setembro de 1998.

## Agradecimentos

O estágio realizado foi uma oportunidade para conhecer e conviver com outras pessoas, compartilhando tanto um ambiente de trabalho e de responsabilidades, como um ambiente de alegria e cooperação. Este estágio propiciou o conhecimento de uma nova realidade, o desenvolvimento de mais um trabalho e especialmente a amizade de muitos colegas.

Gostaria de agradecer Andréa B. Schimit e Germano Gütler, que tornaram possível e deram grande auxílio e ânimo para a realização deste estágio; Márcio Elias Ferreira pela orientação e ajuda fornecida durante o estágio, que contribuíram enormemente para a sua execução e obtenção dos resultados; para todos os colegas no laboratório que contribuíram com discussões teóricas, práticas e convivência durante este período: Zilneide, Marcos, Dário, Nei, Túlio, Geni, Maristerra, Kleyne, Ana, Lucas, Lujan, Sue Ane, Matias, Cláudio, Rosana, Rosane, Alessandra, Camila, Veridiana, Gláucia, Maria, Márcio, Marisa, e também muitas outras pessoas que contribuíram para uma melhor realização do estágio e finalmente ao Prof. Rubens O. Nodari pela orientação recebida na área de genética molecular e melhoramento de plantas durante todo o período de trabalho no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, que contribuíram para um maior e melhor aproveitamento do estágio, dos trabalhos realizados e uma melhor formação na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina.

## **Apresentação**

Este relatório foi elaborado com a finalidade de descrever as atividades desenvolvidas durante o Estágio final de conclusão do Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação de Rubens Onofre Nodari, Professor Titular PhD do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina; realizado no Laboratório de Genética de Plantas, do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob orientação do Pesquisador PhD da EMBRAPA-CENARGEN, Márcio Elias Ferreira, no período de 02 de fevereiro a 03 de abril de 1998.

Para facilitar o entendimento do assunto abordado neste relatório, o mesmo foi dividido em dois capítulos. O primeiro trata de testes de ligação, realizados em cacaueteiro (*Theobroma cacao*) e o segundo de testes de identidade, realizados em genótipos de arroz (*Oryza sativa*) e genótipos de batata (*Solanum tuberosum*).

# Sumário

## **CAPÍTULO I - TESTES DE LIGACÃO**

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>4</b>
<b>POPULAÇÃO UTILIZADA</b>	<b>4</b>
<b>EXTRAÇÃO DE DNA</b>	<b>4</b>
<b>QUANTIFICAÇÃO DO DNA</b>	<b>5</b>
<b>REAÇÕES DE PCR</b>	<b>5</b>
<b>VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS</b>	<b>5</b>
<b>SELEÇÃO DE PRIMERS E AVALIAÇÃO DA F<sub>2</sub></b>	<b>6</b>
<b>ANÁLISE DOS DADOS</b>	<b>7</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>8</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>11</b>

## **CAPÍTULO II - TESTES DE IDENTIDADE**

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>GENÓTIPOS AVALIADOS</b>	<b>14</b>
<b>EXTRAÇÃO DE DNA</b>	<b>14</b>
<b>QUANTIFICAÇÃO DO DNA</b>	<b>14</b>
<b>MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS</b>	<b>14</b>
<b>AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS MICROSATÉLITES EM ARROZ</b>	<b>14</b>
<b>AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS RAPD</b>	<b>15</b>
<b>ANÁLISE DOS DADOS</b>	<b>15</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>21</b>

### Introdução

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie de grande importância social e econômica para o Brasil. Desta planta são retiradas amêndoas (sementes) que são trituradas e utilizadas na produção de chocolate. Originária da floresta úmida amazônica, a espécie se dispersou na Amazônia e nos Andes, chegando a países como Venezuela, Colômbia, Equador, México e outros na América Central. A hipótese mais aceita, é de que seu centro de origem principal é a região próxima das nascentes dos rios Amazonas e Orinoco, onde se encontra a maior diversidade genética (Ferreira, 1997). A domesticação da espécie foi realizada por Maias e Astecas na América Central, a aproximadamente 2 mil anos, utilizando árvores do grupo *criolo*. Genótipos do grupo *Forastero* do baixo Amazonas foram levados para a África, sendo cultivados em vários países como Camarões, Gana, Nigéria, Costa do Marfim e Malásia, responsáveis hoje por mais de 70 % da produção mundial. A espécie também foi levada ao Sul da Bahia, onde se formou uma grande região produtora, responsável por 80 % da produção brasileira (Ferreira, 1997).

A espécie possui três grupos raciais, que apresentam características distintas e grande potencial no melhoramento (Tabela 1).

**Tabela 1.** Grupos raciais de cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) com suas principais características.

"Criolo"	Amêndoas brancas, melhor qualidade do chocolate, pouco produtivos e suscetíveis a doenças
"Forastero"	Amêndoas púrpuras, rústicos e vigorosos, bastante produtivos (mais de 80 % da produção mundial).
Trinitários	Cruzamentos entre Criolo e Forasteros (melhorados)

Fonte: Ferreira (1997).

O grupo *Forastero* se divide ainda em *Forastero* do alto e baixo Amazonas. A diferenciação destes dois grupos é feita principalmente em relação a diferenças na distribuição geográfica, precocidade e resistência a doenças (N'Goran, 1994).

Estudos da organização e distribuição da variabilidade genética da espécie são de enorme importância para a sua preservação, classificação e uso nos programas de melhoramento genético. Descritores morfológicos foram desenvolvidos com o objetivo de facilitar o acesso e a utilização da variabilidade genética do cacauieiro (Bekele, 1994). Neste trabalho foram avaliadas características qualitativas e quantitativas de folhas, flores e frutos de diferentes acessos de cacauieiro, concluindo que caracteres morfológicos ligados a floração são mais discriminantes. Contudo eles não estão, de modo geral, associados a características agrônômicas de interesse.

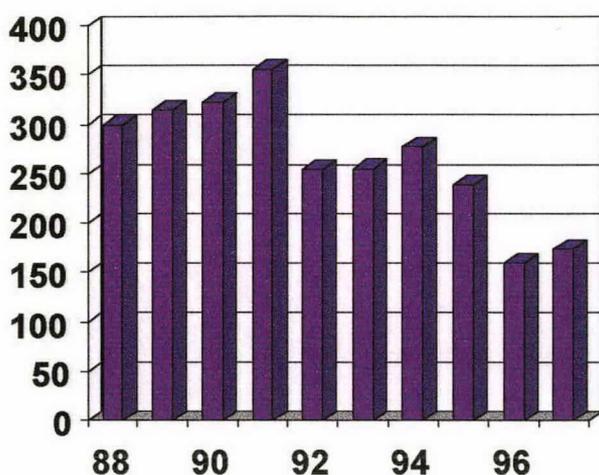
Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de aumentar o conhecimento existente a respeito da distribuição da variabilidade genética, identificação e separação dos diferentes grupos raciais da espécie, avaliando a variabilidade de genes nucleares ribossomais - rDNA

(Laurent, 1993a), DNA citoplasmático (Laurent, 1993b) e marcadores RFLP e RAPD (N'Organ *et al*, 1994). No estudo com DNA citoplasmático de mitocôndrias e cloroplasto, foi possível identificar a presença dos dois grandes grupos genéticos no cacaueteiro, *Forastero* e *Criolo*. Nos trabalhos com rDNA, marcadores RFLP e RAPD foram identificados os três grupos genéticos. A variabilidade no DNA citoplasmático não foi capaz de discriminar o grupo *Trinitário*, porque estes genomas são de herança materna e a origem híbrida do grupo *Trinitário* é identificada como sendo o genoma materno. Marcadores RAPD se mostraram tão eficientes quanto RFLP para estudar a diversidade genética do cacaueteiro. Estes marcadores foram capazes de sugerir a classificação correta de clones de cacaueteiro em determinado grupo, anteriormente classificados através de características morfológicas, em outro grupo.

O cacaueteiro é uma espécie alógama que inicia a produção com no mínimo seis anos, apresentando produção econômica por aproximadamente 40 anos, embora ultrapasse 100 anos produzindo. O melhoramento genético na espécie iniciou com a identificação de clones heteróticos, cruzamento destes clones e avaliação dos híbridos. Com a finalidade de maximizar o efeito da heterose nos cruzamentos da espécie, cruzamentos dialélicos foram realizados e os híbridos foram avaliados para capacidade geral de combinação e capacidade específica de combinação. Esta estratégia de melhoramento é dispendiosa por manter no campo grande número de cruzamentos e lenta devido ao longo tempo requerido para avaliação de um cruzamento que é no mínimo de 9 a 12 anos. Dias *et al* (1995) avaliaram um dialélico de 5 clones de cacau, para características de interesse agrônomo, ligadas a produtividade. Neste dialélico o clone ICS 1 contribuiu com a maior capacidade geral de combinação para características como peso de sementes úmidas por fruto (122,87 g) e peso de sementes úmidas por planta (4,36 Kg). Dias *et al* (1997) avaliaram a performance de híbridos e realizaram análise multivariada de divergência para alguns clones de cacaueteiro identificando algumas correlações entre características de produção e diversidade genética. Neste trabalho os autores encontraram correlação positiva entre a distância genética de progenitores de híbridos com peso de sementes úmidas por fruto e com peso de sementes úmidas por planta.

Pelo fato do cacaueteiro apresentar um longo período juvenil e os métodos tradicionais de melhoramento de plantas serem muito dispendiosos na espécie, cada vez mais a biotecnologia está sendo empregada para auxiliar o melhoramento genético do cacaueteiro. Dias (1995) realizou uma revisão sobre o assunto, citando diversas técnicas e suas aplicações: hibridização *in situ* (identificação da ploidia e número cromossômico do cacaueteiro; diplóide, com  $2n = 20$ ), obtenção de dihaplóides (para a formação de híbridos não convencionais), cultura de tecidos (propagação massal de germoplasma e híbridos-elite), marcadores isoenzimáticos (estudos da variabilidade genética e identificação de materiais), RFLP (estudos da variabilidade genética, identificação de materiais e mapeamento genético) e RAPD (estudos da variabilidade genética, identificação de materiais, mapeamento genético e formação de *bulks* para a identificação de marcadores ligados a genes de resistência ou tolerância a vassoura-de-bruxa).

O Estado da Bahia historicamente é conhecido como um grande produtor de amêndoas de cacau, tendo sido este produto responsável por até 50 % das exportações e receitas. O número de pessoas envolvidas com a cultura na região produtora do Sul da Bahia, foi estimada em 100 mil trabalhadores diretos, tendo alcançado 400 mil na década de 80. O motivo da redução de empregos foi a grande queda na produção, causada pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*). Esta doença é originária da região Amazônica e foi vista pela primeira vez na Bahia em 1989. Ela é capaz de reduzir em até 100 % a produtividade do cacauzeiro, causando perda total (Ferreira, 1997). A Figura 1 mostra a diminuição da produção de amêndoas no Sul da Bahia ao longo dos anos agrícolas.



**Figura 1.** Produção anual de amêndoas de cacau no Sul da Bahia, em mil toneladas. Fonte: CEPLAC/CEPEC.

A CEPLAC (Comissão executiva do plano da lavoura cacauzeira) foi criada em 1957, sendo um órgão do ministério da agricultura e do abastecimento. Ela tem sido responsável pelos trabalhos de pesquisa e cultivo do cacauzeiro no país. A CEPLAC instituiu o CEPEC (Centro de pesquisa do cacau). O CEPEC realizou cruzamentos com os clones ICS 1, melhorado do grupo trinitário e Scavinia 6 (SCA 6), forastero do alto Amazonas resistente a vassoura-de-bruxa, ambos trazidos de outros países (Ferreira, 1997). A geração F<sub>1</sub> deste cruzamento originou a variedade Theobahia, resistente a vassoura-de-bruxa. A CEPLAC vem distribuindo aos produtores sementes, mudas e estacas da nova variedade. As estacas são sobre-enxertadas, encurtando o período juvenil para dois anos.

Com o objetivo de identificar marcadores ligados a genes de resistência a vassoura-de-bruxa e também identificar locos responsáveis por características quantitativas (QTLs) de produção a CEPLAC está avaliando a possibilidade de implantação de um projeto de mapeamento na espécie (Márcio E. Ferreira, comunicação pessoal).

Uma das principais aplicações dos marcadores RAPD é a construção de mapas genéticos de ligação. A principal vantagem do uso de marcadores RAPD na construção de mapas genéticos de ligação é a capacidade de se testar um grande número de marcadores num curto espaço de

tempo, realizando uma grande amostragem do genoma. Por outro lado uma desvantagem dos marcadores RAPD é que eles só mapeiam, numa geração  $F_2$ , marcadores ligados em acoplamento. Devido a incapacidade dos marcadores RAPD detectarem com precisão ligações em repulsão, somente um homólogo da planta  $F_1$  pode ser mapeado, o que tem o mesmo significado que mapear um homólogo de cada parental (Tingey, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Ronning *et al* (1994) utilizaram RAPD para mapeamento de uma população  $F_2$ , oriunda de retrocruzamento, de 54 indivíduos. De 180 primers testados, 26 % amplificaram 104 locos polimórficos, dos quais 71 segregavam em proporções mendelianas.

Lanaud *et al* (1997) construíram um mapa genético de ligação para cacau, utilizando Isoenzimas, RFLP e RAPD, numa população  $F_1$  de 100 indivíduos, resultantes do cruzamento de dois progenitores heterozigotos. O mapa contém 193 locos (5 isoenzimas, 101 RFLP de cDNA, 4 genes conhecidos, 55 RFLP nucleares e 28 RAPD), cobrindo uma região genômica de 759 cM.

## Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar a potencialidade da técnica RAPD para mapeamento genético de ligação na geração  $F_2$  do cruzamento ICS 1 x SCA 6 de cacau (*T. cacao*) e como objetivos secundários a realização de testes de ligação com esta população  $F_2$  e o desenho de grupos de ligação, através da análise de frequência de recombinação de marcadores RAPD.

## Materiais e Métodos

### *População utilizada*

Para os testes de ligação com cacau, foi utilizada uma população  $F_2$  com 82 indivíduos, originada de um clone da variedade Theobahia (TSH 516) obtido a partir do cruzamento dos parentais SCA 6 (forastero do alto amazonas), usado como pai e ICS 1 (trinitátio), usado como mãe.

### *Extração de DNA*

O método de extração utilizado foi o descrito por Ferreira & Grattapaglia (1995). Tecido foliar foi coletado e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ , até a extração. Na extração o material vegetal foi congelado com nitrogênio líquido e pulverizado, através de maceração manual. Após a maceração o tecido pulverizado foi transferido para microtubos de centrífuga (1,5 ml), onde foram adicionados 700  $\mu\text{l}$  de tampão de extração (2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM

Tris-HCl pH 8,0, 1% PVP-40 e 2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol). O tecido foi suspenso na solução com o auxílio de um grampo de metal, colocado no vórtex por 10 segundos e colocado por 40 minutos em banho-maria a 65° C. Em seguida os tubos foram colocados na bancada para voltarem a temperatura ambiente e foram adicionados 600  $\mu$ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados por inversão, durante aproximadamente 5 minutos, sendo então centrifugados a 12000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação aproximadamente 600  $\mu$ l do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e foram adicionados 400  $\mu$ l de isopropanol (-20° C). O DNA permaneceu precipitando a -20° C, por aproximadamente 30 minutos. O DNA precipitado foi centrifugado a 7000 rpm, durante 5 minutos, sendo em seguida lavado 2 vezes com etanol 70 %, durante 10 minutos e uma vez com etanol absoluto, durante 5 minutos. O *pellet* foi desidratado em liofilizador (*speed vac*), durante 10 minutos e resuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA), contendo 10  $\mu$ g/ml de RNase. Após a resuspensão o DNA foi purificado com a adição de 500  $\mu$ l de 1 M NaCl, armazenamento por uma hora a 4° C e centrifugação a 12000 rpm, durante 15 minutos. A metade superior do volume foi transferida para novo tubo e reprecipitada com 2/3 do volume de isopropanol (-20° C). Após a precipitação o DNA foi centrifugado a 7000 rpm, durante 5 minutos, lavado *overnight* em 1 ml de etanol 70 % (4° C), lavado durante 15 minutos em etanol 70 % (temperatura ambiente), lavado com etanol absoluto, durante 5 minutos, desidratado em liofilizador, durante 10 minutos e resuspenso em tampão TE.

### **Quantificação do DNA**

O DNA foi quantificado e a sua qualidade avaliada, através de eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio, através de comparação com DNA de fago  $\lambda$ , com concentração conhecida. O DNA foi diluído em H<sub>2</sub>O, para uma concentração de 2 ng/ $\mu$ l e requantificado com eletroforese em gel de agarose 1 %.

### **Reações de PCR**

O DNA foi amplificado conforme Ferreira & Grattapaglia (1995), num volume total de 13  $\mu$ l, sendo 3  $\mu$ l de DNA (2 ng/ $\mu$ l) e 10  $\mu$ l de coquetel (3,46  $\mu$ l H<sub>2</sub>O; 1,0  $\mu$ l BSA [1 mg/ml]; 1,3  $\mu$ l tampão 10 X [15 mM MgCl<sub>2</sub>]; 1,04  $\mu$ l dNTPs [2,5 mM]; 3  $\mu$ l Primer [5 ng/ $\mu$ l] e 1 U Taq DNA Polimerase [5 u/ $\mu$ l - Cenbiot-RS]). Sobre a reação foram adicionados 50  $\mu$ l de óleo mineral. O programa de amplificação foi 92° C (1 minuto), 35° C (1 minuto), 72° C (2 minutos), repetidos 40 vezes e 72° C (5 minutos).

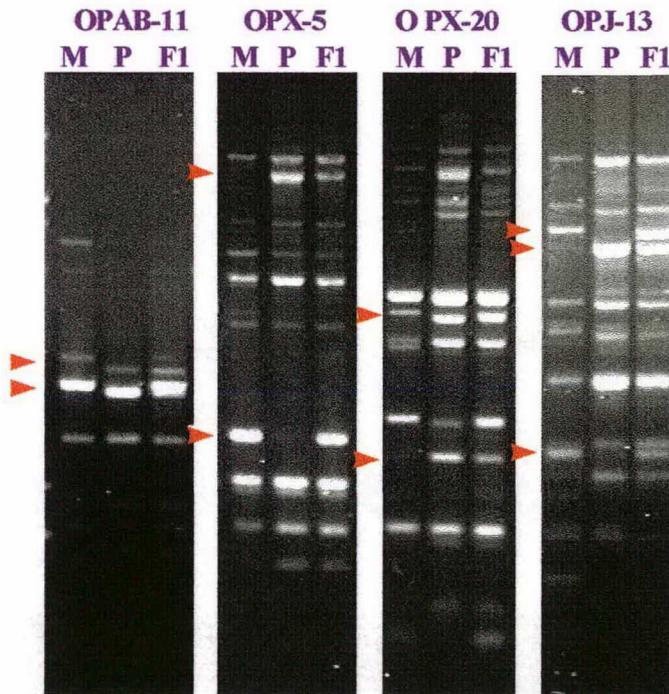
### **Visualização dos fragmentos amplificados**

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídio (100  $\mu$ g/600 ml gel), durante aproximadamente 4,5 horas a 120 V. A imagem

dos géis em luz ultra-violeta, foi digitalizada num sistema computadorizado (*Eagle Eye II - Stratagene*).

### *Seleção de primers e avaliação da F<sub>2</sub>*

Os primers utilizados para a análise da população F<sub>2</sub> foram testados através de reações de PCR, realizadas nas amostras ICS 1, SCA 6 e F<sub>1</sub>. Foram selecionados os primers que apresentavam locos com presença da banda em um dos genótipos parentais, ausência da banda no outro genótipo parental e presença de banda no genótipo F<sub>1</sub> (Figura 2). Desta forma, foram selecionados apenas locos que eram (1) não homozigoto recessivo para um dos parentais, (2) homozigoto recessivo para o outro parental e (3) heterozigoto no F<sub>1</sub> (Figura 3). Após a seleção dos primers, todos os indivíduos F<sub>2</sub>, foram avaliados para todos os primers selecionados (Figura 4).



**Figura 2.** Primers que amplificaram locos RAPD em condições ideais para mapeamento em F<sub>2</sub>, com marcadores dominantes. Obs: (M) genótipo parental ICS 1, (P) genótipo parental SCA 6 e F<sub>1</sub>.

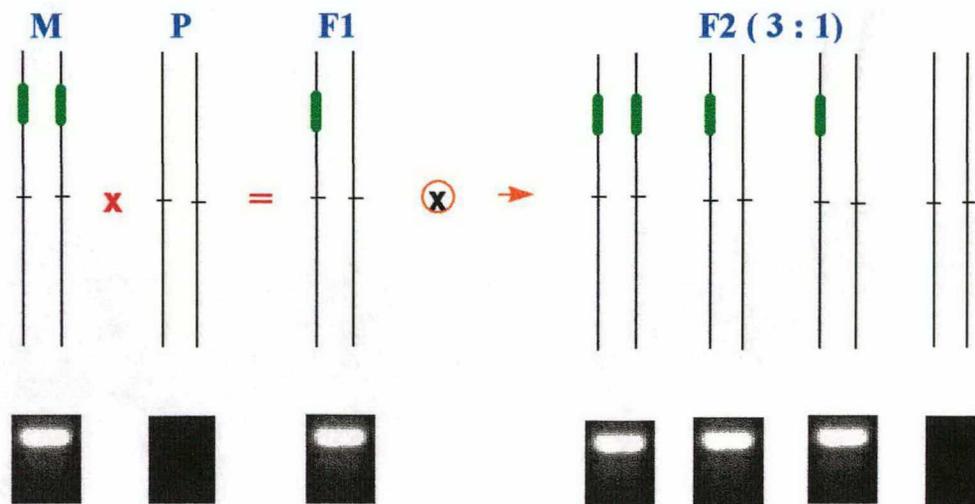


Figura 3. Seleção de primers e segregação dos locos RAPD em cacauero. Obs: (M) genótipo parental ICS 1, (P) genótipo parental SCA 6, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>.

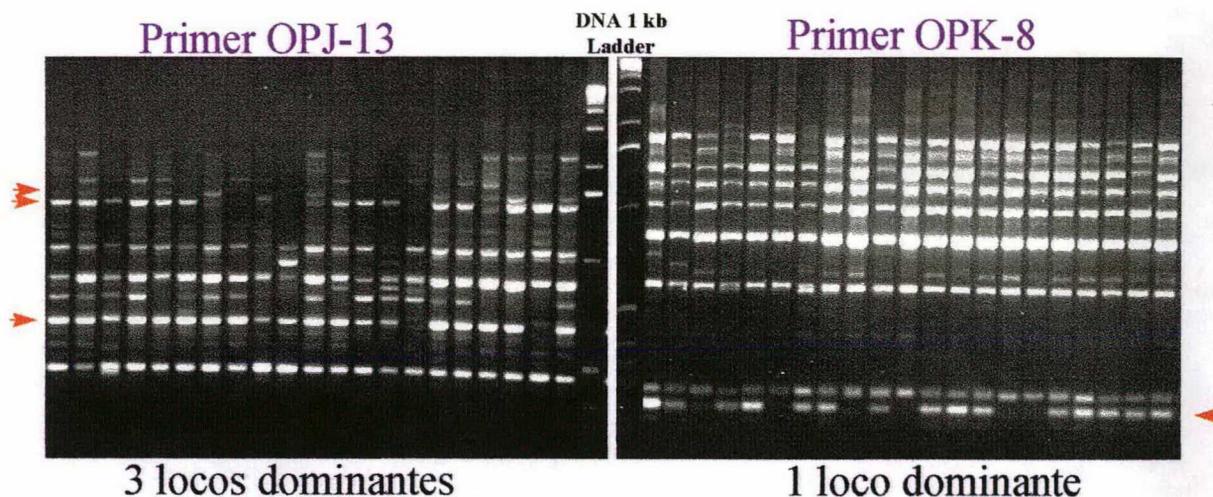


Figura 4. Análise da população F<sub>2</sub> de cacauero, com marcadores RAPD.

### Análise dos dados

Nos testes de ligação, uma planilha eletrônica foi construída, discriminando os fenótipos moleculares observados para os indivíduos da população F<sub>2</sub> segregante (1 para presença ou 0 para ausência da banda), para todos os locos RAPD interpretados.

O teste estatístico de significância Qui-quadrado foi empregado para todos os locos interpretados, para determinar se a segregação observada respeitava as proporções de segregação mendeliana esperadas de 3:1 para os 21 locos dominantes e 1:2:1 para os três locos co-dominantes.

Os locos que apresentaram segregação com desvio da proporção mendeliana esperada, com 1 % de probabilidade, foram excluídos dos testes de ligação. Os locos restantes, com exceção dos co-dominantes, foram divididos em dois grupos. O primeiro referente aos marcadores herdados pelo F<sub>1</sub> do parental ICS 1 e o segundo, referente aos marcadores herdados

pelo  $F_1$ , do parental SCA 6. Tanto o primeiro como o segundo grupo, foram acrescidos dos locos co-dominantes e submetidos a análise de ligação no programa MapMaker (Lander, 1987).

### Resultados

Os resultados (Tabela 2) indicam baixa capacidade de detecção de polimorfismos genéticos adequados para mapeamento neste cruzamento, com a técnica RAPD.

Por esta técnica apresentar grande capacidade multiplex, esperava-se uma taxa de aproveitamento de primers superior a encontrada, embora não seja incomum em outros trabalhos que diversos primers testados e selecionados sejam excluídos da avaliação e interpretação dos dados por não manterem o padrão de amplificação, ou não gerarem bandas com absoluta clareza de informações. Ronning *et al* (1994) testaram a eficiência de marcadores RAPD para mapeamento de uma população de retrocruzamento de cacaueteiro. De 180 primers testados, os autores encontraram 26 % que amplificavam bandas claras e reproduzíveis, somando um total de 71 locos ideais para mapeamento, representando 1,52 locos por primer.

**Tabela 2.** Número de primers, locos observados e avaliados na seleção de primers e análise da população  $F_2$  de cacaueteiro, da variedade Theobahia.

Primers avaliados no screening	86	-
Primers selecionados	23	(26,7 %)
Locos selecionados	45	1,96/primer
Primers interpretados e avaliados	14	(60,8 %)
Locos interpretados e avaliados	24	(53,0 %) 1,71/primer
Locos com herança co-dominante	3	(12,5 %)
Locos com desvio da segregação Mendeliana	5	(20,8 %)
Locos testados para ligação	19	(79,2 %)
Locos ligados	7	(36,8 %)

Os 24 locos RAPD interpretados na população  $F_2$  de cacaueteiro, foram utilizados para os testes de ligação. Dos 24 locos interpretados, 3 apresentaram herança co-dominante, permitindo a distinção de fenótipos moleculares heterozigotos e homozigotos dominante. Apesar dos marcadores RAPD apresentarem herança dominante, na situação específica onde ocorre uma pequena inserção ou uma pequena deleção em um dos homólogos, eles adquirem herança co-dominante. Neste caso o heterozigoto que apresenta duas bandas, sendo uma pouco maior que a outra, pode ser distinguido de ambos os homozigotos que apresentam uma ou outra banda. Estes eventos somente podem ser observados quando a deleção ou inserção é de um pequeno número

de pares de base, permitindo que os dois alelos do loco permaneçam suficientemente próximos durante a eletroforese.

A detecção de um loco RAPD de herança co-dominante é comprovado pela inexistência de indivíduos nulos para ambas as bandas, o que caracteriza a independência das bandas e as identifica como marcadores RAPD de herança dominante. Além da observação de segregação em um número suficiente de indivíduos segregantes, outras formas de se comprovar a herança co-dominante destes locos são (1) o seqüenciamento dos fragmentos e comprovação de homologia ou (2) o uso dos mesmos como sondas para hibridização em alguns indivíduos. Para a utilização destes marcadores RAPD co-dominantes, no mapeamento é necessário que um parental seja homozigoto para um alelo e o outro parental seja homozigoto para o outro alelo.

Dos locos interpretados, três foram originários do parental SCA 6, sendo os demais originários do parental ICS 1. Uma possível explicação para este resultado é de que após vários cruzamentos realizados entre ICS 1 e SCA 6, foram selecionados aqueles clones  $F_1$  que apresentavam maior semelhança com o ICS 1, já que o clone ICS 1 foi utilizado para doar as características agrônômicas e de produção à variedade Theobahia e o clone SCA 6 foi utilizado como doador de características para resistência à vassoura-de-bruxa.

A Tabela 3 demonstra os valores do teste Qui-quadrado obtidos para os locos avaliados com marcadores RAPD.

Os locos RAPD herdados pelo  $F_1$ , do parental SCA 6 (3 dominantes e 3 co-dominantes), quando submetidos a teste de ligação no programa MapMaker, não apresentaram nenhum grupo de ligação, com a utilização de  $LOD = 4,0$  (probabilidade de detecção de falsa ligação igual a  $10^{-4,0}$ ) e frequência de recombinação máxima de 40 %. Os locos RAPD herdados pelo  $F_1$  do parental ICS 1 (13 dominantes e 3 co-dominantes) quando submetidos a teste de ligação no programa MapMaker, sob os mesmos parâmetros, apresentaram 3 grupos de ligação, sendo um deles com 3 locos RAPD e os outros dois com dois locos RAPD (Figura 5). A frequência de recombinação e a distância em cM (centiMorgans) existente entre os locos de cada grupo de ligação foi estimada pela função de Kosambi. A ordem dos três locos agrupados no mesmo grupo de ligação foi determinada pela minimização da probabilidade de erro de todas as combinações possíveis. A distância total mapeada pelos três grupos de ligação foi de 38,2 cM. O logaritmo do valor obtido pelo método de máxima verossimilhança, nestes grupos de ligação foi de -252,08.

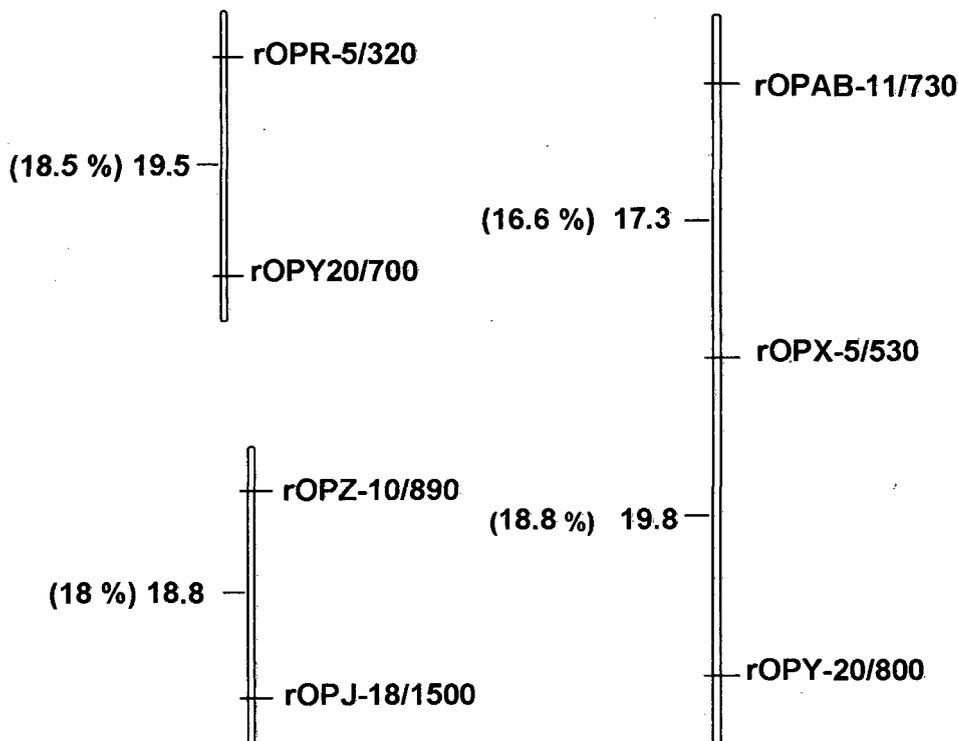
A utilização de  $LOD = 4,0$  apresenta alto rigor sobre o agrupamento e cálculo da frequência de recombinação das ligações, restringindo a possibilidade de detecção de falsas ligações.

## Capítulo I - Testes de Ligação

Tabela 3. Valores do teste de significância Qui-quadrado encontrados para os 24 locos RAPD avaliados na população F<sub>2</sub> da variedade Theobahia.

Dominantes	$\chi^2$ (g.l.=1)	Dominantes	$\chi^2$ (g.l.=1)
OPZ10/900	0,041	OPX5/530	0,154
OPY16/950	2,177	OPR5/900	0,037
OPY16/850	0,103	OPR5/315	2,068
OPY16/450	8,894***	OPAA11/280	0,751
OPJ13/1550	21,823***	OPZ19/1100	5,207**
OPJ13/1500 <sup>1</sup>	2,232	OPZ19/700	0,450
OPJ13/650	6,918***	OPAB9/460	8,963***
OPK8/230 <sup>1</sup>	0,926	OPX4/900	26,512***
OPJ18/1500	2,400	<b>Co-dominantes</b>	<b><math>\chi^2</math> (g.l.=1)</b>
OPJ18/1400	0,202	OPAB11/750	3,853
OPY20/800	3,156*	OPAB11/700	9,077**
OPY20/700	6,505**	OPZ4/410	0,892
OPX5/2000 <sup>1</sup>	2,52631579		

Obs: Locos com desvio de segregação mendeliana, (\*\*\*) 1 % de probabilidade, (\*\*) 5 % de probabilidade e (\*) 10 % de probabilidade e (<sup>1</sup>) locos originados do parental SCA 6. Os locos marcadores são identificados como OP (Operon technologies), seguido de uma ou duas letras (p.ex. J - Kit de primers J), de um número (p.ex. 13 - número do primer no Kit) e /número (número de pares de base do fragmento).



**Figura 5.** Grupos de Ligação para o parental ICS 1, baseado em marcadores RAPD analisados na população  $F_2$  segregante do cruzamento ICS 1 x SCA 6 de cacauero (*Theobroma cacao*). Obs: À esquerda, está a distância baseada em frequência de recombinação entre os marcadores ligados (%) e a distância em cM. Os locos marcadores, à direita do grupo de ligação, são identificados como OP (Operon technologies), letras (Kit de primers), número (número do primer no Kit) e /número (número de pares de base do fragmento).

## Conclusões

A técnica RAPD não se mostrou eficiente para ser utilizada como único marcador no mapeamento deste cruzamento específico, porque o número de locos encontrados, em relação ao número de primers testados, foi baixo, indicando pequena capacidade de detecção de polimorfismos e por ser de herança dominante, pouca informação para o cálculo de detecção de ligação e frequência de recombinação. Marcadores RAPD podem no entanto, ser associados a outros marcadores para saturar um mapa genético iniciado com outros marcadores, saturar regiões que apresentem características de interesse e também na avaliação de grupos de plantas formados para identificar características de interesse.

### Introdução

Uma importante aplicação dos marcadores moleculares na genética de plantas é a discriminação de diferentes genótipos, através da análise de polimorfismos isoenzimáticos ou polimorfismos de fragmentos de DNA. Cada padrão molecular de um indivíduo se constitui em uma impressão digital (*genetic fingerprinting*). Essa diferenciação de genótipos pode ser usada para (1) identificação de origem parental, (2) distinção de clones e de cultivares, (3) distinção de plantas originadas por autofecundação ou fecundação cruzada, (4) proteção de linhagens ou híbridos, (5) estudos de evolução, (6) estudos de filogenia, (7) detecção de pureza varietal, (8) monitoramento de cruzamentos e (9) estudos de diversidade e distância genética (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD) apresentam grande capacidade multiplex, que permite a análise de vários locos com a utilização de um único *primer* (oligonucleotídeo iniciador). O uso de vários primers em reação RAPD possibilita uma ampla cobertura genômica, permitindo ao geneticista um maior potencial de avaliação de grande número de marcadores, em curto espaço de tempo e baixo custo (Tingey *et al*, 1993). Nestes marcadores cada loco fornece dois alelos (dados binários), sendo a presença de banda interpretada como heterozigoto ou homozigoto dominante (alelo 1) e a ausência da banda como todos os demais alelos do loco (alelo 0) (Skroch, 1992). Como consequência da herança dominante dos locos RAPD fica dificultado o cálculo das frequências alélicas nas populações.

Marcadores microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR) possuem herança co-dominante, capacidade de detecção de vários alelos por loco, detectam e avaliam individualmente a variação existente em cada loco e apresentam distribuição por todo o genoma. Marcadores microsatélites altamente polimórficos e informativos são ideais para estudos de ligação, genética de populações e diversidade genética (Morgante *et al*, 1993). Marcadores microsatélites possibilitam o cálculo da frequência alélica, e comparativamente a outros marcadores, apresentam maior capacidade de detecção de variabilidade genética, traduzindo-se numa maior capacidade discriminatória. Esta maior capacidade de detecção de variabilidade genética ocorre (1) porque a pressão de seleção em microsatélites é pequena, permitindo que estes evoluam rapidamente, aumentando a variabilidade e (2) é possível a identificação de muitos alelos por loco.

A distinção de clones e cultivares, utilizando marcadores moleculares, é realizada através da estimativa da distância genética entre os genótipos avaliados. A distância genética ou similaridade genética (seu complemento) fornece uma estimativa da diferença, ou semelhança existente entre as unidades taxonômicas operacionais. As unidades taxonômicas operacionais são os genótipos cuja distância genética se deseja quantificar, podendo ser espécies, populações, cultivares, clones, indivíduos, etc.

Para se calcular a distância genética entre duas unidades taxonômicas operacionais são utilizadas as coincidências e distinções de bandas, obtidas através dos marcadores moleculares. Marcadores moleculares com herança co-dominante são mais informativos para a estimativa da distância genética porque possuem informação sobre a frequência dos alelos.

### **Arroz**

A observação das características agronômicas e morfológicas de duas cultivares de arroz irrigado gerou dúvidas de agricultores e melhoristas sobre a origem destas mesmas cultivares. A primeira cultivar (BR-IRGA 409\*) plantada em Roraima, possui o mesmo nome dado a uma cultivar largamente utilizada no Rio Grande do Sul. Como estas regiões apresentam condições climáticas muito diferentes e a adaptação e performance agronômica de uma cultivar a ambientes tão diferentes é complexa, a hipótese formulada foi de que se tratava, na realidade, de uma cultivar geneticamente distinta de BR-IRGA 409. A segunda cultivar é conhecida no Rio Grande do Sul como *Filipinho* (ou *Tailandês*) e tem *pedigree* desconhecido. Ela foi desenvolvida ou simplesmente comercializada a partir de linhagens e cultivares do programa de melhoramento genético de arroz da EMBRAPA e Instituto Riograndense do Arroz (IRGA).

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de identidade genética entre as duas cultivares conhecidas como BR-IRGA 409. Testou-se ainda a identidade genética da cultivar *Filipinho* em relação à cultivares do programa de melhoramento genético de arroz.

### **Batata**

Dois genótipos de batata (*Solanum tuberosum*), com características agronômicas e morfológicas distintas das variedades de batata cultivadas foram isolados no campo de sementes de batata da Estação da EMBRAPA de Canoíhas - SC. Os genótipos apresentam alta produtividade e alta qualidade de tubérculos. Após alguns anos de cultivo destes genótipos os melhoristas da EMBRAPA de Canoíhas e da EMBRAPA/CNPH - Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, demonstraram interesse em lançar no mercado esses dois genótipos como novas cultivares, contudo a desconhecida origem dos genótipos impede esta iniciativa. As possíveis origens dos genótipos são (1) contaminação genética, por mistura de materiais, brotações de tubérculos de materiais que permaneceram no campo de sementes, após outros cultivos, etc. e (2) mutação a partir das cultivares *Achat* e *Monalisa*, encontradas em cultivo na área, onde os dois genótipos foram coletados. No caso de comprovação da origem por mutação a EMBRAPA lançaria estes dois genótipos como novas cultivares (Márcio Elias Ferreira, comunicação pessoal).

O objetivo deste estudo foi avaliar a distância genética dos genótipos de origem desconhecida, AB-1 e AB-2 em relação as cultivares *Achat* e *Monalisa*, respectivamente.

### Materiais e Métodos

#### *Genótipos avaliados*

Para os testes de identidade de arroz irrigado foram utilizadas plantas das cultivares BR-IRGA 409 (plantado em RR), BR-IRGA 409 (plantado no RS), *Felipinho*, e oito cultivares e linhagens do programa de melhoramento genético: CICA 8, CNA 6860, CNA 7556, *Branquinho*, *Cachinho*, *Jequitibá*, *Metica I* e *Javaé*.

Para os testes de identidade de batata foram utilizadas as cultivares *Achat*, e *Monalisa* que poderiam ter originado, através de mutação, os genótipos AB-1 e AB-2, respectivamente e a cultivar *Elvira*.

#### *Extração de DNA*

O método de extração utilizado foi o mesmo descrito no Capítulo I para cacauzeiro. Para arroz foi utilizado tecido foliar de sementes germinadas e para batata, tecido foliar de plantas adultas. Tanto o DNA de arroz como o de batata foram utilizados após a primeira resuspensão em tampão TE, não sendo realizada a lavagem com NaCl e a segunda resuspensão em tampão TE.

#### *Quantificação do DNA*

O DNA foi quantificado e a sua qualidade avaliada, através de eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio, através de comparação com DNA de fago  $\lambda$ , com concentração conhecida. O DNA foi diluído em H<sub>2</sub>O, para uma concentração de 3 ng/ $\mu$ l e requantificado com eletroforese em gel de agarose 1 %.

#### *Marcadores moleculares utilizados*

Para realizar os testes de identidade entre os genótipos de batata foram utilizados marcadores RAPD e para realizar os testes de identidade entre as cultivares de arroz foram utilizados RAPD e microsátélites.

#### *Amplificação e visualização dos microsátélites em arroz*

As reações de amplificação na PCR foram preparadas seguindo a mesma metodologia da reação de PCR para RAPD, com modificações de componentes e de concentrações. O DNA foi amplificado num volume total de 20  $\mu$ l, sendo 3  $\mu$ l de DNA (3 ng/ $\mu$ l) e 17  $\mu$ l de coquetel (4,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O; 2,0  $\mu$ l DMSO 50 %; 2,0  $\mu$ l tampão 10 x [15 mM MgCl<sub>2</sub>]; 2,0  $\mu$ l dNTPs [2,5 mM]; 6,6  $\mu$ l primer [5 ng/ $\mu$ l] e 1 u Taq DNA polimerase [5 u/ $\mu$ l - Cenbiot-RS]). Sobre a reação foram adicionados 50  $\mu$ l de óleo mineral. O primeiro ciclo de amplificação foi 94° C (5 minutos),

## Capítulo II - Testes de Identidade

---

seguido por 29 ciclos de 94° C (1 minuto), 56° C (1 minuto), 72° C (2 minutos), e finalmente um ciclo 72° C (7 minutos).

Os primers para regiões microsátélites de arroz foram desenvolvidos em *Oryza glumaepatula* (Brondani, 1998) e cedidos para este experimento para confirmar os resultados de identidade obtidos com RAPD. A transferibilidade destes locos microsátélites entre genótipos de *O. glumaepatula* e *O. sativa* já havia sido comprovada.

Os microsátélites amplificados foram separados através de eletroforese em gel de agarose 3,5 % e também em gel de poliacrilamida (7 %) tanto sob condições normais como desnaturantes (7 M Uréia). Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata (*DNA Silver Staining System* - Promega) e fotografados.

### *Amplificação e visualização dos fragmentos RAPD*

O DNA foi amplificado e o produto da PCR visualizado, conforme descrito no Capítulo I.

### *Análise dos dados*

Dos marcadores RAPD polimórficos foram selecionados aqueles que apresentavam nitidez e consistência na repetição do experimento. Estes foram identificados como (1) para presença ou (0) para ausência em cada indivíduo e usados no programa NTSYS para as análises genéticas. A análise de similaridade genética entre cada par de acessos foi estimada com base no coeficiente de Jaccard. O método de Jaccard compara todos os genótipos entre si, avaliando três tipos de informações em relação aos marcadores binários gerados: (a) número de vezes em que os dois genótipos apresentam a banda, (b) número de vezes em que somente o primeiro genótipo apresenta a banda e (c) número de vezes em que somente o segundo genótipo apresenta a banda. O índice de similaridade genética é calculado por  $a/(a+b+c)$ , sendo desconsiderado os marcadores que estão ausentes para ambos os genótipos.

Uma matriz de similaridade para cada comparação dois a dois foi computada. Os dados da matriz foram utilizados para análise aglomerativa e hierárquica pelo método UPGMA (*Unweighted pair - grouping mean arithmetic*) e apresentados na forma de dendrogramas após análise de coordenadas parciais. Os marcadores microsátélites foram usados para comprovar os resultados dos marcadores RAPD.

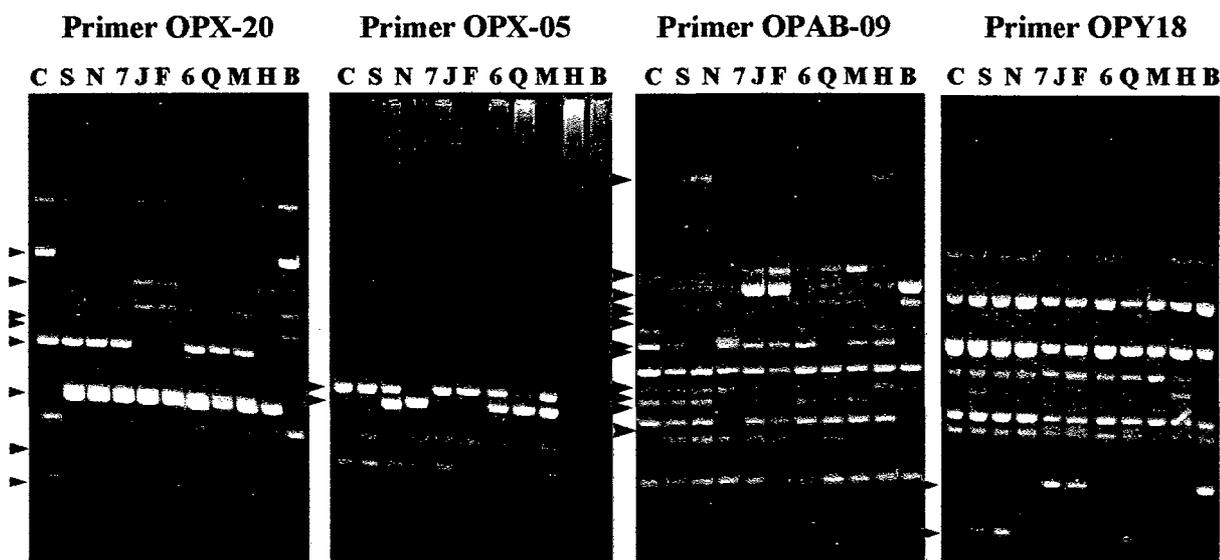
## Resultados

### **Arroz**

Dezesseis primers amplificaram 177 fragmentos RAPD, dos quais 62 (35 %) apresentaram polimorfismo. Este resultado demonstrou grande capacidade de detecção de polimorfismo dos

## Capítulo II - Testes de Identidade

marcadores RAPD nestes genótipos de arroz. A Figura 6 mostra a amplificação de alguns marcadores RAPD para os genótipos de arroz avaliados.



**Figura 6.** Amplificação de quatro primers RAPD no experimento de teste de identidade para 11 genótipos de arroz. Obs: (C) CICA 8, (S) BR-IRGA 409, plantado no RS, (N) BR-IRGA 409, plantado em RR, (7) CNA 7556, (J) *Javaé*, (F) *Felipinho*, (6) CNA 6860, (Q) *Jequetibá*, (M) *Metica I*, (H) *Cachinho*, (B) *Branquinho*. As setas indicam locos RAPD polimórficos.

O índice de similaridade genética encontrado com marcadores RAPD para as cultivares homônimas BR-IRGA 409 foi de apenas 0,59 (c. Jaccard), demonstrando que as cultivares homônimas BR-IRGA 409 são geneticamente distintas. Essa constatação rejeita a hipótese de que se tratava da mesma cultivar, sendo a cultivar plantada em Roraima, uma outra cultivar. Neste estudo não foi possível realizar a sua identificação, pois a cultivar plantada em Roraima diferiu geneticamente de todas as cultivares avaliadas neste estudo.

A cultivar *Felipinho*, com base nos dados obtidos com marcadores RAPD, apresentou coincidência de 100 % com o *fingerprinting* molecular observado na cultivar *Javaé*. Este resultado confirma a hipótese de identidade entre as duas cultivares, demonstrando que a cultivar denominada de *Felipinho* é geneticamente idêntica a cultivar *Javaé*. A Figura 7 mostra um dendrograma montado a partir do índice de similaridade genética encontrado para os genótipos de arroz avaliados (Tabela 4).

## Capítulo II - Testes de Identidade

Tabela 4. Índices de similaridade genética obtidos para as linhagens e cultivares de arroz, através do método de Jaccard.

	C	S	N	7	J	F	6	Q	M	H	B
Cica 8 (C)	1.000										
BR-IRGA 409 S	0.543	1.000									
BR-IRGA 409 N	0.545	0.595	1.000								
CNA 7556 (7)	0.324	0.326	0.385	1.000							
Javaé (J)	0.545	0.405	0.436	0.317	1.000						
Filipinho (F)	0.545	0.405	0.436	0.317	1.000	1.000					
CNA 6860 (6)	0.581	0.500	0.500	0.529	0.459	0.459	1.000				
Jequitibá (Q)	0.459	0.632	0.639	0.500	0.405	0.405	0.500	1.000			
Metica I (M)	0.474	0.561	0.488	0.553	0.386	0.386	0.639	0.524	1.000		
Cachinho (C)	0.438	0.459	0.429	0.400	0.500	0.500	0.548	0.432	0.447	1.000	
Branquinho (B)	0.286	0.178	0.190	0.231	0.282	0.282	0.297	0.205	0.191	0.243	1.000

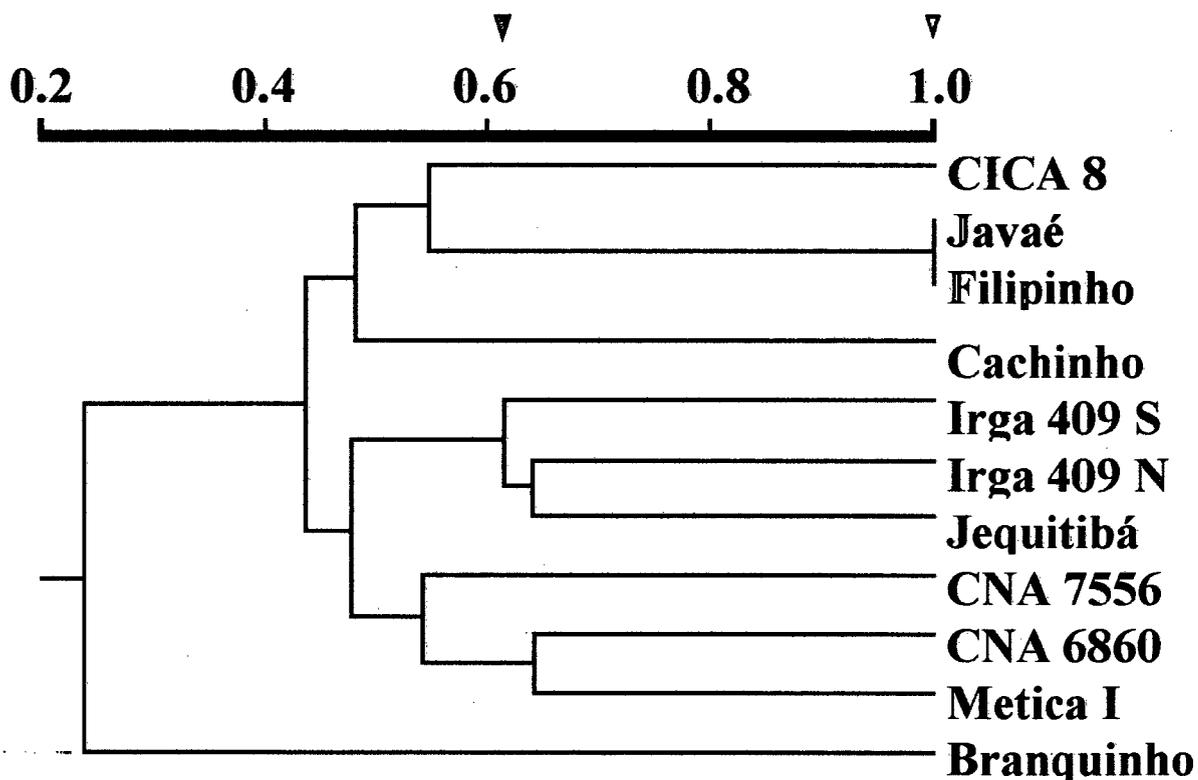
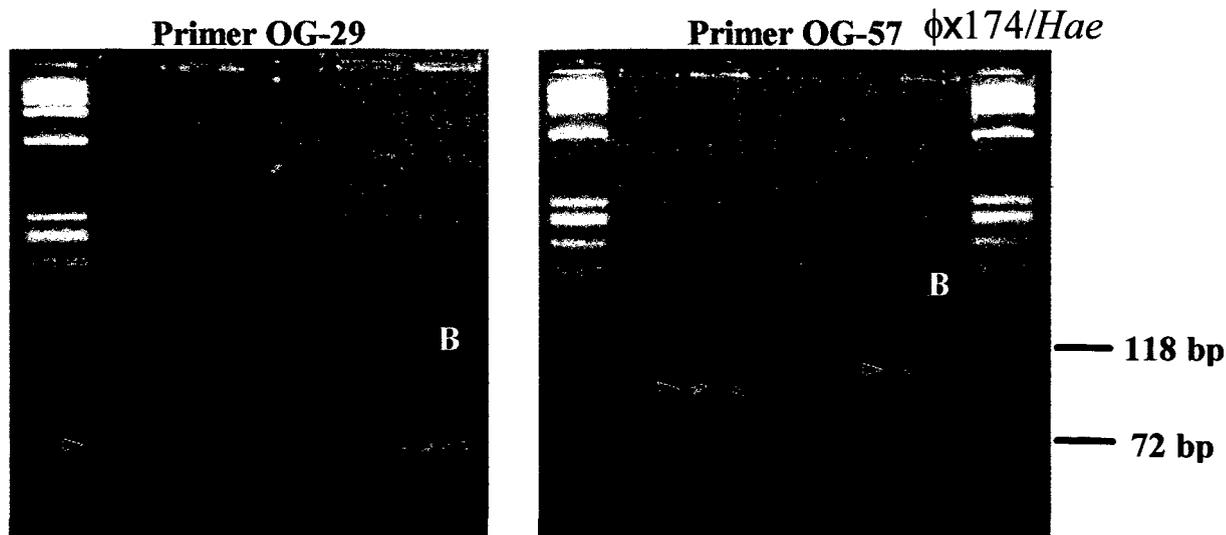


Figura 7. Similaridade genética existente entre os genótipos de arroz avaliados no teste de identidade.

A amplificação pela PCR dos locos microsatélites diferenciou geneticamente as cultivares homônimas BR-IRGA 409 e não diferenciou geneticamente as cultivares *Filipinho* e *Javaé* (Figura 8). Estes resultados corroboram os resultados obtidos com marcadores RAPD.

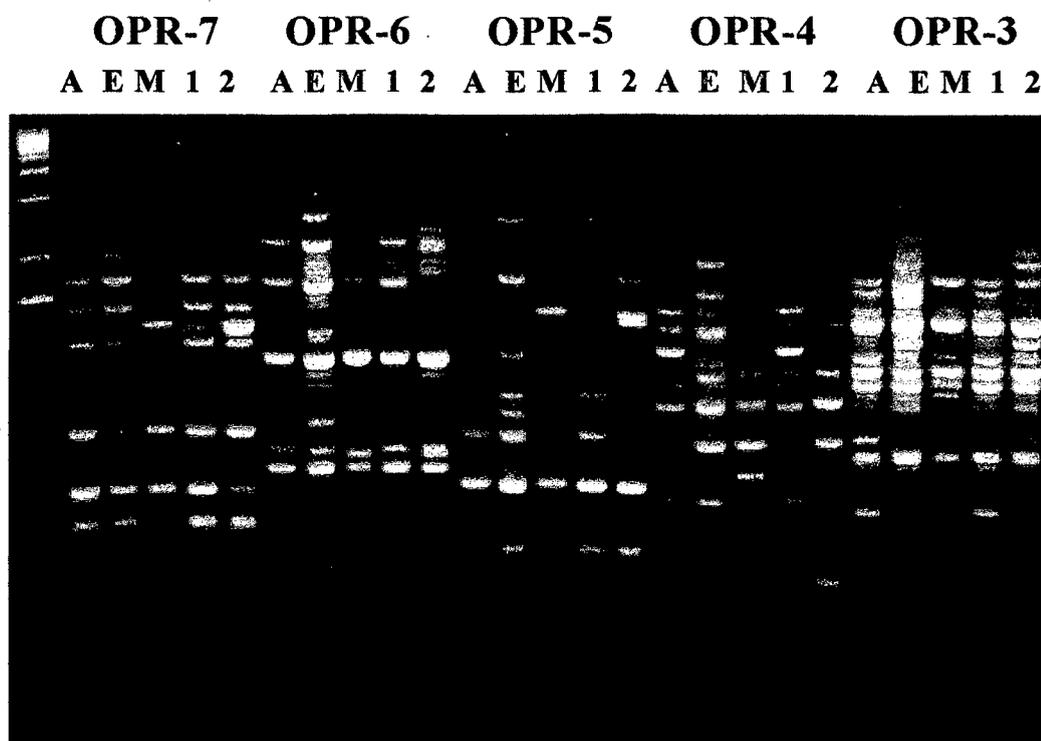


**Figura 8.** Amplificação de dois primers microsatélites em cinco genótipos de arroz, resolvidos em gel de agarose 3,5 %. Obs: (S) BR-IRGA 409, plantado no RS, (N) BR-IRGA 409, plantado em RR, (J) Javaé, (F) Felipinho e (B) Branquinho. As setas indicam locos polimórficos.

A resolução dos fragmentos amplificados de microsatélites foi superior em géis de poliacrilamida em relação à géis de agarose. Contudo, nenhuma diferença na migração relativa das bandas foi observada. Não foi observada diferença, entre gel de agarose e poliacrilamida, na resolução dos alelos amplificados. Todos os locos microsatélites amplificados, nas diferentes cultivares, apresentaram apenas uma banda, comprovando a homozigose esperada destas cultivares e linhagens de arroz.

### Batata

Dos 94 primers testados, 63 amplificaram 162 fragmentos polimórficos que foram usados para o cálculo do índice de similaridade genética (Jaccard). A Figura 9 mostra um gel com a amplificação de alguns primers RAPD, com os cinco genótipos avaliados.



**Figura 9.** Marcadores RAPD usados no experimento de teste de identidade de genótipos de batata. Obs: (A) *Achat*, (E) *Elvira*, (M) *Monalisa*, (1) AB-1 e (2) AB-2. A linha 1 contém padrão de peso molecular ladder 1 Kb.

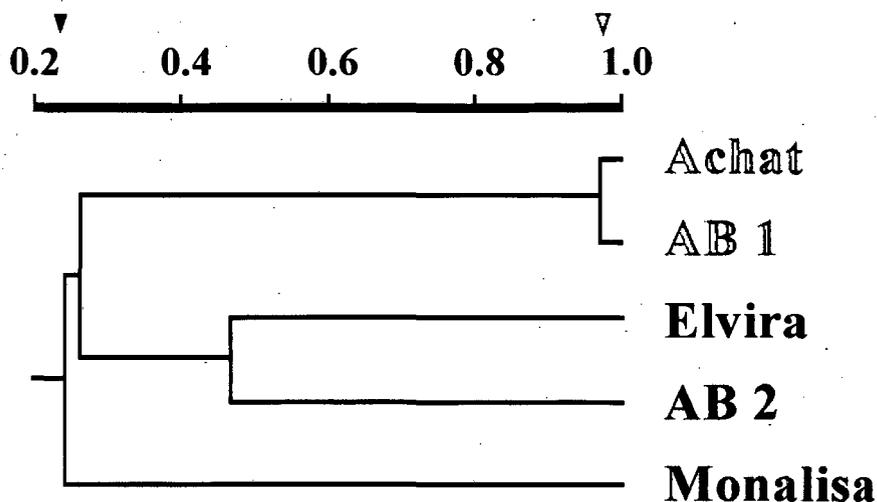
A Tabela 4 mostra os valores de similaridade genética obtidos para os genótipos de batata, através do método de Jaccard.

**Tabela 4.** Índices de Similaridade Genética obtidos para os genótipos de batata, através do método de Jaccard.

	<b>Achat</b>	<b>Elvira</b>	<b>Monalisa</b>	<b>AB 1</b>	<b>AB 2</b>
<b>Achat</b>	1.000				
<b>Elvira</b>	0.295	1.000			
<b>Monalisa</b>	0.222	0.228	1.000		
<b>AB 1</b>	0.968	0.288	0.224	1.000	
<b>AB 2</b>	0.238	0.468	0.296	0.231	1.000

A Figura 10 mostra graficamente os resultados da Tabela 4.

O baixo índice de similaridade genética entre a cultivar *Monalisa* e o genótipo AB-2 (29,6 %), descartam a possibilidade de origem por mutação a partir da variedade *Monalisa*. Esta constatação parte da premissa de que se uma planta é derivada de outra a partir de mutação do genoma, deve apresentar um alto índice de similaridade genética, pois na maior parte do genoma há homologia entre a planta original e o mutante.



**Figura 10.** Similaridade genética dos cinco genótipos de batata, obtidos através de marcadores RAPD.

O índice de similaridade genética entre a cultivar *Achat* e o genótipo AB-1 (96,8 %), não descarta a hipótese de que o genótipo AB-1 tenha sido originado por mutação a partir da cultivar *Achat*. Essa alta homologia encontrada entre os dois genótipos pode explicar a sua origem a partir da mutação. As duas bandas polimórficas encontradas entre os dois genótipos (3,2 %) podem ser de regiões cromossômicas que sofreram alteração genética, decorrentes da origem do genótipo AB-1.

## Conclusões

### Arroz

Os resultados (1) rejeitaram a identidade genética entre as cultivares homônimas BR-IRGA 409 plantadas em Roraima e no Rio Grande do Sul e, (2) confirmaram a identidade genética entre as cultivares *Filipinho* e *Javaé*, indicando que a cultivar denominada *Filipinho*, é na realidade, a cultivar *Javaé*, desenvolvida pelo programa de melhoramento genético de arroz da EMBRAPA e Instituto Riograndense do Arroz (IRGA). Estes resultados confirmam observações morfológicas realizadas em campos de plantio destas variedades e subsidiam iniciativas de proteção comercial das cultivares analisadas.

### Batata

Os resultados do teste de identidade realizado em batata concluíram (1) que o genótipo AB-1 pode ser realmente derivado por mutação da cultivar *Achat* e (2) que o genótipo AB-2 não é derivado da cultivar *Monalisa*, podendo se constituir de contaminação de plantas no campo de sementes.

## Referências Bibliográficas

- Bekele, F. L., Kennedy, A. J., Mc David, C., Lauckner, F. B., Bekele, I. Numerical taxonomic studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad. (1994). **Euphytica** 75: 231-240.
- Brondani, C., Brondani, R.P.V., Ferreira, M.E. (1998). Locus conservation and allelic diversity of SSR markers derived from different sources in wild and cultivated *Oryza* species. **Genetics and Molecular Biology**. Supplement 21 (3): 180.
- Chaparro, J. X., Werner, D. J., O'Malley, D., Sederoff, R. R. (1994). Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach. **Theor. Appl. Genet.** 87: 805-815.
- Dias, L. A. S. (1995). Biotecnologia e melhoramento genético do cacau (*Theobroma cacao* L.). **Agrotropica** 7 (1): 1-14.
- Dias, L. A. S., Kageyama, P. Y. (1995). Combining-ability for cacao (*Theobroma cacao* L.) yield components under southern Bahia conditions. **Theor. Appl. Genet.** 90: 534-541.
- Dias, L. A. S., Kageyama, P. Y. (1997). Multivariate genetic divergence and hybrid performance of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Genetics** 20 (1): 63-70.
- Ferreira, L. T. (1997). Cacau: clones tecnológicos, a salvação da lavoura do cacau. **Biotecnologia** 3: 20-24.
- Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. (1995). **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília. 220 p.
- Lanaud, C., Risterucci, A. M., N'Goran, A. K. J., Clement, M. H. (1997). **A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. Based on isozymes, RFLP, and RAPD markers**. III Plant Genome.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., Newburg, L. (1987). MAPMAKER: An interactive Computer Package for Constructing Primary Genetic Linkage Maps of Experimental and Natural Populations. **Genomics** 1: 171-181.
- Laurent, V., Risterucci, A. M., Lanaud, C. (1993a). Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. **Heredity** 71: 96-103.
- Laurent, V., Risterucci, A. M., Lanaud, C. (1993b). Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. **Theor. Appl. Genet** 87: 81-88.
- Morgante, M., Olivieri, A. M. (1993). PCR-Amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, 3 (1): 175-182.
- N'Goran, J. A. K., Laurent, V., Risterucci, A. M., Lanaud, C. (1994). Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity** 73: 589-597.
- Ronning, C. M., Schnell, R., Kuhn, D., Fritz, P. J. (1994). **Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in *Theobroma cacao* L.** II Plant Genome.
- Skröck, P., Tivang, J., Nienhuis, J. (1992). **Analysis of genetic relationships using RAPD marker data**. In: Proceedings of the symposium on applications of RAPD technology to plant breeding. CSSA/ASHS/AGA. pp 26-30.
- Tingey, S. V., Rafalski, J. A., Willians, J. G. K. (1993). Genetic analysis with RAPD markers. **Methods Enzymol.** 218: 704-740.