

ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO DO GENITOR RECORRENTE EM MARACUJAZEIRO-AZEDO POR MEIO DE MARCADORES RAPD¹

KENIA GRACIELLE DA FONSECA², FÁBIO GELAPE FALEIRO³, JOSÉ RICARDO PEIXOTO⁴,
NILTON TADEU VILELA JUNQUEIRA³, MARÍLIA SANTOS SILVA³, GRACIELE BELLON⁵,
KEIZE PEREIRA JUNQUEIRA⁶, CAROLINA DE FARIA VAZ⁵

RESUMO – O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, entretanto tem-se observado redução na produtividade do maracujazeiro nos últimos anos, devido, principalmente, a fatores fitossanitários. Na Embrapa Cerrados, a transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais de maracujazeiro tem sido feita por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares. Este trabalho teve por objetivo verificar a recuperação do genoma recorrente nas plantas RC4 e RC5 [(*Passiflora edulis* x *Passiflora setacea*) x *Passiflora edulis*] com base em marcadores RAPD. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Amostras de DNA de cada material genético (17 plantas RC4, 16 plantas RC5, *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*) foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. Foram utilizados 12 *primers* decâmeros para as plantas RC4 e 14 *primers* decâmeros para as plantas RC5. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em matriz de dados binários. Verificou-se alta porcentagem de marcadores polimórficos em consequência do cruzamento-base interespecífico. A menor similaridade genética foi observada entre as espécies *P. edulis* e *P. setacea*, evidenciando a grande distância genética dessas espécies.

Termos para indexação: introgressão, marcadores moleculares, similaridade genética, *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*.

RECOVERY ANALYSIS OF RECURRENT GENITOR IN SOUR PASSION FRUIT THROUGH RAPD MARKERS

ABSTRACT - Brazil is the largest world producer of passion fruit, however, it has been observed a reduction in the productivity in recent years due, mainly, to phytosanitary factors. At Embrapa Cerrados, the transfer of resistance genes from wild to commercial species of passion fruit has been made through interspecific hybridations, followed by a backcrossing molecular marker-assisted program. The objective this work was to verify the recovery of recurrent genome at the plants RC4 and RC5 [(*Passiflora edulis* x *Passiflora setacea*) x *Passiflora edulis*] based on RAPD markers. The study was developed at Embrapa Cerrados Laboratory of Genetics and Molecular Biology. DNA samples of each genetic material (17 RC4 plants, 16 RC5 plants, *Passiflora edulis* and *Passiflora setacea*) were amplified to obtain RAPD markers. There were used 12 decamer primers for plants RC4 and 14 decamer primers for plants RC5. The RAPD markers generated were converted into a matrix of binary data. There were a high percentage of polymorphic markers as a result of interspecific base crossing. The smallest genetic similarity was observed between species *P. edulis* and *P. setacea*, highlighting the large genetic distance of these commercial and wild varieties, respectively.

Index terms: backcrossing, molecular markers, genetic similarity, *Passiflora edulis* and *Passiflora setacea*.

¹(Trabalho 094-08). Recebido em: 11-04-2008. Aceito para publicação em: 19-11-2008. Parte da Dissertação de Mestrado

²Mestra em Produção Vegetal. Ciências Agrárias/Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF. Estagiária da Embrapa Cerrados BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina-DF. Endereço eletrônico: fonsecakg@hotmail.com

³Pesquisador da Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina-DF. Endereço eletrônico: ffaleiro@cpac.embrapa.br, junqueir@cpac.embrapa.br, marilia@cpac.embrapa.br

⁴Professor da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Caixa Postal 04508, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF. Endereço eletrônico: peixoto@unb.br.

⁵Mestra em Ciências Agrárias/Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF. Estagiária da Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina-DF.

⁶Doutoranda do curso de Fitopatologia/ Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF.

INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujá tem evoluído muito rapidamente no Brasil, sendo cultivado em quase todo o território nacional. Entretanto, tem-se observado, nos últimos anos, redução na produtividade do maracujazeiro devido, principalmente, à ocorrência de doenças, depreciando a qualidade do fruto, e conseqüentemente diminuindo o seu valor comercial. Para modificar este quadro, o desenvolvimento de variedades resistentes a doenças é de extrema importância, sendo uma das atuais demandas para a pesquisa (Faleiro et al., 2005; Faleiro et al., 2006).

Estudos de melhoramento genético visam ao desenvolvimento de materiais superiores, principalmente com relação a caracteres de interesse agrônômico, e tendem a utilizar a hibridação intraespecífica para a transferência de genes de interesse (Bruckner, 1997).

Espécies silvestres de maracujá são alternativas para a ampliação da base genética da resistência a doenças; entretanto, trabalhos de melhoramento genético são necessários para combinar a resistência com características de produtividade e qualidade de frutos. Na Embrapa Cerrados, a transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares (Faleiro et al., 2004a; Faleiro et al., 2004b).

A utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de genes por retrocruzamento é o exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores (Guimarães & Moreira, 1999). O objetivo é utilizar marcadores moleculares distribuídos ao longo de todo o genoma para genotipar plantas obtidas por retrocruzamentos (RC) juntamente com o genitor recorrente (Faleiro, 2003).

Tais marcadores têm sido propostos para auxiliar a recuperação do genoma recorrente por meio da metodologia de genótipos gráficos (Young & Tanksley, 1989). Dessa forma, o número de retrocruzamentos necessários para a recuperação do fenótipo recorrente é reduzido de forma acentuada, acelerando o desenvolvimento de variedades melhoradas (Openshaw et al., 1994).

Neste trabalho, objetivou-se verificar a recuperação do genoma recorrente nas plantas RC4 e RC5 por meio de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.

A partir de uma população original de 59 plantas RC4 [(*Passiflora edulis* x *Passiflora setacea*) x *Passiflora edulis*], foram selecionadas 17 plantas com base na resistência à virose do endurecimento dos frutos. No caso da população RC5, foram caracterizadas 16 plantas de uma população de 40 plantas, também selecionadas com base na resistência à virose do endurecimento dos frutos. As plantas RC4, RC5 e seus genitores (*Passiflora edulis* GA-2 e *Passiflora setacea*) foram caracterizados com base nos marcadores moleculares. Folhas em estágio intermediário de maturação de cada material genético foram coletadas, e o DNA genômico foi extraído a partir do método CTAB modificado (Faleiro et al., 2003) e validado por Bellon et al. (2007). A concentração e a quantidade do DNA foram estimadas por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989), e a relação A260/A280, utilizada para avaliar a pureza e a qualidade do DNA extraído.

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram utilizados os *primers* decâmeros OPD (02), OPE (09; 16 e 18), OPF (14 e 17), OPG (05 e 17) e OPH (08; 14; 16 e 17) para as plantas RC4 e OPD (02 e 19), OPE (09 e 16), OPF (16; 17; 18 e 20), OPG (03 e 15) e OPH (04; 08; 14 e 17) para as plantas RC5.

As ampliações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 90 s a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis min, a 72 °C, e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4°C. Após a amplificação, adicionaram-se a cada amostra 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 v. Ao término da corrida, os géis foram

fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual se estimaram as distâncias genéticas entre as diferentes plantas RC e os genitores recorrente e doador, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), utilizando-se do Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se do método do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as plantas RC4 e seus genitores, a partir dos 12 *primers* decâmeros, foram gerados 146 marcadores RAPD (Tabela 1), obtendo-se a média de 12,2 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, 117 (80,14 %) foram polimórficos, fato que pode ser explicado pela diferença genética da população RC4 em relação ao genitor doador (*P. setacea*). A origem das plantas RC4 de um cruzamento-base interespecífico também explica a alta porcentagem de marcadores polimórficos. A similaridade genética entre as plantas RC4 e seus genitores variaram entre 0,38 e 0,91. O menor valor de similaridade genética (0,38) foi obtido entre as espécies *P. edulis* e *P. setacea*, evidenciando a grande distância genética dessas variedades comercial e silvestre, respectivamente. A maior similaridade genética (0,91) foi obtida entre a planta 5 da geração RC4 e o genitor recorrente *P. edulis*.

Na análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas (Figura 1), como esperado, verificou-se a formação de um grupo contendo o genitor recorrente e as plantas RC4, e outro contendo o genitor resistente.

A dispersão gráfica com base na matriz de distâncias genéticas (Figura 2) demonstra a separação dos genitores, que se localizam em pontos extremos do gráfico além da aproximação da população RC4 em relação ao *P. edulis* (genitor recorrente). Este gráfico ilustra o processo de recuperação do genoma recorrente pelo programa de retrocruzamentos.

Em RC4, teoricamente, espera-se uma recuperação do genoma recorrente de 96,875%, e

em RC5 98,437 %, considerando a utilização do mesmo genitor recorrente. No caso do maracujazeiro, considerando os problemas de autoincompatibilidade, a estratégia do programa de retrocruzamentos é modificar, a cada ciclo de retrocruzamentos, a variedade comercial utilizada como genitor recorrente dentro da espécie *P. edulis*. As variedades utilizadas no programa foram GA-2, AR-1 e EC2-O. Esta alternância do genitor recorrente explica a menor recuperação do genoma recorrente nas plantas RC4.

Esse fato pode ser verificado na Figura 3, que mostra as similaridades genéticas das plantas RC4 e do genitor resistente em relação ao genitor recorrente. A média de recuperação do genitor recorrente GA-2 foi de 84,4% nas plantas RC4. As plantas RC4 mais próximas do genitor recorrente foram: 5; 22 e 44.

Para as plantas RC5 e seus genitores, os 14 *primers* decâmeros geraram o total de 120 marcadores RAPD (Tabela 2), perfazendo a média de 8,6 marcadores por *primer*. Dos 120 marcadores, apenas 34 (28,3%) foram monomórficos. Observa-se alto polimorfismo principalmente pelo fato de as plantas *P. edulis* e RC5 divergirem da espécie *P. setacea*. Elevado polimorfismo tem sido verificado em diversos trabalhos, como, por exemplo, o de Pio Viana et al. (2003), comprovando, assim, a alta variabilidade genética interespecífica no gênero *Passiflora*. Segundo Ganga et al. (2004), um dos fatores que podem explicar a elevada diversidade genética no maracujazeiro, é o fato de a maioria das espécies serem alógamas, com presença de um sistema genético de autoincompatibilidade que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre genótipos distintos da mesma espécie ou de espécies diferentes.

As distâncias genéticas entre as plantas RC5 e seus genitores variaram entre 0,33 e 0,96. A média de recuperação do genitor recorrente GA-2 foi de 92,19 % nas plantas RC5. Assim como nos resultados obtidos em RC4, a maior distância genética (0,33) foi observada entre as espécies *P. setacea* e *P. edulis*. A menor distância genética (0,96) foi obtida entre a planta 9 da geração RC5 e o genitor recorrente (*P. edulis*).

Verifica-se, na análise de agrupamento (Figura 4), a formação de um grupo com as plantas RC5 e o genitor *P. edulis*, e um grupo contendo o genitor resistente *P. setacea*, o que foi observado também em RC4. Comparando-se as análises de agrupamentos das populações RC4 (Figura 1) e RC5 (Figura 4), verifica-se que a distância genética dentro do grupo de plantas RC4 é maior que a distância dentro do grupo de plantas RC5, o que era esperado, considerando o sucesso da recuperação do genoma

recorrente, dentro do programa de retrocruzamentos.

Ao comparar a dispersão gráfica baseada na matriz de distâncias genéticas das 16 plantas RC5 e seus genitores (Figura 5) com a mesma figura obtida para as 17 plantas RC4 e seus genitores (Figura 2), observa-se a maior aproximação das plantas RC5 em relação ao genitor recorrente, além da maior uniformidade de distribuição dessas plantas e o genitor doador no outro ponto extremo. Também pode-se observar isso na Figura 6 onde há maior similaridade genética da geração RC5 em relação ao genitor recorrente, diferentemente do que ocorre com

o genitor doador.

Marcadores moleculares RAPD têm sido utilizados, com sucesso, para confirmar as hibridações manuais e para acelerar a recuperação do genoma recorrente em programas de retrocruzamentos do maracujazeiro (Faleiro et al., 2007). No caso da população RC5, verifica-se que as plantas 2; 6; 9 e 16 (Figura 6) são as mais próximas do genitor recorrente, sendo, portanto, selecionadas para o novo ciclo de retrocruzamento.

TABELA 1- Primers utilizados para a obtenção dos marcadores RAPD e respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas, utilizadas na caracterização das plantas RC4 e seus genitores.

Primer	Sequência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-02	GGACCCAACC	2	3
OPE-09	CTTCACCCGA	10	0
OPE-16	GGTGACTGTG	6	3
OPE-18	GGACTGCAGA	0	6
OPF-14	TGCTGCAGGT	15	3
OPF-17	AACCCGGGAA	17	0
OPG-05	CTGAGACGGA	4	3
OPG-17	ACGACCGACA	15	1
OPH-08	GAAACACCCC	8	4
OPH-14	ACCAGGTTGG	9	0
OPH-16	TCTCAGCTGG	23	1
OPH-17	CACTCTCCTC	8	5
		117	29

TABELA 2- Primers utilizados para a obtenção dos marcadores RAPD e respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas, utilizadas na caracterização das plantas RC5 e seus genitores.

Primer	Sequência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-02	GGACCCAACC	4	3
OPD-19	CTGGGGACTT	7	3
OPE-09	CTTCACCCGA	3	4
OPE-16	GGTGACTGTG	9	2
OPF-16	GGAGTACTGG	6	2
OPF-17	AACCCGGGAA	6	3
OPF-18	TTCCCGGGTT	0	5
OPF-20	GGTCTAGAGG	4	0
OPG-03	GAGCCCTCCA	12	0
OPG-15	ACTGGGACTC	7	1
OPH-04	GGAAGTCGCC	4	2
OPH-08	GAAACACCCC	5	4
OPH-14	ACCAGGTTGG	9	3
OPH-17	CACTCTCCTC	10	2
		86	34

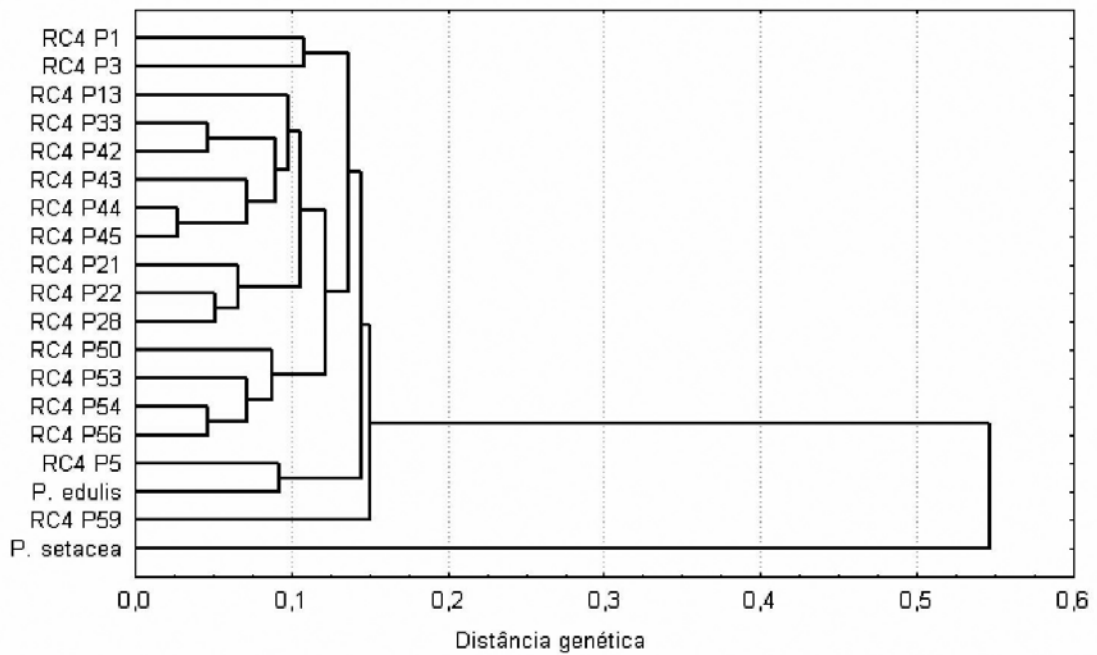


FIGURA 1 - Análise de agrupamento de 17 plantas RC4 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se de 146 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Embrapa Cerrados/2007.

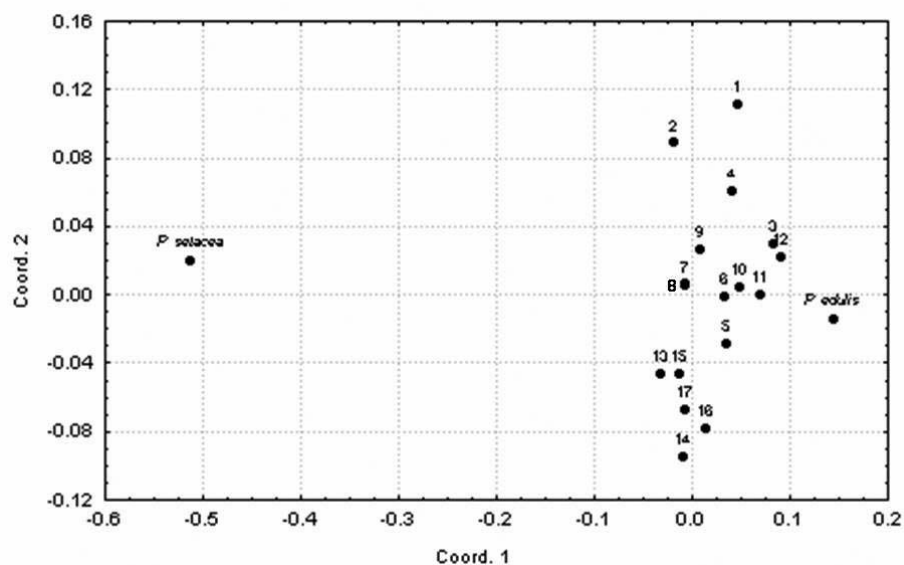


FIGURA 2 - Dispersão gráfica de 17 plantas RC4 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se de 146 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados/2007.

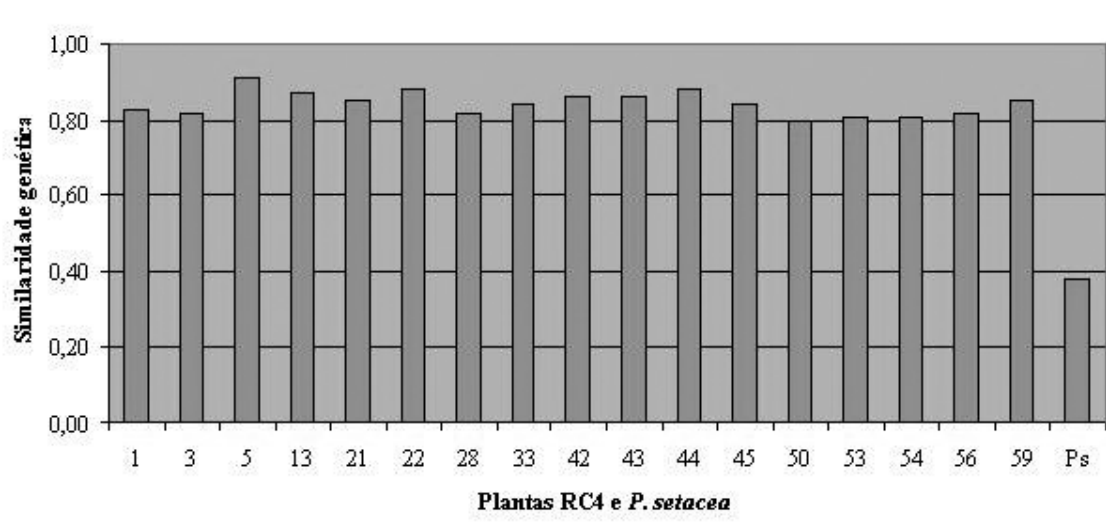


FIGURA 3 - Similaridade genética de 17 plantas RC4 e do genitor resistente *P. setacea* (Ps) em relação ao genitor recorrente *P. edulis* GA-2. Embrapa Cerrados/2007.

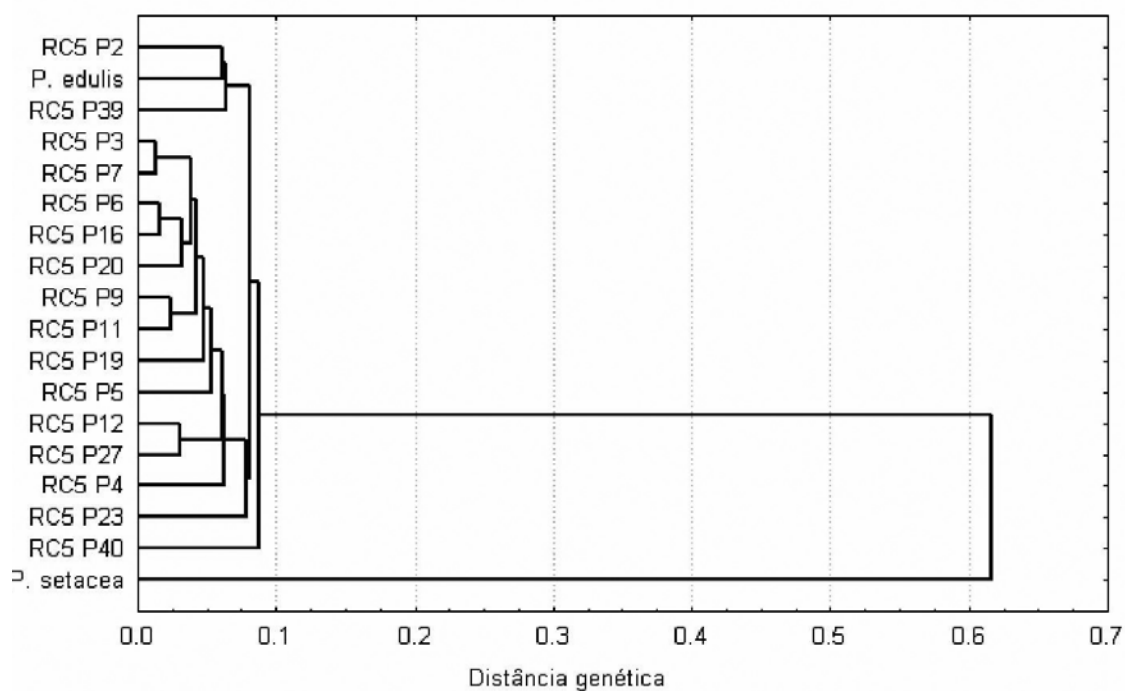


FIGURA 4 - Análise de agrupamento de 16 plantas RC5 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se de 120 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento, Embrapa Cerrados, 2007.

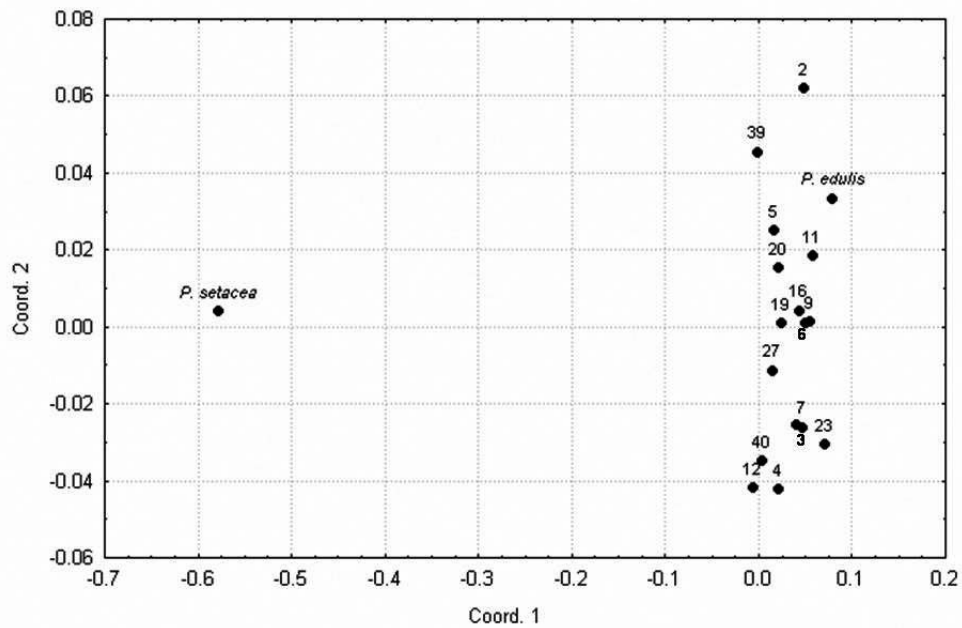


FIGURA 5 - Dispersão gráfica de 16 plantas RC5 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se de 120 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados/2007.

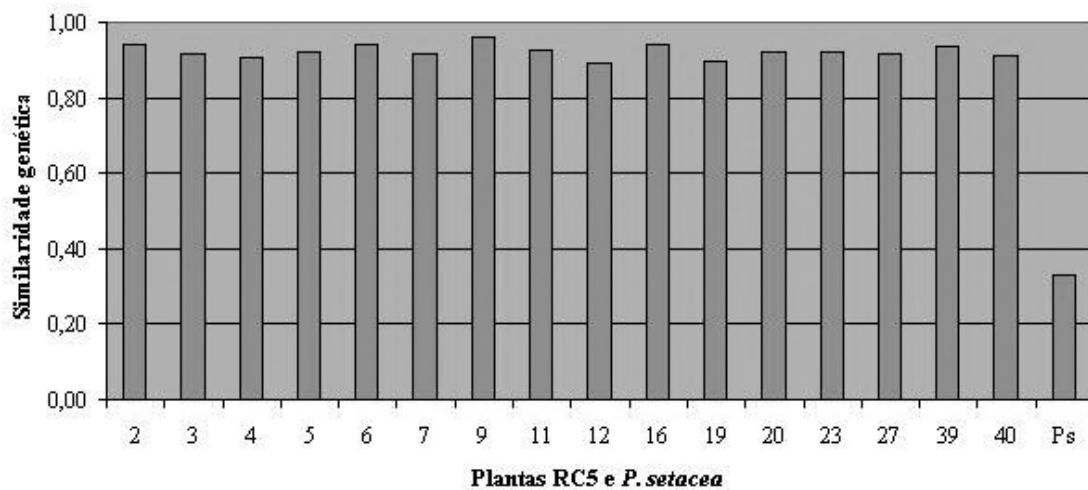


FIGURA 6 - Similaridade genética de 16 plantas RC5 e do genitor resistente *P. setacea* (Ps) em relação ao genitor recorrente *P. edulis* GA-2. Embrapa Cerrados/2007.

CONCLUSÕES

1-A utilização de marcadores RAPD possibilita a caracterização molecular de plantas RC4 e RC5 quantificando a recuperação do genoma recorrente e evidenciando a elevada distância genética entre os genitores do cruzamento-base interespecífico.

2-As plantas RC4 com maior recuperação do genitor recorrente são as de número 5; 22 e 44, e na caracterização das plantas RC5, as de número 2; 6; 9 e 16.

REFERÊNCIAS

- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; FERREIRA, C.F.; KARIA, C. T.; FONSECA, K.G.; SANTOS, E. C.; SANTOS, J.R.P.; TEIXEIRA, M.A.; JUNQUEIRA, K.P. Validação e otimização de protocolo simplificado para extração de DNA a partir de tecido foliar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. **Anais...**
- BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento do maracujazeiro. In: MANICA, I. (Ed). **Maracujá: temas selecionados**. Porto Alegre-RS: Cinco Continentes, 1997.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, K. P.; BELLON, G.; FONSECA, K.G.; PEIXOTO, J.R. Cruzamento inter-específicos e retrocruzamentos visando á resistência do maracujazeiro a doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. **Anais...**
- FALEIRO, F.G. JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54p.
- FALEIRO, F.G. Seleção assistida por marcadores moleculares: diferentes aplicações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** 6 p. CD-ROM
- FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6p. (Comunicado Técnico, 92)
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; KRALH, L.L.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; REZENDE, A.M. Utilização de marcadores moleculares em retrocruzamentos visando a resistência do maracujazeiro-azedo a múltiplas doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2004, Gramado. **Resumos...** p. S325.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-209.
- FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, Dordrecht, 138: 213-218. 2004b.
- GANGA, M.D.R.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E.G. de M.; GRILI, V.G.; GONÇALVES, M.; CHAGAS, E.A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, p. 494-498, 2004.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.715-740.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.76, p. 5269-5273, 1979.
- OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G.; BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA JOINT PLANT BREEDING SYMPOSIUM, 2., Corvallis, 1994. **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University, 1994
- PIO VIANA, A.; PEREIRA, T.N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f.

flavicarpa) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 653p.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 6. 4. ed. Cary, 1989.

Statistica for Windows [Computer program manual]; Tulsa, OK, 1999.

YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.77, 1989. p. 95-101.