

Terezinha Aparecida Teixeira Cabral

MON
581.169
C117d
TES/mem

Divergência genética entre genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) estimada por análise de marcadores RAPD.

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Genética e Bioquímica, área de concentração em Genética, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Julio Cesar Viglioni Penna

Co-Orientador

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

581.169 C117d TES/FU
DIRBI - UFU UMU 01142/97



1000167970

UBERLÂNDIA

MINAS GERAIS - BRASIL

1997



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Divergência Genética Entre Genótipos de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) Estimada Por Análise de Marcadores RAPD

2 - ALUNO: Terezinha Aparecida Teixeira Cabral

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Julio Cesar Viglioni Penna

CO-ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

4 - DATA: 25/ 03/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Julio Cesar Viglione Penna

Titular Luiz Ricardo Goulart Filho

Titular Cláudio Manoel da Silva

Suplente Fernando César Juliatti

Suplente Carlos Machado dos Santos

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 09:15 Término - 10:10

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 10:10 Término - 11:15

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

Aos meus pais, pelo exemplo de trabalho e perseverança;

Ao meu esposo José Flavio, pelo amor, incentivo e compreensão.

Aos meus irmãos José, Múnico e Leila e minha sobrinha Bruna.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e graças concedidas;

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Viglioni Penna, pela oportunidade de realização deste trabalho, valiosa orientação e ensinamentos durante todo o curso;

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela orientação na parte molecular e sobretudo pelo seu exemplo de entusiasmo e incentivo à pesquisa;

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pela dedicação e empenho na implantação do curso de Mestrado em Genética e Bioquímica;

Ao Eng^o Agr^o Dr. Cláudio Manoel da Silva, pela participação na Banca Examinadora para defesa desta Tese e pelas sugestões apresentadas;

Aos Docentes do Departamento de Genética e Bioquímica pelos ensinamentos ministrados;

Aos Eng^{os} Agr^{os} Gismar Silva Vieira e Christiane Luiza Belele, pela amizade e ajuda incondicional durante toda a realização do trabalho;

Ao Médico Veterinário Maurício Borges, por sua valiosa contribuição na parte laboratorial.

Aos colegas do mestrado e do Laboratório de Genética Molecular: Adailton, Adelmo, Aparecida Célia, César, Juarez, Juliana, Kleber, Marta, Marcelo, Robson, Rosana, Vivian, Wânia e Warlei, pelo convívio e amizade.

Ao Eng^o Agr^o Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor pesquisador da EMBRAPA/CNPQ, por sua contribuição na análise estatística.

Ao Dr. Maurício Lopes pesquisador da EMBRAPA/CNPQ, por contribuir com “primers” e PVP.

Aos funcionários da Biblioteca da UFU, pelo atendimento e correções das referências bibliográficas.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos;

À FUNDAP, pelo financiamento de parte dos trabalhos realizados na tese;

À D. Maria Augusta, pelo carinho, amizade e acolhida.

Aos demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Técnicas moleculares: otimização, herança e repetibilidade.....	3
2.2. Marcadores moleculares e fenotípicos no estudo de parentesco genético.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material genético.....	14
3.2. Extração de DNA.....	16
3.3. Amplificação de DNA.....	16
3.3.1. Otimização da PCR.....	16
3.3.2. Amplificação com “primers” curtos.....	17
3.3.3. Amplificação com “primers” longos.....	19
3.4. Visualização dos produtos amplificados.....	19
3.5. Análise dos dados.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7. ANEXOS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o “primer” OPO-06 para 12 genótipos analisados.....	23
2	Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países e baseadas em 68 marcadores RAPD gerados por “primers” curtos.....	25
3	Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido pela combinação GOU1/GOU7 para oito genótipos analisados.....	26
4	Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países e baseadas em 14 marcadores RAPD gerados por “primers” longos.....	28
5	Dendrograma representando distâncias genéticas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países baseadas em 82 marcadores RAPD gerados por “primers” curtos e longos.....	29
6	Dendrograma representando distâncias genéticas entre 5 genótipos Sul Americanos baseadas em 68 marcadores RAPD gerados por “primers” curtos.....	30
7	Dendrograma representando distâncias genéticas entre 19 genótipos dos Estados Unidos e Velho Mundo baseadas em 68 bandas RAPD geradas por “primers” curtos.....	31

8	Dendrograma representando distâncias genéticas entre 12 genótipos da Europa, Ásia e África baseadas em 68 bandas RAPD geradas por “primers” curtos.....	32
9	Dendrograma representando distâncias genéticas entre 7 genótipos dos Estados Unidos baseadas em 68 bandas RAPD geradas por “primers” curtos.....	33
10	Correlação entre distâncias Euclidianas baseadas em marcadores fenotípicos e porcentagens de desacordo baseadas em marcadores RAPD gerados por “primers” curtos.....	34
11	Correlação entre complementos de Nei e Li baseados em marcadores RAPD gerados por “primers” curtos e distâncias Euclidianas baseadas em marcadores fenotípicos.....	35
12	Correlação entre porcentagens de desacordo obtidas pela análise de marcadores RAPD gerados por “primers” curtos e longos e distâncias Euclidianas obtidas da análise de marcadores fenotípicos.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Lista dos 24 genótipos de algodoeiro utilizados e seus respectivos países de origem.....	15
2	Lista dos 11 “primers” curtos utilizados para amplificar o DNA dos 24 genótipos e suas respectivas sequências de nucleotídeos.....	18
3	Lista de “primers” longos utilizados para amplificar o DNA dos 24 genótipos e suas respectivas sequências de nucleotídeos.....	19
4	Lista de “primers” curtos utilizados, número de bandas obtidas, tamanho estimado das bandas e número de bandas polimórficas.....	22
5	Lista de “primers” longos utilizados, número de bandas obtidas, tamanho estimado das bandas e número de bandas polimórficas.....	24

RESUMO

O conhecimento das distâncias genéticas entre indivíduos ou populações em um programa de melhoramento pode complementar informações fenotípicas auxiliando na escolha de indivíduos para hibridações e obtenção de populações segregantes com maior variabilidade. A técnica RAPD que detecta polimorfismos de seqüências de nucleotídeos baseada na amplificação de DNA, usando como iniciador um oligonucleotídeo de seqüência arbitrária ("primer"), tem vantagens que a torna indicada no uso rotineiro em estudos de parentesco genético. Os objetivos deste trabalho foram: identificar "primers" que gerem polimorfismos entre genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), comparar o efeito do tamanho de "primers" na determinação de polimorfismos, determinar distâncias genéticas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países utilizando a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) e comparar com resultados obtidos pela análise fenética destes 24 genótipos baseada na avaliação de 52 características qualitativas e quantitativas usando a taxonomia numérica. Os 24 genótipos foram avaliados pela técnica RAPD utilizando "primers" curtos e combinações de "primers" longos. Uma matriz foi montada de acordo com presença (1) e ausência (0) de bandas, sendo as distâncias calculadas pelas porcentagens de desacordo, complementos de Nei e Li e distâncias de Jacard e os grupamentos pelo método UPGMA. Os "primers" curtos geraram bandas polimórficas que foram eficientes na diferenciação dos genótipos, enquanto que os "primers" longos não conseguiram mostrar diferenças entre os genótipos. Comparando os três métodos para cálculo das distâncias genéticas, o método que melhor correlacionou com as

distâncias obtidas na análise de caracteres fenotípicos foi a porcentagem de desacordo, sendo que esta concordou em 93% com a distância de Jacard e em 91% com o complemento de Nei e Li. A máxima porcentagem de desacordo verificada entre os genótipos baseada nos polimorfismos gerados por “primers” curtos foi de 18%, indicando possivelmente uma base genética não tão ampla quanto revelada por caracteres fenotípicos. A correlação entre a análise fenotípica e análise com “primers” curtos foi moderada e negativa ($r=-0.43$).

ABSTRACT

Knowledge of genetic distances among individuals or populations in plant breeding programs can be used to complement phenotypic information and to help choose of individuals to breed for achievement of segregating populations with high variability. The RAPD technique detects nucleotide sequence polymorphisms in a DNA amplification-based assay using single primer of arbitrary nucleotide sequence. It has advantages that makes it a feasible technique for routine use in studies of genetic relationships. The objectives of this study were: to identify primers which produce polymorphisms among cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes, to compare the effect of primer length in generation of polymorphisms, to determine genetic distances among 24 cotton genotypes from eight countries using the RAPD technique comparing them with results obtained through phenetic analysis of the same genotypes based on 52 qualitative and quantitative characteristics using numerical taxonomy. The 24 genotypes were evaluated by the RAPD technique utilizing short primers and combinations of long primers. RAPDs were scored as presence (1) or absence (0) of prominent bands reproducible in duplicated PCR reactions. These data were subjected to analyses to produce a dissimilarity matrix based on Percent Disagreement, Nei & Li's complements and Jacard's distances. UPGMA was utilized to create dendrograms based on the genetic distance matrices. Short primers produced polymorphic bands that were efficient in distinguishing genotypes, while long primers couldn't distinguish differences among the genotypes. Comparing the three methods used for estimation of genetic

distances, the method that better dealt with distances obtained through analyses of the phenotypic characters was the Percent Disagreement. This method also agreed in 93% with Jacard's distances and 91% with Nei & Li's complements. The maximum percent disagreement found between pairs of genotypes based in the polymorphisms produced by short primers was 18%, possibly indicating a narrower genetic basis than with phenotypic analysis. The correlation among phenetic analysis and RAPD based on short primers, was moderate and negative ($r=-0.43$).

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Gossypium* compreende cerca de 50 espécies originárias da África, Américas do Sul e Central, Austrália, Galápagos e Havaí (FRYXELL apud REINISCH *et al.*, 1994). Entre estas espécies quatro são cultivadas comercialmente, produzindo fibras de alto valor têxtil, conhecidas desde tempos remotos, além de oferecer os mais variados subprodutos da fibra e semente. O algodoeiro “herbáceo”, “anual” ou “upland”, *Gossypium hirsutum* L., responde por cerca de 90% da produção mundial, sendo cultivado nas mais variadas condições ambientais.

No Brasil esta cultura tem importante papel econômico, e principalmente social, na absorção de mão-de-obra nas várias etapas de produção, beneficiamento, industrialização e comercialização.

O algodoeiro foi uma das primeiras espécies em que os princípios Mendelianos foram aplicados (BALLS apud SPARKS, 1995) e tem uma longa história de melhoramento genético, com ganhos relevantes na produtividade, no rendimento de pluma e na qualidade da fibra, dentre outros. Em um programa de melhoramento o conhecimento das distâncias genéticas relativas entre indivíduos ou populações permite melhor organização do germoplasma e uma amostragem mais eficiente de genótipos. Este conhecimento pode complementar informações fenotípicas auxiliando na escolha de indivíduos para hibridações e na obtenção de populações segregantes com maior variabilidade genética.

Na determinação de distâncias fenéticas é frequente o uso de caracteres morfológicos qualitativos e caracteres quantitativos. No entanto, este procedimento é

limitado quanto a obtenção de resultados fidedignos pois tais características podem sofrer interferência das interações genótipo x ambiente e também pela falta de níveis adequados de polimorfismos. Assim, inferências genéticas a partir de relações fenéticas podem apresentar distorções levando a erros nos processos de tomada de decisões em programas de melhoramento genético. Com o advento da biologia molecular outras técnicas utilizando a estrutura, organização e função do material hereditário têm sido usadas para determinar distâncias genéticas, na tentativa de resolver complicações advindas da análise de caracteres fenotípicos. Por isto, o uso de marcadores genéticos moleculares surge como poderosa ferramenta para análise de parentesco e diversidade genética.

Novos testes genéticos baseados na amplificação seletiva do DNA tornaram-se possíveis graças à tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Um destes testes detecta polimorfismos de seqüências de nucleotídeos baseado na amplificação de DNA, usando como iniciador um oligonucleotídeo de seqüência arbitrária ("primer"). Este procedimento, chamado RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), tem vantagens como: ser automatizado; não requerer informação sobre a seqüência de DNA; utilizar protocolos relativamente rápidos e fáceis; não usar radioatividade e requerer pequena quantidade de DNA. Sendo assim, marcadores RAPDs podem ser rotineiramente aplicados para questões específicas de germoplasmas, inclusive para estimar parentesco genético entre indivíduos em estudos populacionais intraespecíficos.

O presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: identificar "primers" que gerem polimorfismos entre genótipos de algodoeiro, comparar o efeito do tamanho de "primers" na determinação de polimorfismos, determinar distâncias genéticas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de oito países utilizando a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) e comparar com resultados obtidos por PENNA (1980) com a análise fenética dos mesmos 24 genótipos baseada na avaliação de 52 características qualitativas e quantitativas usando a técnica da taxonomia numérica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Técnicas moleculares: otimização, herança e repetibilidade

Informações sobre o parentesco ou a similaridade genética entre cultivares dentro de um banco de germoplasma têm aplicações importantes no melhoramento de plantas. Análises desta natureza auxiliam o melhorista na escolha de progenitores para cruzamentos, identificam linhagens e populações que devem ser mantidas para preservar a máxima diversidade genética em bancos de germoplasmas e podem indicar o melhor caminho a ser seguido para obtenção de resultados promissores (THORMANN, OSBORN, 1992).

Por muitos anos os melhoristas contaram com ensaios fenotípicos para analisar a divergência genética. A eficiência desta análise está em função de fatores que transcendem o genótipo. Assim, na tentativa de amenizar certas complicações advindas da avaliação do fenótipo, são propostos ensaios baseados na análise direta do DNA (TINGEY, RAFALSKI, WILLIAMS, 1992).

Técnicas simples para detecção de polimorfismos em seqüências de DNA foram desenvolvidas e têm valiosas aplicações na determinação de parentescos genéticos (THORMANN, OSBORN, 1992). A utilidade destes marcadores é determinada em grande parte pela tecnologia que é empregada para revelar os polimorfismos (TINGEY, RAFALSKI, WILLIAMS, 1992).

BOTSTEIN *et al.* (1980) desenvolveram uma técnica baseada na variação de posição de sítios de restrições de endonucleases entre genótipos. Estes marcadores que

foram chamados RFLPs (“Restriction fragment length polymorphisms”) são detectados pela hibridação de DNA, digerido com enzimas de restrição, com clones de DNA de seqüência conhecida (sondas) em “Southern blots”. Fragmentos de tamanhos idênticos de diferentes genótipos são interpretados como representando similaridades genéticas e fragmentos de tamanhos diferentes como diferenças genéticas (THORMANN, OSBORN, 1992). RFLPs fornecem a vantagem de um número ilimitado de marcadores polimórficos quando comparados com proteínas e enzimas variáveis (SKROCH, TIVANG, NIENHUIS, 1992).

Análise realizada em *Capsicum* sp com marcadores RFLP demonstrou haver boa correlação entre distâncias genéticas medidas por RFLPs e isoenzimas (PRINCE, LOAIZA-FIGUEROA, TANKSLEY, 1992). Em espécies e subespécies de *Musa*, análise filogenética e fenética baseada em RFLPs demonstrou coerência com análises baseadas na morfologia, com algumas exceções (GAWEL, JARRET, WHITEMORE, 1992). Muitas outras espécies tiveram seus DNAs analisados por RFLPs, contudo, o uso destes para estudos de organização de germoplasmas é limitado pelo custo e dificuldade de coleta dos dados (SKROCH, TIVANG, NIENHUIS, 1992).

Com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) outras técnicas foram desenvolvidas para detecção de polimorfismos de DNA pela amplificação de fragmentos específicos de DNA e separação dos fragmentos por eletroforese para visualização dos polimorfismos. Uma destas técnicas foi desenvolvida independentemente por WELSH, MCCLELLAND (1990) e WILLIAMS *et al.* (1990) e foi chamada RAPD (“Random amplified polymorphic DNA”). Este método se baseia na amplificação ao acaso do DNA alvo usando como iniciador (“primer”) um oligonucleotídeo com cerca de 10 bases de seqüência arbitrária sob condições de baixa estringência. O “primer” encontra várias seqüências complementares ao longo do genoma e quando tais seqüências estão a poucas centenas de pares de bases de distância umas da outra e em fitas opostas, a região inclusa pode ser amplificada pela polimerase. A ausência deste produto amplificado em outro indivíduo ou cultivar pode ser por causa da perda do sítio no DNA devido a mutação, deleção ou inserção (MURALIDHARAN, WAKELAND, 1993). De

acordo com os produtos amplificados, polimorfismos são revelados. Estes marcadores são fáceis de serem detectados pois não requerem informações sobre a seqüência de DNA a ser amplificada ou a síntese de “primers” específicos. Duas outras vantagens são a automatização do processo e a pequena quantidade de DNA requerida (THORMANN, OSBORN, 1992), pois podem ser amplificadas quantidades de DNA tão mínimas quanto as de um único grão de pólen (PETERSEN, JOHANSEN, SEBERG, 1996). Estas vantagens fazem com que marcadores RAPD sejam escolhidos para determinação de similaridades genéticas (THORMANN, OSBORN, 1992).

A técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) surgiu como uma poderosa ferramenta para detectar seqüências polimórficas. Consequentemente ela encontrou uso em uma variedade de aplicações incluindo mapeamento, identificação de espécies e cultivares e análise de parentesco. Contudo, esta técnica tem algumas limitações. Em geral estas limitações se referem aos marcadores de natureza dominante (não distinguem loci em estado heterozigoto) e a falta de reprodutibilidade entre reações de RAPD. Um estudo dialélico em *Pseudotsuga menziesii* e *Picea glauca* confirmou a herança dominante dos marcadores RAPD na geração F1 (CARLSON *et al.*, 1991).

Mudanças mínimas nas condições da reação podem afetar significativamente os produtos da amplificação. Um aspecto perturbador da análise RAPD é a amplificação de bandas de DNA de progênes que não são amplificadas nos DNAs dos pais. A banda não parental consiste de uma molécula heteroduplex formada entre duas seqüências alélicas de tamanhos diferentes. Estes dados demonstram que moléculas heteroduplex formadas entre produtos RAPD são uma potencial fonte de polimorfismo artificial que pode aparecer durante a análise. Portanto, em caso onde a freqüência de formação de heteroduplex é baixa, a técnica seria aplicável. Contudo, quando a freqüência desses produtos é alta, produtos RAPD devem ser separados em géis desnaturantes para assegurar a veracidade da análise (AYLIFFE *et al.*, 1994).

A reprodutibilidade dos padrões RAPDs é a maior preocupação de muitos pesquisadores e muitos laboratórios têm trabalhado para otimizar as condições de reação

com relação às suas condições particulares: amostra de DNA, reagentes e equipamentos. A comparabilidade de diagnósticos de marcadores RAPD produzidos por diferentes laboratórios permanece desconhecida. Comparando padrões de amplificação de 13 DNA polimerases comerciais nota-se que todas polimerases que derivam de *Thermus aquaticus* produzem padrões similares de amplificação, enquanto que todas polimerases de outras fontes (exceto, Tfl de *Thermus flavus*) amplificaram muito pouco ou nenhum produto. Portanto, diagnósticos com marcadores RAPD identificados em diferentes laboratórios podem não necessariamente ser permutáveis e condizentes, a não ser que as mesmas condições de reação e, em particular, o mesmo tipo de polimerase forem usadas (SCHIERWATER, ENDER, 1993).

A marca da polimerase, do termociclador, a temperatura de anelamento e o “primer”, são importantes fatores na obtenção de bons rendimentos e padrões de fragmentos de DNA. Cada “primer” tem sua temperatura ótima de anelamento e isto não está correlacionado com o conteúdo de GC do “primer” (WOLFF, SCHOEN, RIJN, 1993).

A amplificação do DNA em PCR é significativamente afetada pela temperatura, concentração de Mg^{++} , “primer” e DNA molde. Comparando duas concentrações de “primer” e DNA molde, diferenças quantitativas e qualitativas são encontradas. Algumas bandas detectadas em baixas concentrações (15 ng de “primer” e 25 ng de DNA) estão ausentes em produtos de alta concentração (45 ng “primer” e 100 ng de DNA) enquanto que novas bandas aparecem. Um outro problema é que em altas concentrações muitos produtos atingem níveis detectáveis sem produzir bandas definidas, transtornando a análise. Se este efeito de concentração de DNA e “primer” em RAPD não é reconhecido, ele pode levar a problemas de reprodutibilidade (MURALIDHARAN, WAKELAND, 1993).

Os comprimentos de oligonucleotídeos com seqüências arbitrárias usados para amplificação de seqüências de DNA são variáveis, 20 bp para AP-PCR (“arbitrarily primed PCR”) (WELSH, MCCLELLAND, 1990), 10 a 12 bp para RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) (WILLIAMS *et al.*, 1990) e 5 pb para DAF (“DNA amplification fingerprinting”) (CAETANO-ANÓLLES, BASSAM, GRESSHOFF, 1991). A variação do

tamanho dos fragmentos da PCR é dependente do método usado, sendo até 500 bp para AP-PCR e DAF e 300 a 4.000 bp para RAPD. Variações nos padrões RAPD são observados entre termocicladores e entre polimerases. A reprodutibilidade dia a dia é excelente quando o termociclador tem um controle termal preciso. Um estudo de reprodutibilidade para RAPD é extensivo a AP-PCR e DAF que, em princípio, são similares ao RAPD. A menos que sejam padronizadas as reações de amplificações, o método RAPD não permite a constituição de banco de dados de padrões para identificação de raças de microrganismos (MEUNIER, GRIMONT, 1993).

As herdabilidades de produtos de amplificação que representam polimorfismos genômicos parecem seguir as leis Mendelianas. O método RAPD pode gerar padrões de bandas variáveis que não são devido a variação genética e que são chamadas artefatos. Estes artefatos contribuem para a não reprodutibilidade e perda de confiabilidade do método em estudos genéticos. Condições não adequadas durante a reação de amplificação levam a formação dos artefatos. A concentração do DNA, temperatura de anelamento e concentração de Mg^{++} são as principais fontes de artefatos relatadas em RAPD. Um alto nível de padronização e controle é necessário para que os produtos gerados pelo RAPD sejam reproduzíveis, marcados com confiança e resolvidos consistentemente entre reações amplificadas separadamente. A presença de variação artificial em padrões de bandas RAPD mostra a importância da padronização da concentração do DNA por meio da análise espectrofotométrica. Cada "primer" pode requerer otimização com relação às condições de amplificação (ELLSWORTH, RITTENHOUSE, HONEYCUTT, 1993).

A pureza do DNA molde é crucial para a reprodutibilidade dos resultados, enquanto a concentração do molde pode variar de 3 a 30 ng por 25 μ l de reação sem afetar seriamente o padrão RAPD. A concentração de "primer" e Mg^{++} também pode variar de 2 a 5 vezes e ainda manter o padrão de produtos RAPD. Análises de segregação indicam que quase todo registro de RAPD em populações segregantes de ervilha e maçã refletem variações genéticas verdadeiras que podem ser alocadas aos respectivos mapas de ligação. Entretanto, equívocos nos registros foram evidentes e pareceram ser atribuídos à

contaminação do DNA molde ou pequena quantidade do produto amplificado. É concluído que a técnica RAPD ou suas modificações, mostraram ser vantajosas para mapeamento genético e possivelmente identificação varietal. Resultados menos controlados como aplicações em estudos de diversidade genética ou filogenética devem requerer interpretação mais cautelosa (WEEDEN *et al.*, 1992).

Picea glauca e *Picea engelmannii* e seus híbridos são difíceis de serem diferenciados morfológicamente. Quatro “primers” de 10 bases mostraram produtos de amplificação espécie-específicos. A consistência e reprodutibilidade desses produtos foram avaliados em mais de duas reações de amplificação. De acordo com as frequências dos produtos acima citados, é possível estimar a fração híbrida indicativa de verdadeira introgressão entre as duas espécies (KHASA, DANCNIK, 1996).

2.2. Marcadores moleculares e fenotípicos no estudo de parentesco genético

Um estudo de variabilidade genética baseado em marcadores RFLP e RAPD em espécies do gênero *Arachis* demonstrou baixo nível de variabilidade entre cultivares americanas de *Arachis hypogaea* L. e abundante variabilidade entre espécies selvagens do mesmo gênero. Isto sugere que hibridações envolvendo as diferentes espécies do gênero, podem ser utilizadas para aumentar a variabilidade da espécie cultivada (HALWARD *et al.*, 1991).

O uso de marcadores RAPD mostrou-se eficiente na construção de dendrograma sumarizando relações genéticas entre 25 acessos de *Azolla*. Os resultados sugerem que marcadores RAPD podem ser usados para estudos de classificação e filogenética neste gênero (VAN COPPENOLLE *et al.*, 1993).

No estudo de similaridade genética entre genótipos de *Brassica oleracea* usando marcadores RAPD e RFLP, SANTOS *et al.* (1994) concluíram que RAPDs fornecem resultados equivalentes a RFLPs.

Análises baseadas em marcadores moleculares podem ser usadas com sucesso para estudos filogenéticos entre espécies de *Allium*. A avaliação de um maior número de cultivares de cada espécie e outras espécies selvagens próximas das espécies cultivadas seria desejável e permitiria a construção de dendrogramas menos tendenciosos e mais detalhados. Assim outras espécies selvagens com potencial em programas de melhoramento poderiam ser identificadas (WILKIE, ISAAC, SLATER, 1993). Quando a distância genética intraespecífica em alho (*Allium sativum* L.) é avaliada por dados morfológicos dois grupos são identificados, entretanto, MAAß, KLAAS (1995) trabalhando com isoenzimas e RAPDs obtiveram três grupos.

A relação genética e taxonômica entre populações de *Abies nebrodensis* e *Abies alba* analisadas por RAPD e aloenzimas mostram clara diferenciação entre estas espécies e fornecem suporte para a classificação em dois diferentes grupos taxonômicos (VICARIO *et al.*, 1995).

Um alto nível de variação em padrão de fragmentos foi observada entre e dentro de espécies do gênero *Hordeum* quando “primers” de 10 bases foram usados para amplificação ao acaso de DNA. Os fenogramas construídos confirmaram parentesco prévio entre as espécies analisadas. Foi sugerido que devido ao grande número de polimorfismos gerado por cada primer, a análise RAPD seria mais precisa na investigação de parentesco entre populações de uma mesma espécie ou espécies muito próximas, que entre espécies menos relacionadas (GONZÁLEZ, FERRER, 1993).

Em um estudo realizado com híbridos e variedades de cana-de-açúcar para determinar a diversidade de DNA, duas metodologias foram utilizadas baseadas na tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase. Um método utilizou como “primer” oligonucleotídeos de 10 bases de seqüência arbitrária e o outro utilizou microsátélites e telômeros específicos. Os resultados mostraram que os “primers” específicos (microsátélites e telômeros) não são adequados para determinação de diversidade de DNA, mas indicados para o desenvolvimento de uma metodologia de rotina, na identificação de variedades de cana-de-açúcar (HARVEY, BOTHA, 1996).

As similaridades genéticas entre oito cultivares de centeio foram estimadas usando as técnicas RFLP e RAPD. Foram observados 53 fragmentos polimórficos por RFLP e 94 fragmentos polimórficos por RAPD. A estimativa de parentesco genético baseada nos produtos RFLP concordou mais com a genealogia das cultivares, quando comparado com os resultados do RAPD. O uso de amostras em “bulk” do DNA nestas análises afetaram mais a sensibilidade dos ensaios de RAPD. O dendrograma produzido com todos os fragmentos, RAPD e RFLP, refletiram melhor o parentesco entre as cultivares que dendrogramas baseados em apenas um tipo de marcador. Isto reflete a importância do número de marcadores usados na determinação de parentesco genético entre genótipos (LOARCE, GALLEGO, FERRER, 1996).

Marcadores RAPD são confiavelmente hábeis na diferenciação entre subgrupos de *Coffea arabica* e fornecem uma ferramenta molecular poderosa no estudo da distribuição da diversidade genética desta espécie. Podem também ser usados para detectar introgressão interespecífica natural e artificial entre *C. canephora* e *C. arabica* por meio da identificação de produtos espécie-específicos. Marcadores RAPD têm o potencial para unir o convencional e biotecnológico no melhoramento do café (OROZCO-CASTILLO *et al.*, 1994).

Quando análises filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos, aloenzimas e marcadores RAPD foram realizadas em ervilha (*Pisum*) confirmou-se a forte relação entre espécies selvagens e cultivadas proposta por vários estudos sistemáticos. Os dados RAPD suportam o mesmo agrupamento feito pelos dados morfológicos e aloenzimas e fornecem informações adicionais respeitando a relação entre os taxons. Visto que, RAPDs são relativamente rápidos e fáceis para uso, são imunes a muitas influências ambientais, podem ser gerados em grande número e podem complementar caracteres tradicionais, constituem um valioso recurso para estudos filogenéticos (HOEY, CROWE, JONES, 1996).

Dendrogramas construídos para estudos intra e interespecíficos do gênero *Rosa* utilizando primers de 10 bases mostraram uma boa correlação com classificações prévias feitas por diferentes autores baseadas em estudos morfológicos. Os resultados indicaram

que RAPD é uma técnica sensível e precisa para análise genômica em rosa (MILLAN *et al.*, 1996).

Utilizando homozigotos próximos de genótipos elite de algodão derivados de hibridação interespecífica e representantes típicos de *Gossypium hirsutum* e *G. barbadense*, dendrogramas foram gerados a partir de distâncias genéticas obtidas com RAPDs e distâncias taxonômicas médias obtidas com dados morfológicos. A classificação de todos os genótipos baseado nos dois métodos fornece resultados similares, com correlação de 0.63 entre distancia genética e distância taxonômica. Este experimento demonstra que análise RAPD pode fielmente determinar relações genéticas dentro de um germoplasma diverso de *Gossypium* (TATINENI, CANTRELL, DAVIS, 1996).

Quatorze populações de *Panicum virgatum* L. representando ecótipos de planície e planalto foram avaliadas quanto a diversidade genética por meio de marcadores RAPD. Embora a relação entre o nível de ploidia e o ecótipo permanecesse obscura, perfis de RAPD podem ser usados para identificar populações desta espécie e na predição de parentesco genético entre germoplasmas experimentais e populações liberadas para plantios (GUNTER *et al.*, 1996).

Resultados similares foram obtidos aplicando as técnicas RFLP e RAPD com respeito a estrutura genética de *Theobroma cacao* L. Desta maneira, RAPDs parecem ser tão eficientes quanto RFLPs para classificação de genótipos de cacão (N'GORAN *et al.*, 1994).

DEMEKE *et al.* (1996) trabalhando com RAPD em batata concluíram que medidas de similaridade associadas à análise da coordenada principal refletiram a direção esperada em relação a irmãos germanos e meio irmãos neste vegetal. Entretanto, houveram importantes exceções nas quais variedades relacionadas demonstraram ser geneticamente diferentes, como se não tivessem nenhum parentesco próximo. Os dados sugeriram que análise RAPD deve ser usada conjuntamente com informações da genealogia para fornecer uma medida mais fidedigna da divergência genética.

Em inhame (*Dioscorea bulbifera* L.) também ficou claro que a análise com RAPDs é altamente informativa para estimar a diversidade genética bem como padrões de parentesco genético entre cultivares (RAMSER *et al.*, 1996).

Em mamão (*Carica papaya* L.) STILES *et al.* (1993) construíram um dendrograma de 10 cultivares baseado em polimorfismos produzidos por 11 “primers”. Os autores concluíram que a técnica RAPD é precisa, rápida e sensível para análise genômica de cultivares.

Polimorfismos de DNA entre trinta e oito clones pertencentes a três variedades de *Camellia sinensis* foram detectados por RAPD. Análise de diversidade genética baseada nestes RAPDs mostrou-se consistente com a presente classificação taxonômica e com os “pedigrees” conhecidos de alguns clones. A análise RAPD também distinguiu todos os 38 clones comerciais, mesmo aqueles que não podem ser distinguidos com base em caracteres morfológicos (WACHIRA *et al.*, 1995).

Marcadores RAPD em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) foram usados para identificar cultivares. Foram utilizados 14 “primers” de 10 bases para amplificar DNA genômico de amostras de folhas de 15 cultivares de origens Européia, Japonesa e Norte Americana. Foram observados um total de 79 produtos amplificados, onde 55 foram polimórficos e bandas cultivar-específicas foram verificadas com 13 “primers”. Os padrões de amplificação obtidos por dois deles foram suficientes para distinguir todas as cultivares (KONGKIATNGAM *et al.*, 1996).

Raphanus sativus e *Sinapis alba* são distinguidos de taxons *Brassica* com o uso de RAPDs. Cultivares de repolho e couve-flor também podem ser separados por RAPD. Marcadores RAPD parecem ter uso para estudos taxonômicos a nível de variação de populações, espécies e talvez gênero (DEMEKE, ADAMS, CHIBBAR, 1992).

Distâncias genéticas entre cultivares de arroz (*Oryza sativa* L) estimadas de padrões de bandas RAPD correlacionaram alta e positivamente com distâncias estimadas por coeficientes de parentesco ($r=0.59$). RAPDs podem ser usados para classificação de

cultivares de arroz, porém, muitos “primers” são necessários para distinguir cultivares muito próximas (MACKILL, 1995).

A identificação fenotípica de linhagens e cultivares melhoradas é uma atividade crítica para companhias e laboratórios de sementes. Esta identificação permite não apenas controlar a propagação e comercialização de seu germoplasma, mas também controlar a qualidade de seus produtos. Em *Brassica oleracea* L. marcadores RAPD discriminam cultivares de brócolos e couve-flor por padrões de bandas. Marcadores gerados por dois “primers” em brócolos e três “primers” em couve-flor foram suficientes para distinguir cada uma das cultivares (HU, QUIROS, 1991).

Marcadores RAPD gerados por 30 primers foram usados para impressões digitais em 12 cultivares e uma linhagem de *Gossypium hirsutum* e uma cultivar de *G. barbadense*, todas de origem Australiana. Dos 453 marcadores identificados, 15.2% estavam presentes apenas na cultivar de *G. barbadense*. Dos marcadores restantes 33.3% estavam em todas 13 cultivares de *G. hirsutum*. Análise de agrupamento de distância genética estimada entre as cultivares revelaram estreita concordância com a conhecida filogenia das cultivares. Dez das cultivares de *G. hirsutum* puderam ser caracterizadas individualmente baseado em marcadores RAPD cultivar-específicos, sendo assim possível diferenciar cultivares muito próximas por marcadores moleculares (MULTANI, LYON, 1995).

3. Material e Métodos

3.1. Material genético

As sementes dos 24 genótipos da espécie *Gossypium hirsutum* L. usados neste trabalho foram cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Esta última cedeu sementes por meio do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPA) e do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN). Na Tabela 1 estão listadas os genótipos e seus respectivos países de origem. Estes genótipos não representam uma amostragem aleatória das cultivares plantadas nos oito países de origem e tampouco os países representam amostra aleatória dos países que cultivam o algodoeiro.

O plantio foi realizado em 02 de Setembro de 1996 em vasos de 3 litros colocados em casa de vegetação localizada no Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, e com cobertura que permitia a passagem de 50% dos raios solares. O substrato foi 1/3 de adubo orgânico e 2/3 de terra de barranco. A adubação foi efetuada de acordo com análise de solo e recomendação da “IV Aproximação do Estado de Minas Gerais” (Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais, 1989). Foram semeadas cinco sementes de cada genótipo por vaso, sendo que três plantas tiveram suas folhas jovens (aproximadamente 10 dias contados a partir do aparecimento dos primórdios foliares) amostradas (uma por planta) em “bulk” para extração do DNA.

Tabela 1 - Lista dos 24 genótipos de algodoeiro utilizados e seus respectivos países de origem.

Nº Identificação	Genótipos	País de Origem (Abreviação)
01	IAC-13-1	BRASIL (BR)
02	IAC-RM4-SM5	BRASIL (BR)
03	Minas Dona Beja	BRASIL (BR)
04	SU 0450/8909	BRASIL (BR)
05	4959	BULGÁRIA (BU)
06	6396	BULGÁRIA (BU)
07	4F	PAQUISTÃO (PQ)
08	Del Cerro	PERU (PE)
09	SK 14	TAILÂNDIA (TH)
10	CA(68)41	UGANDA (UG)
11	Acala SJ-5	EUA (EU)
12	Coker 5110	EUA (EU)
13	Deltapine Land 16	EUA (EU)
14	Lankart LX 571	EUA (EU)
15	Paymaster 303	EUA (EU)
16	Stoneville 213	EUA(EU)
17	Westburn M	EUA(EU)
18	149-F	ex-URSS (UR)
19	153-F	ex-URSS (UR)
20	2421	ex-URSS (UR)
21	C-4727	ex-URSS (UR)
22	Tashkent-1	ex-URSS (UR)
23	Tashkent-2	ex-URSS (UR)
24	Tashkent-3	ex-URSS (UR)

3.2. Extração de DNA

Das três folhas jovens colhidas, 300 mg foram maceradas em nitrogênio líquido imediatamente após a colheita e a extração do DNA procedeu-se de acordo com o protocolo modificado de DOYLE, DOYLE (1990) pela adição de polivinilpirrolidone (PVP-40). O macerado foi transferido para tubos de eppendorf de 2 ml e imediatamente foram adicionados 600 µl do tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris HCl 100 mM pH 8.0, PVP-40 1% e de β mercaptoetanol 0.2%). Em seguida os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos. Após incubação foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sendo o produto centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. Nesta etapa proteínas e fragmentos celulares foram separados na parte inferior do tubo e o DNA ficou na fração sobrenadante, sendo esta transferida para outro tubo. Esta etapa foi repetida para se apurar a qualidade do DNA. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol à -20°C e o “pellet” recolhido foi lavado com etanol 70%. Após a secagem do “pellet”, o DNA foi ressuscitado em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0.01 mM, pH 8.0) com 10 µg/ml de RNase e incubado a 37°C por 30 minutos. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm (leitura do DNA) e 280 nm (leitura de proteínas) e corrido em gel de agarose 1,2% para comprovação da qualidade do DNA. Em seguida foi armazenado em refrigerador à -80°C. Na época da amplificação o DNA foi diluído em água ultrapura para uma concentração final de 10 ng/µl.

3.3. Amplificação de DNA

3.3.1. Otimização da PCR

Um experimento preliminar foi instalado para avaliação de cinco programas para amplificação em um termociclador PTC-100 MJ Research, Inc. com os seguintes

tratamentos: **(1)** 5 min a 94° C, 45 ciclos de 1 min a 94° C, 2 min a 37° C, 2 min a 72° C e término com 7 min a 72° C; **(2)** 5 min a 94° C, 10 ciclos de 40 seg a 94° C, 90 seg a 30° C, 90 seg a 72° C e 30 ciclos de 40 seg a 94° C, 60 seg a 55° C, 70 seg a 72° C; **(3)** 5 min a 94° C, 45 ciclos de 1 min a 94° C, 2 min a 45° C, 2 min a 72° C e para finalizar 7 min a 72° C; **(4)** 5 min a 94° C, 45 ciclos de 15 seg a 94° C, 15 seg a 36° C, 30 seg a 72° C e para finalizar 2 min a 72° C) e **(5)** similar ao quarto com aumento no tempo de extensão à 72° C para 60 seg. As diferentes temperaturas utilizadas em cada programa são responsáveis pelas etapas envolvidas na amplificação do DNA, na seguinte ordem: desnaturação do DNA (94° C), anelamento do “primer” ao DNA (36° C a 55° C) e extensão da fita complementar de DNA (72° C). As concentrações dos reagentes foram as seguintes: 30 ng de DNA da cultivar Acala SJ-5, 1 U de Taq polimerase, 0.200 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.2 μM de primer (OP L12), sendo o volume completado com água ultrapura para 25 μl. Estas condições estão de acordo com TATINENI *et al.* (1996) com modificação na concentração de MgCl₂ de 4 mM para 2 mM.

Para otimização da reação de amplificação um outro experimento foi montado utilizando o “primer” L12 da “Operon Technologies” nas seguintes condições: três concentrações de “primer” (0,24; 0,32 e 0,4 μM), quatro concentrações de Mg⁺⁺ (1,125; 1,500; 2,000 e 2,250 mM), três quantidades de Taq polimerase por reação (0,75; 1,00 e 1,50 U), cinco concentrações de dNTPs (0,05; 0,10; 0,20; 0,40 e 0,80 mM de cada dNTP) e duas quantidades de DNA (25 e 50 ng por reação). O volume de cada reação foi completado com água ultrapura para 25 μl. Utilizou-se para este ensaio, o quinto programa descrito acima e o mesmo termociclador.

3.3.2. Amplificação com primers curtos

Vinte e quatro “primers” de 10 bases da “Operon Technologies” (OP) foram avaliados (A01 a A15, L04, L11, L13, L15, O02, O05, O06, O08 e O18). Para a avaliação

destes “primers” foram utilizados DNAs extraídos dos genótipos Acala SJ-5 e IAC-RM4-SM5. Cada reação contou com um volume total de 25 µl, com os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 U Taq polimerase, 2 mM de MgCl₂, 0,05 mM de cada dNTP, 0,32 µM de “primer” e o volume foi completado com água ultrapura. Foi utilizado o mesmo programa (5) usado para otimização da reação.

Dos 25 “primers” avaliados, 11 (Tabela 2) foram utilizados para amplificar os DNAs dos 24 genótipos, seguindo as mesmas condições descritas acima. A reação de amplificação foi repetida para cada cultivar. Portanto, cada cultivar teve seu DNA amplificado duas vezes.

Tabela 2 . Lista dos 11 “primers” curtos utilizados para amplificar o DNA dos 24 genótipos e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

“Primer”	Sequência
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPL-04	5'-GACTGCACAC-3'
OPL-11	5'-ACGATGAGCC-3'
OPL-15	5'-AAGAGAGGGG-3'
OPO-02	5'-ACGTAGCGTC-3'
OPO-06	5'-CCACGGGAAG-3'

3.3.3. Amplificação com primers longos

Foram avaliadas três combinações de “primers” desenvolvidos no laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia: GOU01/GOU07, GOU03/GOU10 e GOU8/GOU9 (Tabela 3). As condições da reação de amplificação foram as mesmas descritas para a amplificação com primers curtos. A única alteração foi feita no programa, e foi utilizado o primeiro programa (1).

Tabela 3 . Lista de “primers” longos utilizados para amplificar o DNA dos 24 genótipos e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

“Primer”	Sequência
GOU-01	5'-CTTTAATTCCATATGCCTAAGCGGG-3'
GOU-03	5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3'
GOU-07	5'-AACGCGGCACACATAGTTTT-3'
GOU-08	5'-CGAAAGTCTTAGTAACATAT-3'
GOU-09	5'-TAAATAAAGGTTACTGTT-3'
GOU-10	5'-CTCGAACCTTCCCATTTC-3'

Obs: Y=C,T; N=A,C,G,T

3.4. Visualização dos produtos amplificados

Os fragmentos oriundos da amplificação foram separados em géis de poliacrilamida (PAGE) 6% a 100 V por 4 horas e então corados em uma solução com brometo de etídeo (5 µg/ml). Os padrões de bandas foram visualizados e fotografados em um transiluminador UV. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas. Somente foram considerados os polimorfismos mais intensos presentes nas duas reações executadas.

Toda etapa laboratorial foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

3.5. Análise dos dados

Uma matriz foi montada de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas reproduzíveis e mais intensas. Esta matriz foi usada para calcular as seguintes distâncias genéticas:

- Porcentagem de Desacordo (PD) = N'_{AB} / N_T (PUTERKA *et al.*, 1993)
- Distância de Jacard (DJ) (%) = $\{1 - [a / (n-d)]\} \times 100$ (SNEATH, SOKAL apud KAGA *et al.*, 1996);
- Complemento de Nei e Li (CNL) (%) = $[1 - 2 N_{AB} / (N_A + N_B)] \times 100$ (NEI, LI, 1979)

onde, N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os dois genótipos comparados, N_T é o número total de bandas, a é o número de bandas presentes nos dois genótipos comparados, n é o número total de bandas, d é o número de bandas ausentes nos dois genótipos, N_{AB} é o número de bandas comuns aos dois genótipos, N_A é o número de bandas presentes no genótipo A e N_B é o número de bandas presentes no genótipo B.

O programa STATISTICA foi utilizado para calcular porcentagem de desacordo entre todos os possíveis pares de entradas e o programa CALC - DIST foi usado para calcular Distância de Jacard e Complemento de Nei e Li. De acordo com as porcentagens de desacordos o mesmo programa utilizou o método UPGMA (“unweighted pair-group method using arithmetic averages”) para agrupar os genótipos e construir os dendrogramas. Este mesmo programa foi utilizado para estimar o coeficiente de correlação simples (r) entre distâncias genéticas comparando duas a duas, sendo que, o quadrado deste coeficiente é a correlação entre estas duas distâncias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção de DNA de alta qualidade, foi de extrema importância a adição de polivinilpirrolidone (PVP-40) no tampão de extração. Várias tentativas de extrações foram realizadas sem PVP-40 e resultaram em DNA de baixa qualidade e quantidade. Isto se deveu ao fato de que células do algodoeiro contêm alto teor de terpenóides fenólicos e tanino. Estes compostos ligam-se ao DNA após a ruptura celular e não podem ser removidos por métodos convencionais de extração. O PVP (solúvel) complexando com os polifenóis impede que eles se liguem ao DNA, sendo posteriormente removidos da solução no momento da centrifugação (JOHN, 1992). As leituras espectrofotométricas e eletroforese dos DNAs extraídos comprovaram a boa qualidade do DNA.

Na amplificação com "primers" curtos, tanto o programa com etapas demoradas (1) quanto o programa rápido (5) foram eficientes. Trabalhando com o programa rápido obteve-se uma economia de 2 horas em cada reação. Entretanto, quando "primers" longos foram utilizados, programas rápidos não funcionaram, exigindo etapas mais longas, principalmente na etapa de anelamento, sendo neste caso o programa 1 o mais eficiente.

Quanto aos componentes da reação, as concentrações que revelaram bandas mais consistentes foram: 0,32 μ M de "primer"; 2 mM de $MgCl_2$; 0,05 mM de cada dNTP; 1 U de Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA por reação. Reações com 0,4 e 0,8 mM de cada dNTP não tiveram fragmentos amplificados e a concentração de 0,05 mM não se diferenciou de 0,10 mM deste mesmo reagente, quanto aos resultados obtidos.

Dos 24 “primers” curtos (10 bases de comprimento) avaliados, 11 geraram maior número de bandas e produtos com melhor definição e por isto foram utilizados para amplificar o DNA dos 24 genótipos. Estes 11 “primers” geraram 68 bandas, o que representa uma média de 6,18 bandas por “primer”. Estas bandas, apresentaram tamanhos estimados na faixa de 300 a 2600 pb e 30 delas foram polimórficas, ou seja, foi obtido 44.12% de polimorfismos (Tabela 4). A Figura 1 representa o padrão obtido com o “primer” OPO-06 para 12 genótipos e é apresentada como ilustração.

Tabela 4 . Lista de “primers” curtos utilizados, número de bandas obtidas, tamanho estimado das bandas e número de bandas polimórficas

Primer	Bandas amplificadas		
	Total de bandas	Tamanho (pb)	Bandas Polimórficas
OPA-01	3	1550-2000	1
OPA-02	5	800-1600	2
OPA-03	5	520-1400	3
OPA-09	5	600-1100	1
OPA-10	8	480-1070	3
OPA-15	5	580-1500	2
OPL-04	8	450-930	4
OPL-11	8	620-1950	4
OPL-15	3	300-630	1
OPO-02	5	600-1150	3
OPO-06	13	450-2600	6

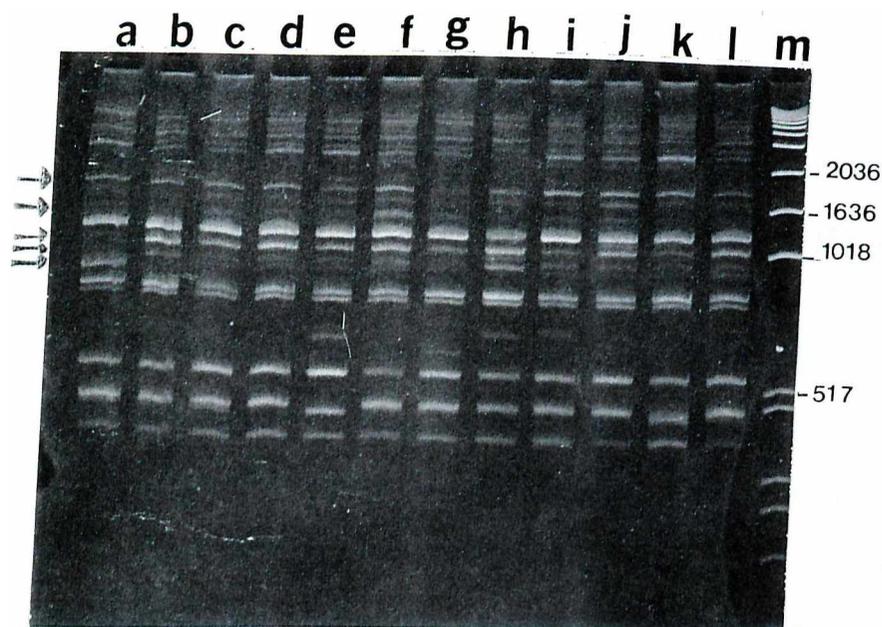


Figura 1 . Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o “primer” OPO-06 para 12 genótipos analisados. A seqüência de genótipos partindo da esquerda é a seguinte: (a) Stoneville 213, (b) Westburn M, (c) 149-F, (d) 153-F, (e) 2421, (f) C-4727, (g) Tashkent 1, (h) Tashkent 2, (i) Tashkent 3, (j) IAC-13-1, (k) 4F, (l) Lankart LX 571 e m (DNA marcador de peso molecular 1 kb “Ladder”). As setas indicam polimorfismos mais evidentes.

A matriz de distâncias genéticas entre os genótipos, construída com base na presença e ausência das bandas e calculada por meio do método de porcentagem de desacordo, está apresentada no Anexo 1. Estas distâncias variaram entre 1% (entre os genótipos Coker 5110 e Lankart LX 571) e 18% (entre os genótipos 153-F e IAC-13-1 ou 2421 e IAC-13-1, dentre outros pares). As distâncias genéticas baseadas nos complementos de Nei e Li variaram entre 1% (Coker 5110 e Lankart LX 571) e 12% (2421 e IAC-13-1, Minas Dona Beja e 4959, Deltapine Land 16 e 153-F) (Anexo 2). Encontrou-se alta correlação ($r=0.95$) entre as matrizes obtidas por meio da porcentagem de desacordo e dos complementos de Nei e Li.

A análise de agrupamento baseada nas porcentagens de desacordo utilizando o método UPGMA ao nível de 12% de distância genética (Figura 2), definiu dois grupos, o

grupo A com 23 genótipos e o grupo B com um genótipo (C-4727). Considerando um limite de 10% de dissimilaridade genética, o grupo A foi dividido em 6 subgrupos: o subgrupo A1 com os genótipos IAC-13-1, 4959 e Tashkent 1; o subgrupo A2 com 6396, Paymaster 303, SK 14 e Stoneville 213; o subgrupo A3 com IAC-RM4-SM5, 149-F, 153-F, Minas Dona Beja, 2421, SU 0450/8909, Del Cerro, CA(68)41, Coker 5110, Lankart LX 571, Acala-SJ-5 e 4F; o subgrupo A4 com Deltapine Land 16; o subgrupo A5 com Westburn e Tashkent 2 e o subgrupo A6 com Tashkent 3. Portanto, C-4727 foi o genótipo mais divergente e os pares de genótipos com divergência inferior a 4% foram: Coker 5110 e Lankart LX 571, 6396 e Paymaster 303, SU 0450/8909 e Del Cerro. Analisando a tabela com as distâncias e o dendrograma vê-se que os 24 genótipos estão relativamente próximos, indicando possivelmente uma base genética não muito ampla.

As três combinações de “primers” longos geraram 14 bandas que variaram entre 150 e 520 bp de comprimento (Tabela 5). A média de bandas por combinação foi 4.67, portanto uma média menor que aquela obtida por “primers” curtos. Das 14 bandas, cinco foram polimórficas o que representa 35,71%.

Tabela 5 - Lista de “primers” longos utilizados, número de bandas obtidas, tamanho estimado das bandas e número de bandas polimórficas

Combinação de “primers”	Bandas amplificadas		
	Total	Tamanho (pb)	Bandas polimórficas
GOU 01/07	6	160-520	2
GOU 03/10	4	150-360	2
GOU 08/09	4	160-480	1

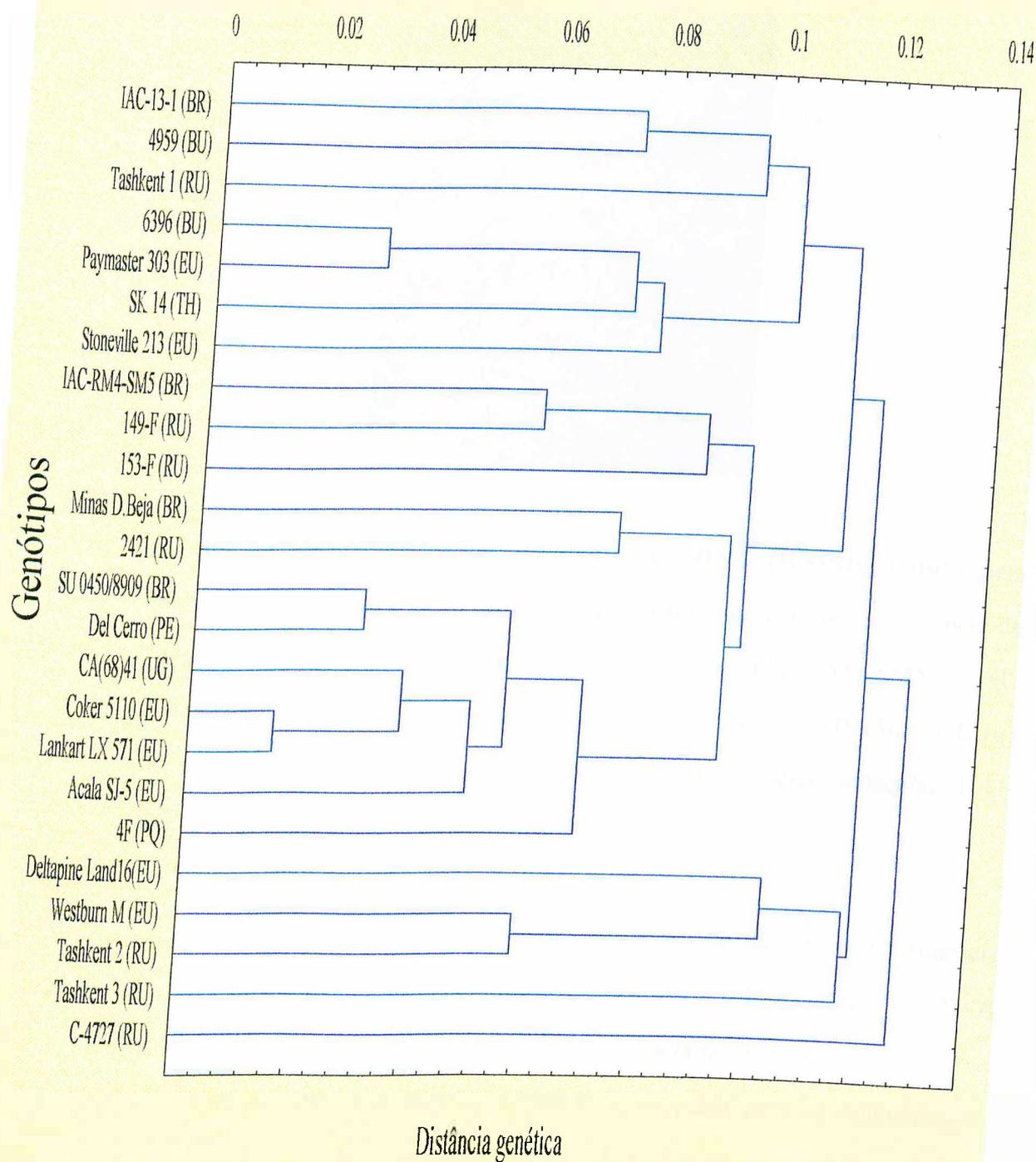


Figura 2. Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países e baseadas em 68 marcadores RAPD gerados por “primers” curtos.

A Figura 3 mostra o padrão de bandas obtido com a combinação GOU01/GOU07 para 8 genótipos e é apresentada como ilustração.

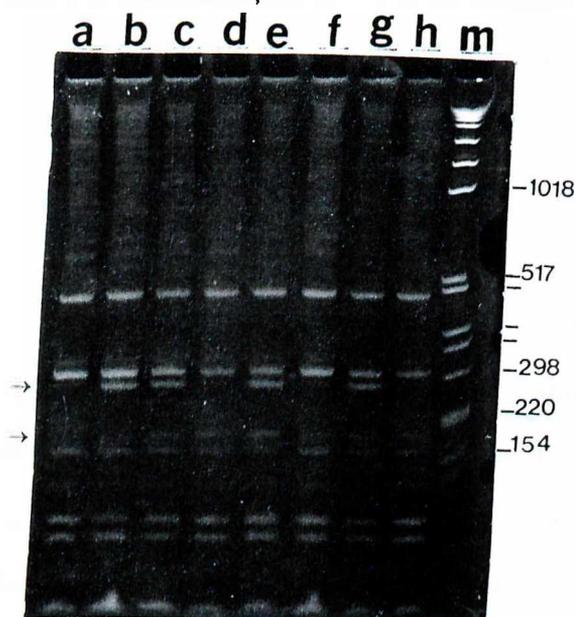


Figura 3 . Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido pela combinação GOU1/GOU7 para oito genótipos analisados. A seqüência de genótipos da esquerda para a direita é a seguinte: (a) IAC-RM4-SM5, (b) SU 0450/8909, (c) Paymaster 303, (d) C-4727, (e) Tashkent 2, (f) IAC-13-1, (g) 4F, (h) Lankart LX 571 e m (DNA marcador de peso molecular 1 kb “Ladder”). As setas indicam polimorfismos.

As dissimilaridades estimadas entre os genótipos e baseadas na presença e ausência das bandas obtidas utilizando-se os “primers” longos apresentaram valores entre 0 e 29%. A matriz de dissimilaridades entre todos os genótipos é apresentada no Anexo 3.

Neste caso a análise de agrupamento (Figura 4) mostrou poucos conjuntos de genótipos. A 19% de distância genética estimada, os genótipos foram divididos em dois grupos, o grupo A com 22 genótipos e o grupo B com dois (2421 e C-4727). Considerando um limite de 11%, verifica-se que o grupo A foi dividido em dois subgrupos, A1 com 5 genótipos (IAC-13-1, Lankart LX 571, 4F, Paymaster 303 e Tashkent 2) e A2 com 17 (IAC-RM4-SM5, Minas Dona Beja, Del Cerro, CA(68)41, Acala SJ-5, Coker 5110, Deltapine Land 16, Stoneville 213, Westburn M, 153-F, 4959, SK 14, SU 0450/8909,

6396, 149-F, Tashkent 1 e Tashkent 3). O grupo B também foi dividido em dois grupos sob o mesmo nível de distância genética, subgrupos B1 com o genótipo 2421 e B2 com C-4727. Estes "primers" foram hábeis na identificação dos grupos, porém, não conseguiram mostrar as diferenças entre os genótipos, diferentemente dos "primers" curtos que foram mais eficientes na diferenciação dos genótipos.

Quando reunimos os dados obtidos com "primers" curtos e longos obtivemos um total de 82 bandas, uma média de 5.86 bandas por "primer", das quais 35 foram polimórficas (42,68%). As porcentagens de desacordo entre os genótipos (Anexo 4) variaram entre 2% (Acala SJ-5 e Coker 5110; Coker 5110 e Lankart LX 571) e 20% (IAC-13-1 e 2421). Os complementos de Nei e Li (Anexo 5) variaram entre 2% (Del Cerro e SU 0450/8909, CA(68)41 e Coker 5110, Acala SJ-5 e Coker 5110, CA(68)41 e Lankart LX 571, Coker 5110 e Lankart LX 571) e 13% (IAC-13-1 e 2421). As distâncias de Jacard resultaram nas distâncias genéticas do Anexo 6 que variaram entre 3% (Acala SJ-5 e Coker 5110, Coker 5110 e Lankart LX 571) e 22% (IAC-13-1 e 2421). Os resultados obtidos por meio das porcentagens de desacordo foram mais coerentes com as distâncias de Jacard do que com os complementos de Nei e Li, isto foi confirmado pelos coeficientes de correlação: entre porcentagens de desacordo e distâncias de Jacard ($r=0.96$) e entre porcentagens de desacordos e complementos de Nei e Li ($r=0.95$).

O dendrograma baseado nas porcentagens de desacordo (Figura 5) mostra que a nível de 14% de distância genética os genótipos foram divididos em dois grupos: A com 23 genótipos e B com um genótipo (C-4727). Considerando um limite de 11%, o grupo A foi dividido em quatro subgrupos: A1 com três genótipos (IAC-13-1, 4959 e SK 14); A2 com 17 (SU 0450/8909, Del Cerro, CA(68)41, Lankart LX 571, Acala SJ-5, Coker 5110, 4F, 149-F, 153-F, 2421, 6396, Paymaster 303, Stoneville 213, Tashkent 1, Deltapine Land 16, Westburn M, e Tashkent 2,); A3 com um (Tashkent 3) e A4 com dois (IAC-RM4-SM5 e Minas Dona Beja). Os genótipos brasileiros ficaram dentro de um mesmo grupo, no entanto apenas dois (Minas Dona Beja e IAC-RM4-SM5) em um mesmo subgrupo. Os pares de

genótipos Acala SJ-5 e Coker 5110, SU 0450/8909 e Del Cerro, 6396 e Paymaster 303 tiveram dissimilaridades menores que 4%.

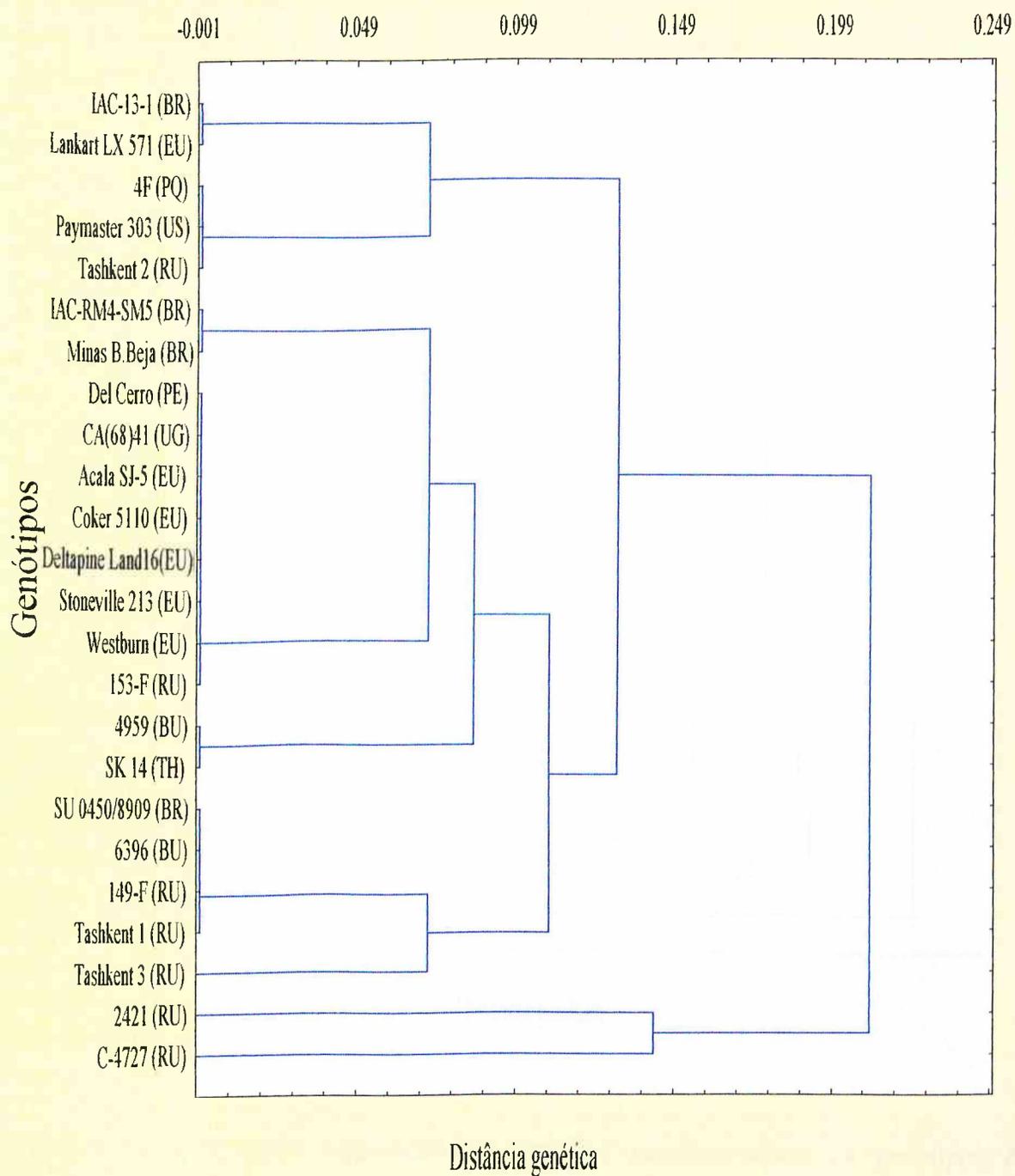


Figura 4 . Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países e baseadas em 14 marcadores RAPD gerados por “primers” longos.

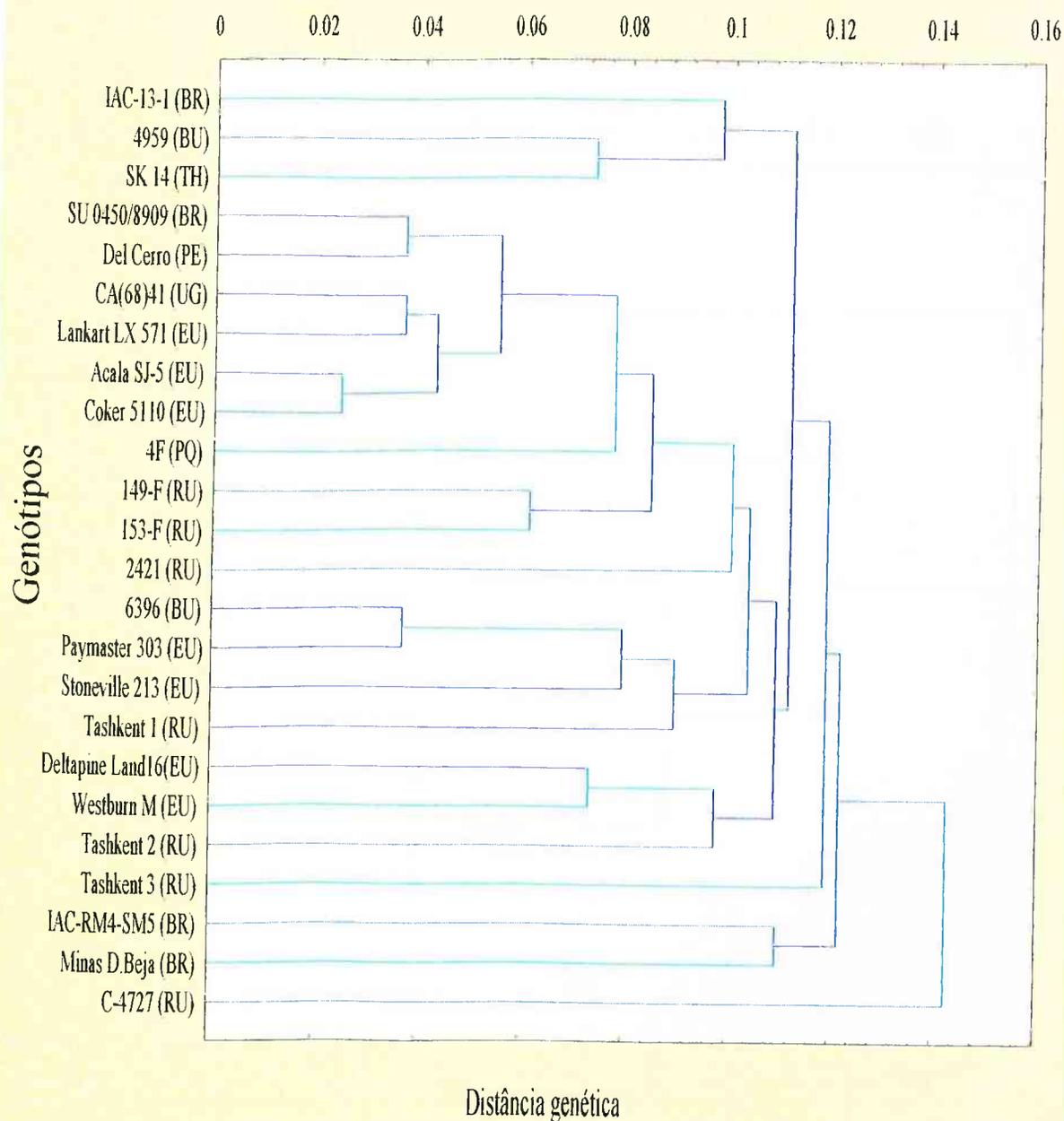


Figura 5 . Dendrograma representando distâncias genéticas entre 24 genótipos de algodoeiro oriundos de 8 países baseadas em 82 marcadores RAPD gerados por “primers” curtos e longos.

O dendrograma construído a partir das porcentagens de desacordo entre os cinco genótipos Sul Americanos baseadas nas 68 bandas geradas por “primers” curtos, mostra

que o genótipo mais divergente foi IAC-13-1 e os genótipos mais próximos foram SU 0450/8909 e Del Cerro (Figura 6).

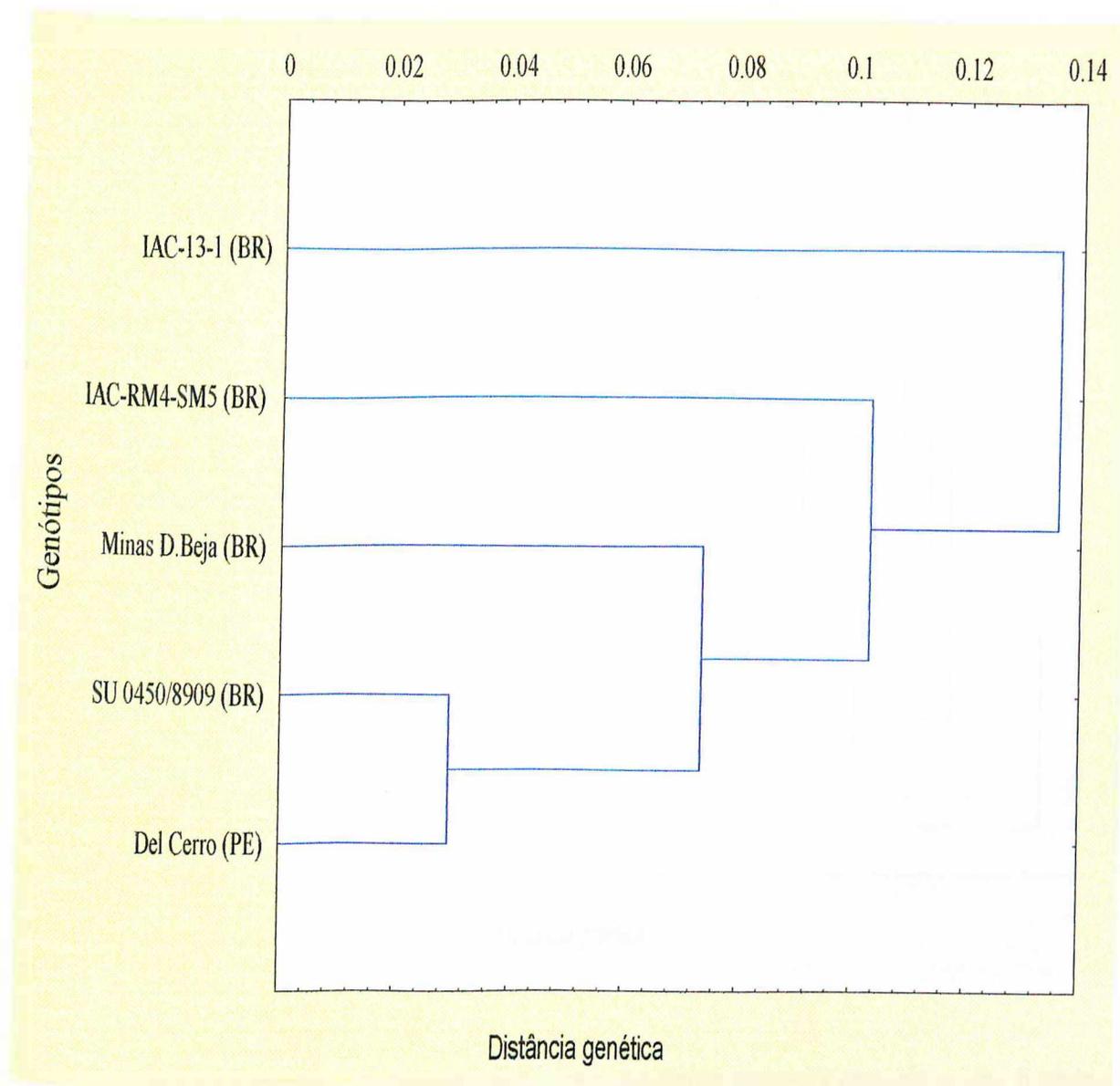


Figura 6 . Dendrograma representando distâncias genéticas entre 5 genótipos Sul Americanos baseadas em 68 marcadores RAPD gerados por “primers” curtos.

Quando 19 genótipos são considerados, ou seja, dos 24 genótipos são excluídos os cinco Sul Americanos, não houve separação de grupos de acordo com a origem dos genótipos (Figura 7).

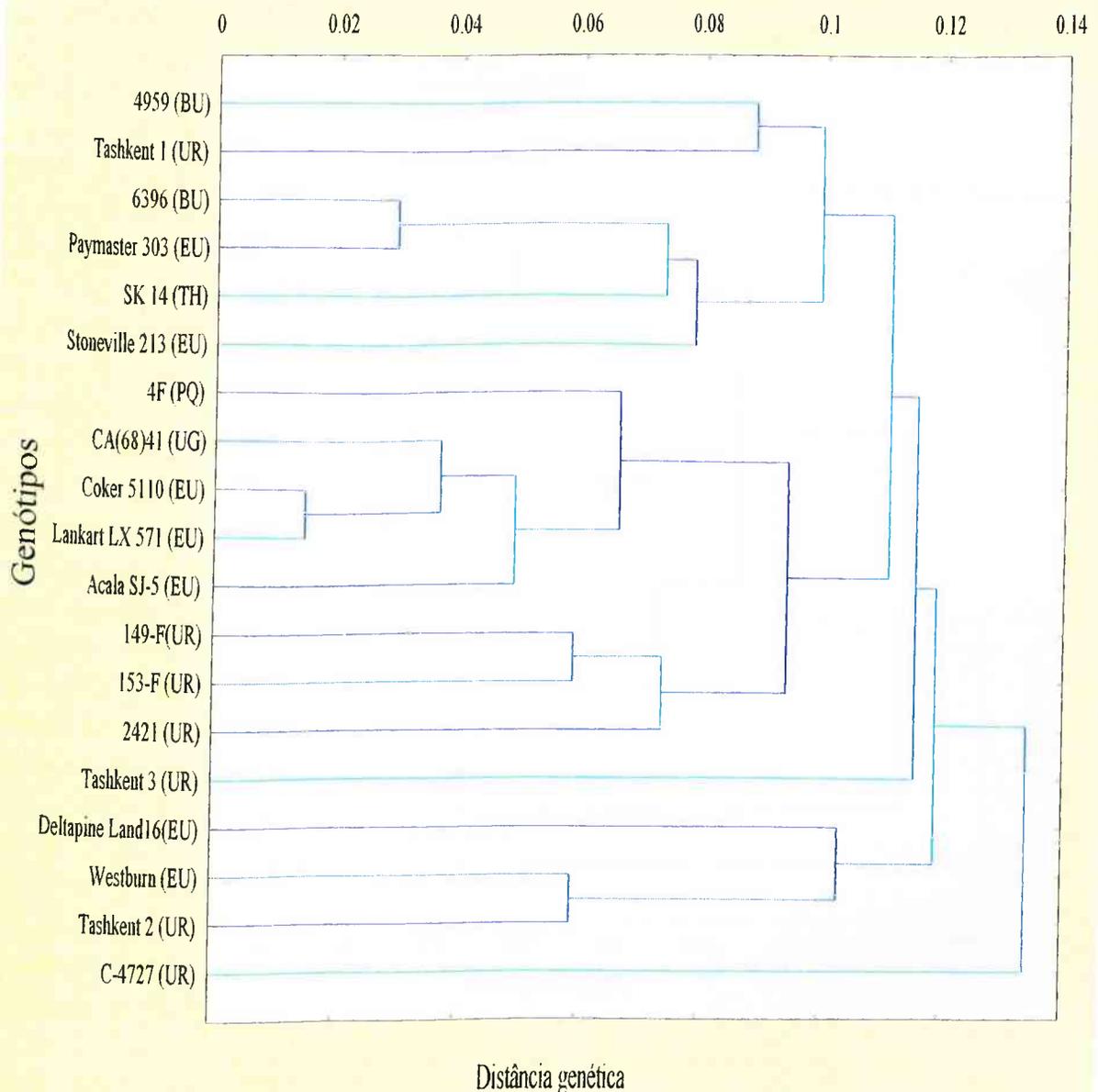


Figura 7. Dendrograma representando distâncias genéticas entre 19 genótipos dos Estados Unidos e Velho Mundo baseadas em 68 bandas RAPD geradas por “primers” curtos.

O dendrograma da Figura 8 mostra o agrupamento de 12 genótipos da Europa, Ásia e África, a partir de porcentagens de desacordo baseadas em marcadores RAPD gerados por “primers” curtos. Considerando um limite de 10%, os genótipos 4F, SK 14, CA(68)41

e Tashkent 3 fazem parte de um mesmo grupo, com destaque para 4F e SK 14 que se mostram muito próximas (6% de dissimilaridade).

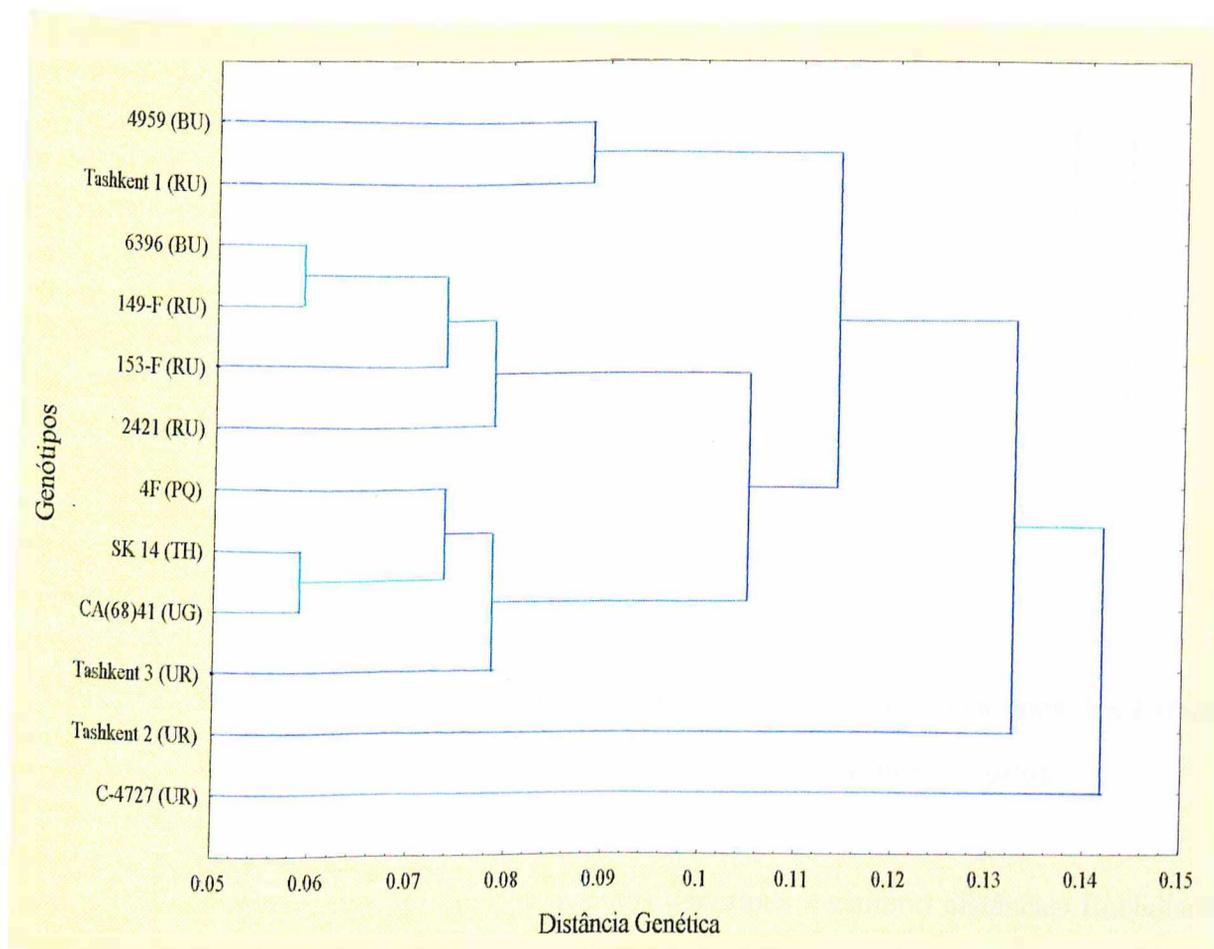


Figura 8 . Dendrograma representando distâncias genéticas entre 12 genótipos da Europa, Ásia e África baseadas em 68 bandas RAPD geradas por “primers” curtos.

O dendrograma baseado nas porcentagens de desacordo (Figura 9) a nível de 10% de distância genética divide os genótipos dos Estados Unidos em três grupos, o grupo A com três genótipos (Acala SJ-5, Coker 5110 e Lankart LX 571), o grupo B com dois (Deltapine Land 16 e Westburn M) e C com dois (Paymaster 303 e Stonevile 213). Os genótipos Coker 5110 e Lankart LX 571 possuem divergência inferior a 2%.

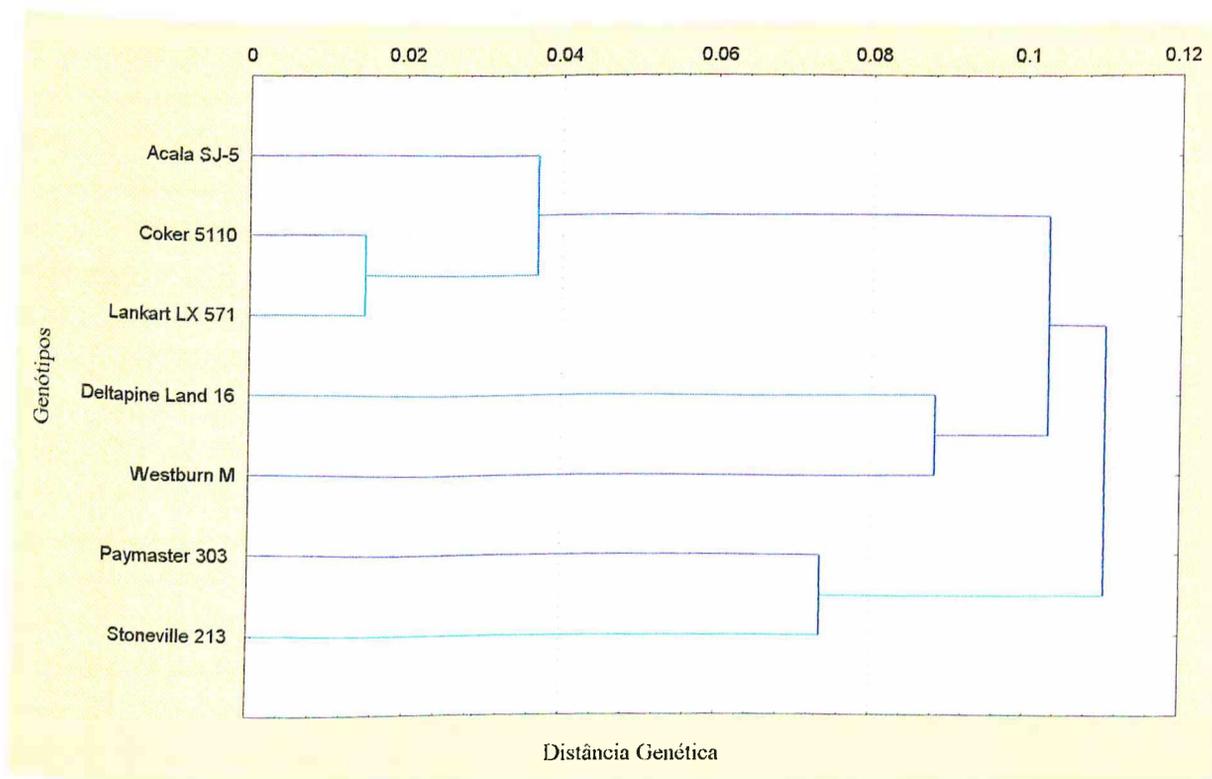


Figura 9 . Dendrograma representando distâncias genéticas entre 7 genótipos dos Estados Unidos baseadas em 68 bandas RAPD geradas por “primers” curtos.

Penna (1980) trabalhou com os mesmos genótipos e estimou distâncias Euclidianas entre eles a partir de marcadores fenotípicos (52 características incluindo qualitativas e quantitativas) e utilizando taxonomia numérica. A correlação entre as distâncias Euclidianas e distâncias genéticas obtidas pelas porcentagens de desacordo determinadas por marcadores moleculares gerados por “primers” curtos, embora significativa a 1%, foi moderada e negativa ($r=-0.43$) (Figura 10). Genótipos como Del Cerro e SU 0450/8909 que estiveram distantes na análise com caracteres fenotípicos, mostraram-se muito próximos na análise com marcadores moleculares.

Correlacionando-se as distâncias genéticas baseadas nos complementos de Nei e Li com as distâncias Euclidianas obtidas por PENNA (1980), encontrou-se também correlação negativa ($r=-0.39$) (Figura 11).

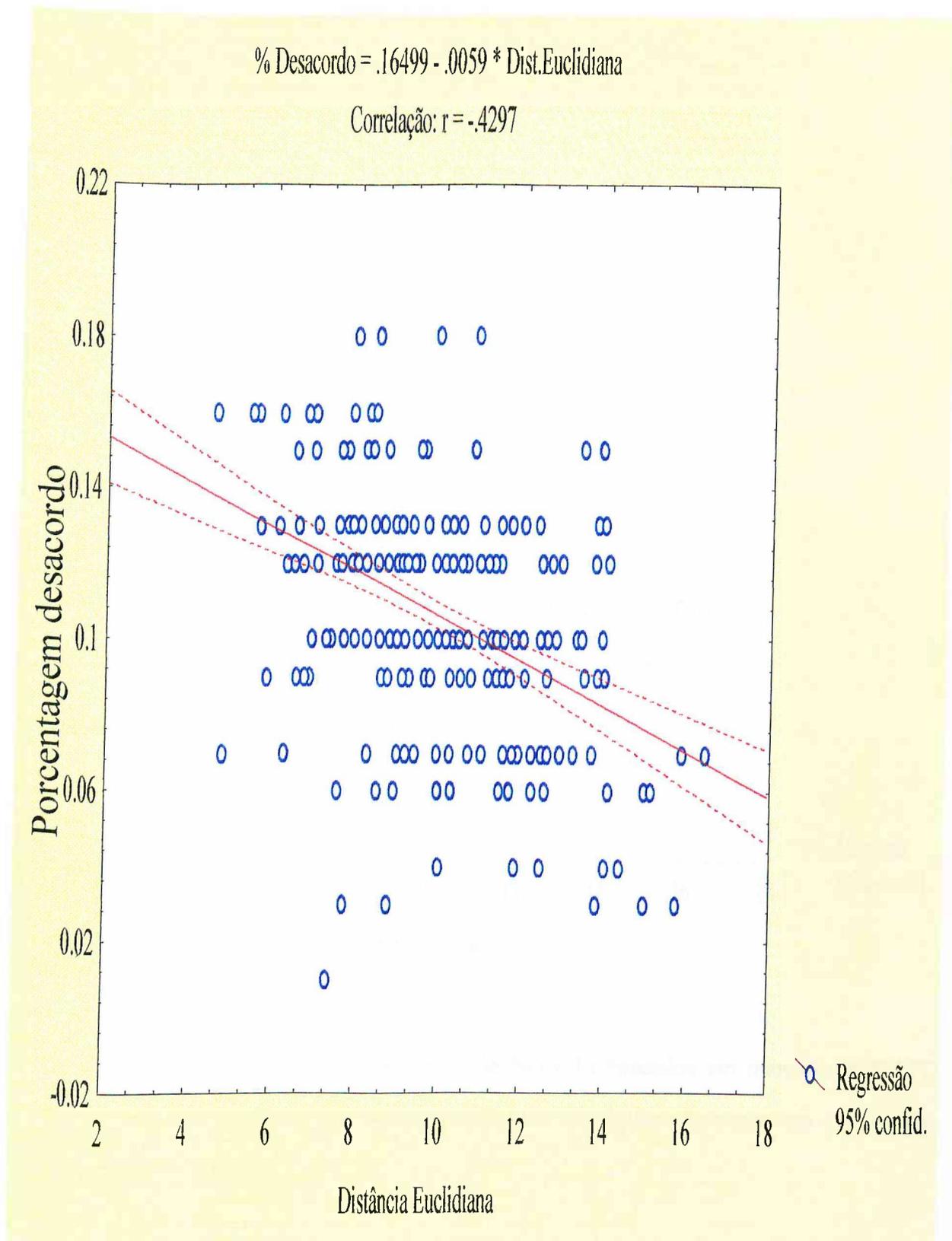


Figura 10 . Correlação entre distâncias Euclidianas baseadas em marcadores fenotípicos e porcentagens de desacordo baseadas em marcadores RAPD gerados por “primers” curtos.

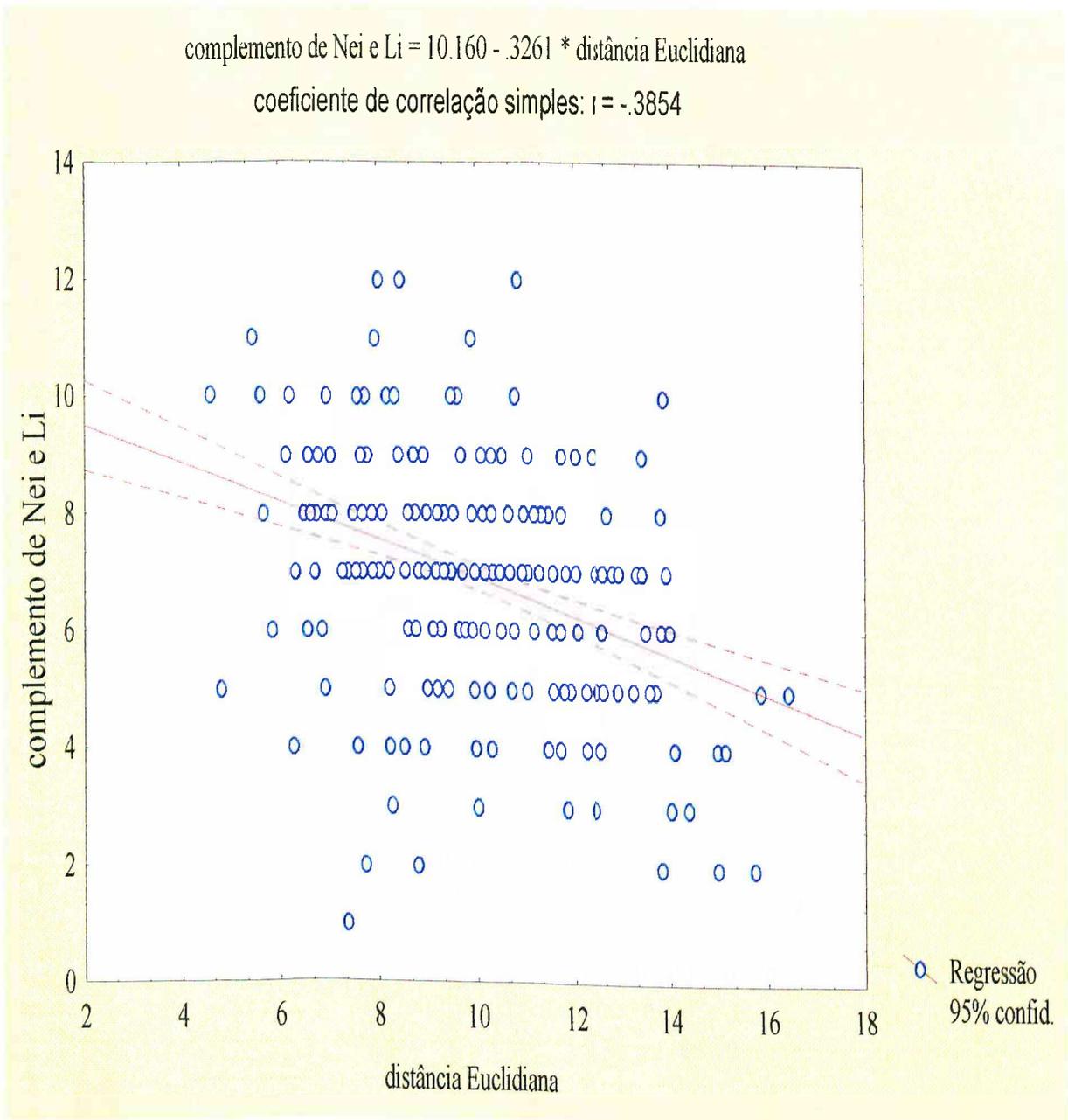


Figura 11 . Correlação entre complementos de Nei e Li baseados em marcadores RAPD gerados por “primers” curtos e distâncias Euclidianas baseadas em marcadores fenotípicos.

Comparando as distâncias genéticas calculadas pelos três métodos com base nos marcadores moleculares gerados por “primers” curtos e longos com as distâncias Euclidianas obtidas pela taxonomia numérica verifica-se que o método que melhor

correlacionou foi a porcentagem de desacordo ($r=-0.4$) (Figura 12), em seguida a distância de Jacard ($r=-0.37$) e complemento de Nei e Li ($r=-0.36$).

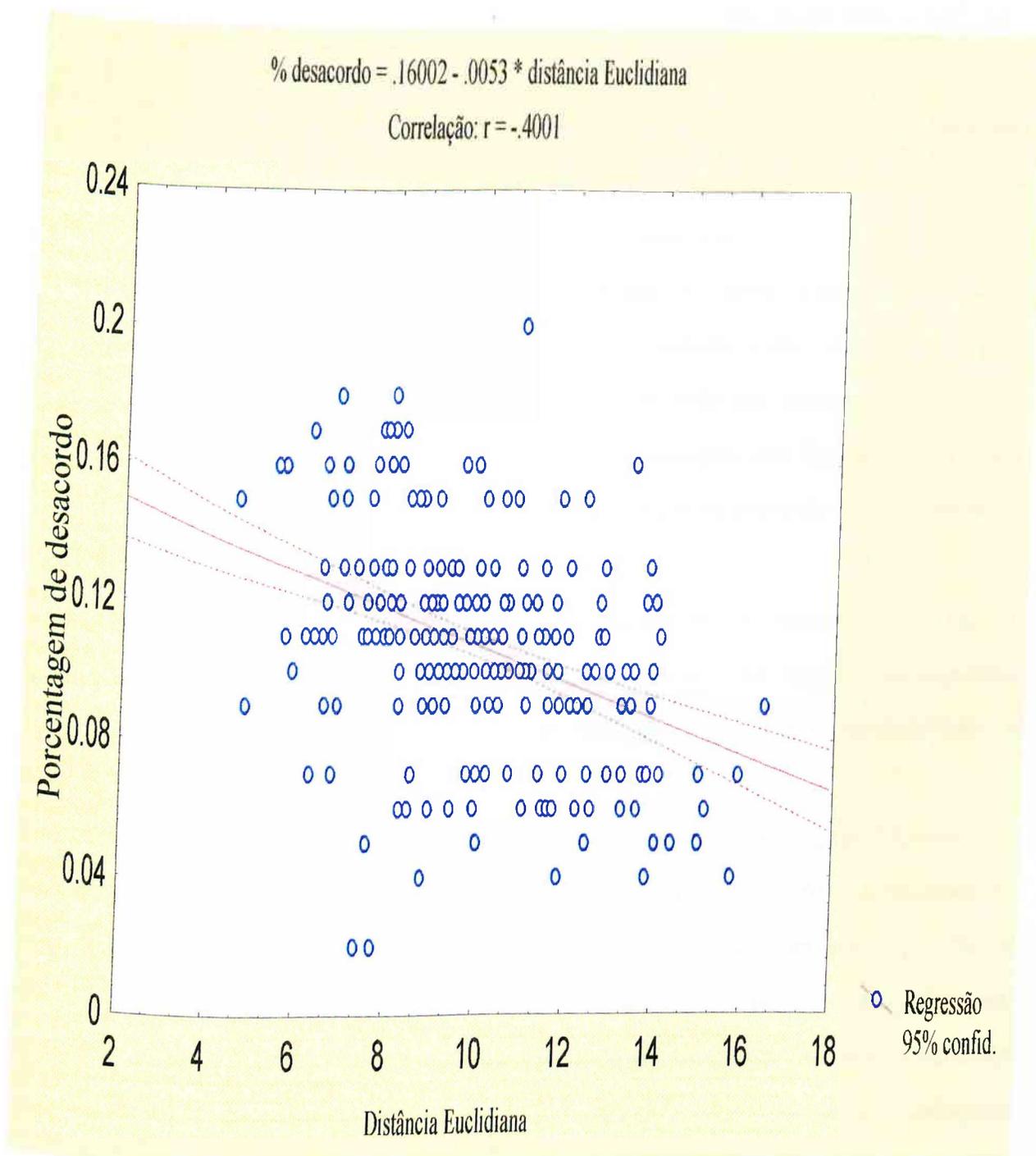


Figura 12 . Correlação entre porcentagens de desacordo obtidas pela análise de marcadores RAPD gerados por “primers” curtos e longos e distâncias Euclidianas obtidas da análise de marcadores fenotípicos.

Na comparação dos resultados obtidos pelas análises molecular e fenotípica para os cinco genótipos Sul Americanos verificou-se o oposto, pois, de acordo com as características fenotípicas SU 0450/8909 foi o genótipo mais divergente, Minas Dona Beja e IAC-13-1 foram os genótipos mais próximos.

Na análise dos 19 genótipos dos Estados Unidos e Velho Mundo por meio das características fenotípicas, os genótipos foram claramente separados em dois grupos, um grupo com os genótipos dos Estados Unidos e o outro com os genótipos do Velho Mundo. Uma hipótese para explicar estes resultados discrepantes entre análise molecular e fenotípica pode residir no fato de que caracteres quantitativos, muito influenciados pelo meio ambiente, foram utilizados na análise e sua variação pode não representar a variação genética devido às interações genótipo x ambiente. Os genótipos dos Estados Unidos não divergiram tanto geneticamente de genótipos do Velho Mundo a ponto de fazerem parte de grupos diferentes.

Considerando os resultados obtidos com caracteres fenotípicos, para os 11 genótipos da Europa, Ásia e África, os genótipos 4F, CA(68)41 e SK 14 foram os que mais divergiram, o que não foi observado na análise molecular, novamente demonstrando a divergência entre as duas análises.

As distâncias obtidas de dados fenotípicos mostraram uma base genética maior do que a que foi inferida por dados moleculares (divergência máxima de 18%). Uma hipótese que poderia explicar tal diferença se baseia no fato de que diferenças detectadas por dados fenotípicos podem estar superestimadas devido a interações genótipo x ambiente para caracteres quantitativos. Isto porque, nem toda variação fenotípica representa variação genética, portanto, para que caracteres fenotípicos sejam usados para estimar distâncias genéticas deve-se ter conhecimento do controle genético deste caráter. A correlação negativa encontrada entre distâncias obtidas da análise molecular e fenotípica mostra que os resultados obtidos com marcadores moleculares são opostos aos obtidos por dados fenotípicos. Sendo, os genótipos utilizados neste trabalho produtos de um processo de seleção humana, variações de caracteres quantitativos podem não representar de maneira

fidedigna a variação genética, a não ser aqueles que tenham ligação evolutiva com a cultivar, portanto, nem todos os caracteres devem ser usados para determinar distâncias genéticas.

5. CONCLUSÕES

Os “primers” curtos OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-09, OPA-10, OPA-15, OPL-04, OPL-11, OPL-15, OPO-02, OPO-06 e as combinações de “primers” longos GOU-01/GOU-07, GOU-03/GOU-10 e GOU-08/GOU-09 geraram pelo menos uma banda polimórfica entre os 24 genótipos de algodoeiro avaliados.

Os “primers” curtos foram eficientes na diferenciação dos genótipos, enquanto que, as combinações de “primers” longos foram capazes de separar os genótipos em grandes grupos e não conseguiram mostrar diferenças entre os genótipos.

De acordo com as distâncias genéticas obtidas pelas porcentagens de desacordo determinadas por marcadores moleculares gerados por “primers” curtos, a divergência máxima foi 18%, indicando possivelmente uma base genética não tão ampla quanto revelada por caracteres fenotípicos.

O método para cálculo das distâncias genéticas que melhor correlacionou com as distâncias Euclidianas obtidas de dados fenotípicos foi a porcentagem de desacordo. A distância de Jacard concordou em 93% e o complemento de Nei e Li em 91% com a porcentagem de desacordo.

As distâncias genéticas obtidas pelas porcentagens de desacordo determinadas por marcadores moleculares gerados por “primers” curtos correlacionou negativamente ($r = -0.43$) com as distâncias Euclidianas obtidas de dados fenotípicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYLIFFE, M. A., LAWRENCE, G.J., ELLIS, J.C., PRYOR, A.J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.22, p.1632-1636, 1994.
- BALLS, W.L., 1906. Studies in Egyptian cotton, pp. 29-89 in **Yearbook Khediv. Agric. Soc.** for 1906. Cairo, Egypt apud SPARKS, D.L. Malvaceae: Cotton (*Gossypium* spp.). **Advances in Agronomy**, San Diego, v.55, p. 135-140, 1995.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Amer. J. Human Genet.**, Chicago, v.32, p.314-331, 1980.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **BioTechniques**, Natick, v. 9, p.553-556, 1991.
- CARLSON, J.E, TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., LUK, V.W.K., KAUFFELDT, C., RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.194-200, 1991.

- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS.
Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: IV
Aproximação, Lavras, 1989. 176 p. p.106-107.
- DEMEKE, T., ADAMS, R.P., CHIBBAR, R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.990-994, 1992.
- DEMEKE, T., LYNCH, D.R., KAWCHUK, L.M., KOZUB, G.C., ARMSTRONG, L.D.
Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.15, p.662-667, 1996.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- ELLSWORTH, D.L., RITTENHOUSE, K.D., HONEYCUTT, R.L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **BioTechniques**, Natick, v.14, p.214-217, 1993.
- FRYXELL, P.A., 1992 A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedeia* 2: 108-165 apud REINISCH, A.J. *et al.* A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. **Genetics**, Bethesda, v.138, p.829-847, 1994.
- GAWEL, N.J., JARRET, R.L., WHITEMORE, A.P. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-based phylogenetic analysis of *Musa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.286-290, 1992.

- GONZÁLEZ, J.M., FERRER, E. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. **Genome**, Ottawa, v.36, p.1029-1031, 1993.
- GUNTER, L.E., TUSKAN, G.A., WULLSCHLEGER, S.D. Diversity among populations of switchgrass based on RAPD markers. **Crop Sci.**, Madison, v.36, p.1017-1022, 1996.
- HALWARD, T.M., STALKER, H.T., LARUE, E.A., KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, Ottawa, v.34, p.1013-1020, 1991.
- HARVEY, M., BOTHA, F.C. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. **Euphytica**, Dordrecht, v.89, p.257-265, 1996.
- HOEY, B.K., CROWE, K.R., JONES, V.M. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.92-100, 1996.
- HU, J., QUIROS, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.10, p.505-511, 1991.
- JOHN, M.E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.2381, 1992.
- KAGA, A., TOMOOKA, N., EGAWA, Y., HOSAKA, K., KAMIJIMA, O. Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, Dordrecht, v.88, p.17-24, 1996.

- KHASA, P.D., DANCIK, B.P. Rapid identification of white-engelmann spruce species by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.46-52, 1996.
- KONGKIATNGAM, P., WATERWAY, M.J., COULMAN, B.E., FOTIN, M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trofolium pretense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, Dordrecht, v.89, p.355-361, 1996.
- LOARCE, Y., GALLEG0, R., FERRER, E. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.88, p.107-115, 1996.
- MAAB, H.I., KLASS, M. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.91, p.89-97, 1995.
- MACKILL, D.J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Sci.**, Madison, v.35, p.889-894, 1995.
- MEUNIER, J.R., GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.**, Paris, v.144, p.373-379, 1993.
- MILLAN, T., OSUNA, F., COBOS, S., TORRES, A.M. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.273-277, 1996.
- MULTANI, D.S., LYON, B.R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. **Genome**, Ottawa, v.38, p.1005-1008, 1995.

- MURALIDHARAN, K., WAKELAND, E.K. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. **BioTechniques**, Natick, v.14, p.362-364, 1993.
- NEI, M., LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.76, p.5269-5273, 1979.
- N'GORAN, J.A.K., LAURENT, V., RISTERUCCI, A.M., LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, Oxford, v.73, p.589-597, 1994.
- OROZCO-CASTILLO, C, CHALMERS, K.J., WAUCH, R., POWELL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.87, p.934-940, 1994.
- PENNA, J.C.V. **Comparisons among selected upland cotton cultivars and strains utilizing the methods of numerical taxonomy.** Oklahoma, Oklahoma State Univ., 1980. 57p. (Tese, Doutorado).
- PETERSEN, G., JOHANSEN, B., SEBERG, O. PCR and sequencing from a single pollen grain. **Plant Molecular Biology**, v.31, p.189-191, 1996.
- PRINCE, J.P., LOAIZA-FIGUEROA, F., TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. **Genome**, Ottawa, v.35, p.726-732. 1992.

- PUTERKA, G.J., BLACK IV, W.C., STEINER, W.M., BURTON, R.L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, Oxford, v.70, p.604-618. 1993.
- RAMSER, J., LÓPEZ-PERALTA, C., WETZEL, R., WEISING, K., KAHL, G. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, Ottawa, v.39, p.17-25, 1996.
- REINISCH, A.J., DONG, J.M., BRUBAKER, C.L., STELLY, D.M., WENDEL, J.F., PATERSON, A.H. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics*, Bethesda, v.138, p.829-847, 1994.
- SANTOS, J.B., NIENHUIS, J., SKROCH, P., TIVANG, J., SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.87, p.909-915, 1994.
- SCHIERWATER, B., ENDER, A. Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res*, Oxford, v.21, p.4647-4648, 1993.
- SKROCH, P., TIVANG, J., NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, Minneapolis, p.26-30, 1992.

- SNEATH, P.H.A., R.R. SOKAL, 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco apud KAGA, A. *et al.* Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, Dordrecht, v.88, p.17-24, 1996.
- SPARKS, D.L. Malvaceae: Cotton (*Gossypium* spp.). **Advances in Agronomy**, San Diego, v.55, p. 135-140, 1995.
- STILES, J.I., LEMME, C., SONDUR, S., MORSHIDI, M.B., MANSHARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p.697-701, 1993.
- THORMANN, C.E., OSBORN, T.C. Use of RAPD & RFLP markers for germplasm evaluation. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, p.9-11, 1992.
- TATINENI, V., CANTRELL, R.G., DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Sci.**, Madison, v.36, p.186-192, 1996.
- TINGEY, S.V., RAFALSKI J.A., WILLIAMS J.G.K. Genetic analysis with RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, p.3-8, 1992.
- VAN COPPENOLLE, B., WATANABE, I., VAN HOVE, C., SECOND, G., HUANG, N., MCCOUCH, S.R. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. **Genome**, Ottawa, v.36, p.686-693, 1993.

- VICARIO, F., VENDRAMIN, G.G., ROSSI, P., LIO, P., GIANNINI, R. Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.90, p.1012-1018, 1995.
- WACHIRA, F.N., WAUGH, R., HACKETT, C.A., POWELL, W. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers (resumo). **Genome**, Ottawa, v.38, p.201-210, 1995.
- WEEDEN, N.F., TIMMERMAN, G.M., HEMMAT, M., KNEEN, B.E., LODHI, M.A. Inheritance and reliability of RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, p.12-17, 1992.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILKIE, S.E., ISAAC, P.G., SLATER, R.J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.497-504, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WOLFF, K., SCHOEN, E.D., RIJN, J.P. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.1033-1037, 1993

ANEXOS

Anexo 1 Matriz de distâncias genéticas expressas em porcentagens de desacordo e obtidas para 24 genótipos de algodoeiro baseadas em 68 marcadores RAPD, gerados por “primers” curtos.

Genótipos	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	21	24	
IAC-13-1	.00																								
IAC-RM4-SM5	.15	.00																							
Minas D. Beja	.16	.13	.00																						
SU 0450/8909	.10	.07	.09	.00																					
4959	.07	.10	.18	.09	.00																				
6396	.12	.09	.10	.07	.07	.00																			
4F	.12	.12	.13	.07	.10	.09	.00																		
Del Cerro	.13	.10	.06	.03	.12	.07	.07	.00																	
SK 14	.10	.13	.12	.09	.09	.07	.07	.06	.00																
CA(68)41	.10	.10	.12	.06	.12	.10	.07	.06	.06	.00															
Acala SJ-5	.12	.12	.10	.04	.13	.09	.06	.07	.10	.07	.00														
Coker 5110	.12	.12	.13	.04	.13	.12	.06	.07	.10	.04	.03	.00													
DPL 16	.12	.15	.16	.10	.13	.12	.12	.10	.10	.10	.09	.09	.00												
Lankart LX 571	.10	.10	.12	.03	.12	.10	.07	.06	.09	.03	.04	.01	.10	.00											
Paymaster 303	.09	.12	.10	.10	.10	.03	.09	.10	.07	.10	.09	.12	.12	.10	.00										
Stoneville 213	.13	.13	.12	.12	.15	.07	.13	.12	.09	.12	.10	.13	.13	.12	.07	.00									
Westburn M	.12	.12	.13	.07	.10	.06	.12	.07	.07	.10	.12	.12	.09	.10	.09	.10	.00								
149-F	.15	.06	.10	.07	.10	.06	.09	.07	.10	.07	.09	.12	.15	.10	.09	.13	.12	.00							
153-F	.18	.12	.10	.07	.13	.09	.09	.07	.13	.10	.09	.12	.18	.10	.12	.16	.12	.06	.00						
2421	.18	.12	.07	.07	.16	.09	.09	.04	.10	.10	.06	.09	.12	.10	.12	.13	.12	.06	.09	.00					
C-4727	.12	.15	.10	.07	.13	.12	.15	.07	.13	.13	.12	.12	.12	.10	.12	.16	.12	.15	.15	.12	.00				
Tashkent-1	.10	.13	.15	.09	.09	.07	.13	.12	.09	.12	.10	.13	.13	.12	.10	.12	.10	.10	.13	.13	.16	.00			
Tashkent-2	.18	.12	.16	.10	.13	.09	.15	.10	.13	.13	.15	.15	.12	.13	.12	.16	.06	.12	.12	.15	.15	.16	.00		
Tashkent-3	.12	.15	.16	.10	.13	.12	.09	.10	.07	.07	.12	.12	.12	.10	.12	.13	.09	.12	.15	.15	.18	.13	.15	.00	

Anexo 2 . Matriz de distâncias genéticas expressas em complementos de Nei e Li e obtidas para 24 genótipos de algodoeiro baseadas em 68 marcadores RAPD, gerados por “primers” curtos.

Genótipos	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	21	24	
IAC-13-1	0																								
IAC-RM4-SM5	10	0																							
Minas D. Beja	10	9	0																						
SU 0450/8909	7	5	6	0																					
4959	5	7	12	6	0																				
6396	8	6	7	5	5	0																			
4F	8	8	9	5	7	6	0																		
Del Cerro	8	7	4	2	8	5	5	0																	
SK 14	7	9	8	6	6	5	5	4	0																
CA(68)+1	7	7	8	4	8	7	5	4	4	0															
Acala SJ-5	8	8	7	3	9	6	4	5	7	5	0														
Coker 5110	8	8	9	3	9	8	4	5	7	3	2	0													
DPL 16	7	10	10	7	9	8	8	7	7	7	6	6	0												
Lankart LX 571	7	7	8	2	8	7	5	4	6	2	3	1	7	0											
Paymaster 303	6	8	7	7	7	2	6	7	5	7	6	8	8	7	0										
Stoneville 213	8	8	7	7	9	4	8	7	5	7	6	8	8	7	4	0									
Westburn M	8	8	9	5	7	4	8	5	5	7	8	8	6	7	6	6	0								
149-F	9	4	7	5	7	4	6	5	7	5	6	8	10	7	6	8	8	0							
153-F	11	8	7	5	9	6	6	5	9	7	6	8	12	7	8	10	8	4	0						
2421	12	8	7	5	11	6	6	3	7	7	4	6	8	7	8	8	8	4	6	0					
C-4727	7	10	7	5	8	8	9	5	8	8	8	8	7	7	7	9	8	9	9	8	0				
Tashkent-1	7	7	8	4	6	3	7	6	6	6	5	7	7	6	5	5	5	5	7	7	9	0			
Tashkent-2	11	8	10	7	9	6	10	7	9	9	10	10	8	9	8	10	4	8	8	10	9	9	0		
Tashkent-3	7	10	10	7	8	8	6	7	5	5	8	8	7	7	7	8	6	8	9	10	11	7	9	0	

Anexo 4 . Matriz de distâncias genéticas expressas em pelas porcentagens desacordo e obtidas para 24 cultivares de algodoeiro baseadas em 82 marcadores RAPD originados de “primers” longos e curtos.

Genótipos	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
IAC-13-1	.00																								
IAC-RM4-SM5	.15	.00																							
Minas D. Beja	.16	.11	.00																						
SU 0450/8909	.11	.09	.10	.00																					
4959	.09	.11	.17	.10	.00																				
6396	.12	.10	.11	.06	.09	.00																			
4F	.11	.13	.15	.07	.12	.09	.00																		
Del Cerro	.12	.10	.06	.04	.11	.07	.09	.00																	
SK 14	.11	.13	.12	.10	.07	.09	.10	.06	.00																
CA(68)+1	.10	.10	.11	.06	.11	.10	.09	.05	.06	.00															
Acala SJ-5	.11	.11	.10	.05	.12	.09	.07	.06	.10	.06	.00														
Coker 5110	.11	.11	.12	.05	.12	.11	.07	.06	.10	.04	.02	.00													
DPL 16	.11	.13	.15	.10	.12	.11	.12	.09	.10	.09	.07	.07	.00												
Lankart LX571	.09	.11	.12	.05	.12	.11	.07	.06	.10	.04	.05	.02	.10	.00											
Paymaster 303	.09	.13	.12	.10	.12	.04	.07	.11	.10	.11	.10	.12	.12	.10	.00										
Stoneville 213	.12	.12	.11	.11	.13	.07	.13	.10	.09	.10	.09	.11	.11	.11	.09	.00									
Westburn M	.11	.11	.12	.07	.10	.06	.12	.06	.07	.09	.10	.10	.07	.10	.10	.09	.00								
149-F	.15	.07	.11	.06	.11	.05	.09	.07	.11	.07	.09	.11	.13	.11	.09	.12	.11	.00							
153-F	.16	.11	.10	.07	.12	.09	.10	.06	.12	.09	.07	.10	.15	.10	.12	.13	.10	.06	.00						
2421	.20	.15	.11	.09	.16	.10	.11	.07	.11	.12	.09	.11	.13	.13	.13	.15	.13	.07	.11	.00					
C-4727	.12	.17	.13	.11	.13	.15	.16	.10	.13	.15	.13	.13	.13	.11	.13	.17	.13	.17	.16	.12	.00				
Tashkent-1	.11	.13	.15	.07	.10	.06	.12	.11	.10	.11	.10	.12	.12	.12	.10	.11	.10	.09	.12	.13	.18	.00			
Tashkent-2	.16	.13	.17	.10	.15	.09	.12	.11	.15	.13	.15	.15	.12	.12	.10	.16	.07	.11	.12	.16	.16	.15	.00		
Tashkent-3	.13	.16	.17	.10	.15	.11	.10	.11	.10	.09	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.10	.11	.15	.13	.18	.12	.15	.00	

Anexo 5 Matriz de distâncias genéticas expressas em complementos de Nei e Li e obtidas para 24 cultivares de algodoeiro baseadas em 82 marcadores RAPD originados de "primers" longos e curtos.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
IAC-13-1	0																							
IAC-RM4-SM5	9	0																						
Minas D.Beja	10	7	0																					
SU 0450/8909	7	6	6	0																				
4959	5	7	11	6	0																			
6396	8	7	7	4	6	0																		
4F	7	9	9	5	8	5	0																	
Del Cerro	8	7	4	2	7	5	5	0																
SK 14	7	9	8	6	5	6	6	4	0															
CA(68)41	6	7	7	4	7	6	5	3	4	0														
Acala SJ-5	7	7	7	3	8	6	5	4	7	4	0													
Coker 5110	7	7	8	3	8	7	5	4	7	2	2	0												
DPL 16	7	9	9	6	8	7	8	5	6	5	5	5	0											
Lankart LX 571	5	7	8	3	8	7	5	4	6	2	3	2	6	0										
Paymaster 303	5	9	8	6	8	2	5	7	6	7	6	8	8	6	0									
Stoneville 213	7	7	6	6	8	4	8	6	5	6	5	7	6	6	5	0								
Westburn M	7	7	8	5	6	4	8	4	5	6	7	7	5	6	6	5	0							
149-F	9	5	7	4	7	3	5	5	7	5	6	7	5	6	6	5	0							
153-F	10	7	6	5	8	6	6	4	8	6	5	7	9	7	5	7	7	0						
2421	13	10	7	6	11	7	7	5	7	8	6	7	9	6	8	8	6	4	0					
C-4727	8	11	9	7	9	9	10	6	9	9	9	9	8	7	8	9	9	5	7	0				
Tashkent-1	7	7	8	3	7	2	6	6	7	6	5	7	6	7	5	5	5	4	7	7	10	0		
Tashkent-2	10	9	11	6	9	5	8	7	9	8	9	9	8	8	6	9	5	7	8	10	10	8	0	
Tashkent-3	8	10	11	6	9	7	6	7	6	5	8	8	8	8	8	8	6	7	9	9	11	6	9	0

Anexo 6 . Matriz de distâncias genéticas expressas em distâncias de Jacard e obtidas para 24 cultivares de algodoeiro baseadas em 82 marcadores RAPD originados de “primers’ longos e curtos.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
IAC-13-1	0																								
IAC-RM4-SM5	17	0																							
Minas D.Beja	18	14	0																						
SU 0450/8909	13	11	12	0																					
4959	10	14	20	12	0																				
6396	14	12	13	8	10	0																			
4F	13	16	17	9	15	10	0																		
Del Cerro	14	12	8	5	13	9	10	0																	
SK 14	13	16	15	12	9	10	12	8	0																
CA(68)41	11	12	13	8	13	12	10	6	8	0															
Acala SJ-5	13	14	12	6	15	11	9	8	12	8	0														
Coker 5110	13	14	15	6	15	13	9	8	12	5	3	0													
DPL 16	13	16	17	12	15	13	14	10	12	10	9	9	0												
Lankart LX 571	10	14	15	6	15	13	9	8	12	5	6	3	12	0											
Paymaster 303	10	16	14	12	14	5	9	13	12	13	12	15	14	12	0										
Stoneville 213	13	14	12	12	15	8	15	10	9	10	9	12	12	12	9	0									
Westburn M	13	14	15	9	12	8	15	8	9	10	12	12	12	12	9	0									
149-F	17	9	13	8	13	6	10	9	13	9	11	13	16	13	10	13	13	0							
153-F	18	14	12	9	15	10	12	8	15	10	9	12	17	12	14	15	12	8	0						
2421	22	18	14	11	19	12	13	9	14	15	11	14	16	16	16	16	16	16	9	14	0				
C-4727	14	20	16	13	16	17	18	12	16	17	16	16	16	16	13	15	18	16	19	18	15	0			
Tashkent-1	13	14	15	6	12	5	12	11	12	11	9	12	12	12	9	9	9	8	12	14	19	0			
Tashkent-2	18	16	19	12	17	10	14	13	17	16	17	17	14	14	11	17	9	13	14	19	18	15	0		
Tashkent-3	15	19	19	12	17	13	11	13	12	10	15	15	14	14	14	14	14	12	13	17	16	20	12	16	0