

SIMONE GUALBERTO SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE TOMATEIRO DO BANCO DE
GERMOPLASMA DE HORTALIÇAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA COM BASE EM DADOS MORFÓLOGICOS E MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237d
2004

Santos, Simone Gualberto, 1975-

Diversidade genética de acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa com base em dados morfológicos e moleculares / Simone Gualberto Santos. – Viçosa : UFV, 2004. x, 59f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 50-58.

1. Diversidade genética. 2. Marcadores genéticos. 3. Tomate - Morfologia. 4. *Lycopersicon esculentum*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 583.790415

SIMONE GUALBERTO SANTOS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE TOMATEIRO DO BANCO DE
GERMOPLASMA DE HORTALIÇAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA COM BASE EM DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*

APROVADA: 17 de fevereiro de 2004.

Prof. Derly José Henriques da Silva
(Conselheiro)

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Milene Faria Vieira

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu vitória nas lutas enfrentadas e possibilitou alcançar mais este importante objetivo.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Programa de Pós-graduação em Botânica vinculado ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus queridos pais Aderbal e Lourdes, pelo amor, oração e dedicação, torcendo sempre pela minha vitória.

A minha família presente mesmo distante.

A Marcelo que me acompanhou durante essa jornada, me dando amor e carinho para que eu pudesse superar a dor da distância.

Ao meu orientador, professor e amigo Everaldo Gonçalves, pela competente orientação, pela confiança e amizade, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas dessa minha formação e dos meus trabalhos.

Aos professores Derly José Henriques da Silva e Maurilio Alves Moreira, pelos aconselhamentos prestados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Luiz Alberto Mattos Silva, por ter acreditado no meu potencial.

Ao professor Ronan Xavier Corrêa pelo incentivo, auxílio, apoio e amizade.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela brilhante atuação como coordenador-amigo de todos.

Ao meu irmão Alagoano Chico pelo apoio e pelo ombro amigo durante toda a minha jornada de trabalho.

As minhas amigas-irmãs Vi e Mar, companheiras de república “Gaiola das Loucas” por tudo.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular Plantas e aos funcionários do BIOAGRO/UFV pela colaboração e agradável convivência.

A professora Renata pela amizade e pela fotos realizadas do meu material de trabalho.

Ao professor Lino pela paciência e disponibilidade durante o desenvolvimento de uma etapa do meu trabalho no laboratório de Laboratório de Histologia, Citologia e Embriologia.

A professora Milene pela excelente participação na minha defesa de tese.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do curso, pelos ensinamentos.

A todos os amigos e colegas do curso que certamente contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

BIOGRAFIA

SIMONE GUALBERTO SANTOS, filha de Aderbal Souza Santos e Lourdes Gualberto Santos, nasceu em São Paulo - SP, em 10 de dezembro de 1975.

Em 1994, iniciou o curso superior em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), concluindo em 2000. Na UESC desenvolveu atividades de Iniciação Científica no projeto “Formação do Horto e Recomposição da Mata da UESC”.

Em 2002 recebeu da UESC o título de especialista em Genética e Biologia Molecular, onde desenvolveu um trabalho na área de diversidade genética de plantas.

Em abril de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Botânica, com área de concentração em Botânica Estrutural/ Biotecnologia, na UFV, defendendo tese em fevereiro de 2004.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	5
2.1. O gênero <i>Lycopersicon</i>	5
2.2. Morfologia.....	6
2.3. Abordagem econômica	7
2.4. Recursos genéticos e banco de germoplasma.	7
2.5. Divergência genética.....	8
2.6. Marcadores morfológicos.....	9
2.7. Marcadores moleculares.....	10
2.8. A técnica de PCR... ..	11
2.9. Marcadores moleculares baseados em PCR.....	11
2.9.1. Marcadores RAPD.....	13
2.9.2. Marcadores AFLP.....	14
2.9.3. Marcadores SSRs.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material vegetal.....	17
3.2. Caracterização morfológica	18
3.2.1. Condições de cultivo e delineamento experimental	18
3.2.2. Descritores morfológicos.....	19
3.2.3. Realização das análises e material utilizado.....	19
3.2.4. Análise estatística.....	20
3.3. Caracterização molecular.....	21
3.3.1. Extração de DNA.....	21
3.3.2. Condições de amplificação e eletroforese.....	22
3.3.2.1. RAPD.....	22

3.3.2.2. AFLP.....	22
3.3.3. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Caracterização morfológica	27
4.1.1. Análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo	27
4.1.2. Análise de agrupamento pelo método de Tocher	31
4.1.3. Análise por variáveis canônicas	33
4.1.4. Importância relativa das características para a divergência.....	34
4.2. Caracterização molecular	35
4.2.1. Extração de DNA total	35
4.2.2. Análise por marcadores RAPD.....	37
4.2.3. Dissimilaridade genética por meio de análises multivariadas	38
4.2.3.1. Análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo.....	42
4.2.3.2. Análise de agrupamento pelo método de Tocher.....	45
4.2.4. Análise por marcadores AFLP.....	47
4.2.5. Análise morfológica versus análise molecular.....	47
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. APÊNDICE.....	59

RESUMO

SANTOS, Simone Gualberto, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Diversidade Genética de Acessos de Tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa com Base em Dados Morfológicos e Moleculares.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurilio Alves Moreira e Derly José Henriques da Silva.

O Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da UFV mantém cerca de 870 acessos do gênero *Lycopersicon*, muitos deles ainda não caracterizados. Este trabalho teve como objetivo realizar a análise morfológica e molecular de acessos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do BGH, visando melhor caracterizá-los e também identificar possíveis acessos duplicados dentro da coleção. Na caracterização morfológica foram avaliados oito caracteres da morfologia floral em 200 flores de 41 acessos de tomateiro. Para a análise molecular, os mesmos acessos foram caracterizados com 30 *primers* RAPD e 24 combinações de *primers* AFLP. A divergência genética foi estudada por meio dos métodos de agrupamento hierárquico do vizinho mais próximo e de otimização de Tocher, e através do método de variáveis canônicas. Foi também determinada a contribuição relativa de cada característica para a divergência entre os acessos. Os acessos apresentaram considerável variabilidade, tanto para os caracteres morfológicos como para os moleculares. No entanto, não houve concordância entre os resultados obtidos pelas duas análises. Pelo método hierárquico do vizinho mais próximo, o acesso 17 foi o mais divergente pela análise morfológica, enquanto que o acesso 16 foi o que mais divergiu dos outros acessos, pela análise molecular. Considerando um limite de distância genética relativa de 35%, os acessos se agruparam em 13 grupos pela análise morfológica e em 26 grupos pela análise molecular. A divergência genética observada entre os acessos de tomateiro foi quantificada pelas quatro primeiras variáveis canônicas, que explicaram

84,88% da variação total. Os caracteres morfológicos, em ordem decrescente de importância para a determinação da divergência genética foram: comprimento de sépalas, comprimento de filete, comprimento de estilete, diâmetro de estigma, comprimento de antera, número de lóculos, comprimento de pétalas e diâmetro de ovário. Não houve relação entre a origem geográfica dos acessos e a sua diversidade genética, considerando a caracterização morfológica e molecular. Os dados indicam que não existe material duplicado entre os acessos caracterizados.

ABSTRACT

SANTOS, Simone Gualberto Santos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004. **Genetic Diversity of tomato accesses of the Vegetable Germoplasm Bank at the Universidade Federal of Viçosa based on Morphological and Molecular Data.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Maurílio Alves Moreira and Derly José Henriques da Silva.

The Universidade Federal de Viçosa Vegetable Germoplasm Bank (VGB) maintains about 870 accesses of the genus *Lycopersicon*. Many of them have not been characterized yet. This work aimed to analyze at the morphological and molecular levels tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) accesses of the VGB, seeking to better characterize them and to identify possible duplicated accesses in the collection. For the morphological characterization eight characters related to the floral morphology in 200 flowers of 41 accesses were determined. For the molecular analysis, the same accesses were characterized with 30 RAPD primers and 24 AFLP primer-combinations. The genetic distances among the accesses were determined and used to group the accesses through various clustering methods. The accesses presented considerable variability, both morphologically and at the molecular level. However, there was no agreement between the results obtained by the two types of analysis. Access number 17 was the most divergent based on the morphological data, while access number 16 was what most divergent by the molecular analysis. Considering a limit of relative genetic distance of 35%, the accesses grouped in 13 groups by the morphological analysis and in 26 groups by the molecular analysis. The genetic divergence observed among the tomato accesses was quantified by the first four canonical variables, which explained 84.88% of the total variation. The morphological characters, in decreasing order of importance for the determination of the genetic divergence were: length of sepals, filament length, style length, stigma diameter, anther length, locule number, length of petals and ovary diameter. There was no relationship between the geographical origin of the accesses and their genetic diversity, considering both morphological and molecular characterization. The data indicate that material there are no duplicated access among the material analyzed.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro cultivado, *Lycopersicon esculentum* Mill., pertence à família Solanaceae, uma família extremamente ampla e diversificada, abrangendo muitas espécies de cultivo comum (batata, pimentão, berinjela, petúnia), além de plantas daninhas como a beladona e a erva-moura. Essas espécies estão abrigadas em cerca de 90 gêneros (D'arcy, 1979), os quais são divididos em duas subfamílias, Solanoideae e Cestoideae, com base nos padrões de desenvolvimento do embrião (Taylor, 1986). A subfamília Solanoideae caracteriza-se por possuir embrião simétrico em diâmetro, enquanto na Cestoideae o embrião é tipicamente assimétrico (D'arcy, 1979). Todas as espécies do gênero *Lycopersicon* pertencem à subfamília Solanoideae e possuem um conjunto genômico $2n=24$ (D'arcy, 1979).

Mônaco (1964), baseado na classificação de Miller, dividiu o gênero *Lycopersicon* em dois subgêneros: *Eulycopersicon* (frutos vermelhos) e *Eryopersicon* (frutos verdes). Atualmente, o gênero *Lycopersicon* compreende nove espécies (Taylor, 1986): *Lycopersicon esculentum* Mill.; *L. pimpinellifolium* (L.) Mill.; *L. cheesmanii* Riley; *L. hirsutum* Dunal; *L. pennellii* (Corr.) D'Arcy; *L. chmielewskii* Rick, Kesicki, Forbes e Holle; *L. parviflorum* Rick, Kesicki, Forbes e Holle; *L. chilense* Dunal e *L. peruvianum* (L.) Mill.

De característica herbácea, a espécie *L. esculentum* apresenta folhas alternadas, na maioria glandulares. A flor de tomateiro apresenta um pedúnculo curto, cálice gamossépalo, com cinco a dez lobos profundos, e corola gamopétala, rotácea, amarela, com cinco ou mais lobos. O androceu apresenta cinco ou mais estames presos à corola, com anteras coniventes, formando um cone e deiscência poricida. O gineceu apresenta de dois a trinta carpelos, que originam os lóculos do fruto; é constituído por um pistilo de ovário súpero, com estilete liso e estigma achatado. São freqüentes as flores fasciadas que podem originar os chamados "tomates florones" ou de lóculo aberto. As flores apresentam-se agrupadas formando inflorescências dos tipos: racemo simples, cima bípara ou cima múltipara (Espinosa, 1991).

O tomateiro cultivado é proveniente do Novo Mundo, sendo a Zona Andina o centro de origem mais provável de suas espécies silvestres.

Entretanto, a domesticação do tomateiro ocorreu no México (Rick, 1979; Kaloo, 1991).

O tomate silvestre tipo cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* (Dunal) A. Gray) é considerado o ancestral de todas as variedades de tomate modernas, tendo emigrado em direção ao norte através do Equador, Colômbia, América Central e Panamá (Rick, 1979; Kaloo, 1991; Le-Minh-Hong, 1993).

Os cultivares originários da América Latina geralmente apresentavam o estigma exposto, acima das anteras, o que favorecia a polinização cruzada. Nos últimos anos, foram selecionadas plantas com alta porcentagem de “pegamento” de fruto; suas flores apresentam estilete curto, localizado próximo às anteras, favorecendo a autopolinização. Todavia, estão disponíveis cultivares com estiletos mais curtos, exibindo alto grau de autopolinização (Kaloo, 1991).

Com o crescente aumento da erosão dos recursos genéticos vegetais ocorreu a redução da variabilidade genética de espécies cultivadas e de seus parentes silvestres e também o estreitamento da base genética (Hallauer e Miranda, 1988 citado por Silva *et al.*, 2001). Esse fato é uma evidência da urgente necessidade de conservação e utilização dos recursos genéticos vegetais de maneira sustentável, visando garantir o desenvolvimento da agricultura, de modo a beneficiar as gerações presentes e futuras.

Os bancos de germoplasma constituem uma forma de conservação *ex situ* dos recursos genéticos. Em geral, as sementes são armazenadas em temperatura e umidade baixas, por várias décadas, sem alteração de sua constituição genética (Nass, 2001). Para que esses recursos sejam disponibilizados para a comunidade científica é necessário que eles sejam caracterizados e avaliados.

A caracterização e avaliação de germoplasmas visa, em uma primeira instância, gerar subsídios para facilitar as decisões dos curadores de Banco de Germoplasma com relação à amostras duplicadas. Gera, ainda, subsídios para programas de melhoramento genético e para o conhecimento da própria riqueza genética da coleção. Classicamente, a caracterização de germoplasmas tem sido baseada em descritores morfológicos e, em menor escala, em características de interesse agrônomo. O advento das técnicas moleculares, inicialmente com o uso de isoenzimas, e mais recentemente de

técnicas baseadas na avaliação direta de variações na seqüência de DNA, abre novos horizontes nesta área. A riqueza genética de uma coleção pode ser estimada por meio da comparação da variabilidade nela existente em relação a amostras de populações naturais na área de ocorrência da espécie. Estes estudos geram subsídios que permitem: a programação de novas expedições de coleta; a definição de estratégias de conservação *in situ* a listagem de acessos de maior interesse de uso em programas de melhoramento por conterem variantes genéticas (alta dissimilaridade genética) potencialmente importantes para a ampliação da base genética destes programas; a definição de amostras de pequeno tamanho de acessos dissimilares, representando a maior parte da variação genética estimada no Banco ("Coleções Núcleo"), facilitando o uso destes espécimes em programas de melhoramento.

É interessante observar, também, que segundo a Convenção Internacional de Direitos de Recursos Genéticos editada pela FAO (Jaramillo e Baena, 2000), para que um país tenha posse assegurada de um determinado recurso genético é fundamental que o mesmo esteja devidamente caracterizado e avaliado pelos pesquisadores daquele país.

Em 1966 a Universidade Federal de Viçosa (UFV), com o apoio da Fundação ROCKEFELLER, criou o Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH-UFV) com a finalidade de resgatar amostras de espécies nativas ou introduzidas, preservar, documentar e disponibilizar tal germoplasma, uma vez caracterizado e avaliado o seu potencial para as condições climáticas das diversas regiões de Minas Gerais e do Brasil (Silva *et al.*, 2001).

Dos 7.300 acessos registrados no BGH-UFV, 900 pertencem ao gênero *Lycopersicon*. Dentre estes, é possível que existam alguns acessos registrados em duplicata. Segundo Valois *et al.* (1996), a duplicação ocorre devido a sinonímias e a falta de controle das origens de amostras coletadas por diferentes doadores ao longo do tempo. A presença de tais duplicatas onera as atividades de manutenção do banco, levando a um maior consumo de recursos financeiros e à maior necessidade de recursos humanos.

Em razão do exposto desenvolveu-se este trabalho em que foi realizada a caracterização morfológica e molecular de 41 acessos de tomate do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, visando melhor caracterizá-los e

visando identificar possíveis acessos duplicados dentro da coleção. Este trabalho objetiva não só a utilização dos recursos genéticos armazenados no banco de germoplasma de modo mais racional, como também a redução dos custos da sua manutenção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Lycopersicon*

O tomateiro é originário do centro de diversidade Sul-Americano (Peruano Equatoriano-Boliviano), mais precisamente na região compreendida entre o Equador até o norte do Chile, do litoral do Oceano Pacífico até a altitude de aproximadamente 2000 m dos Andes e, provavelmente, as Ilhas Galápagos (Minami e Haag, 1989). No entanto, a domesticação e o cultivo inicial foram feitos por tribos indígenas primitivas que habitavam o México (Giordano e Silva, 1999). O tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) é, provavelmente, o ancestral mais próximo das cultivares atualmente plantadas (Taylor, 1986).

Segundo Taylor (1986), nove espécies pertencentes ao gênero *Lycopersicon* são reconhecidas taxonomicamente, podendo ser agrupadas em dois complexos, de acordo com a capacidade de cruzar com a espécie cultivada *L. esculentum*. As espécies que cruzam facilmente com *L. esculentum* pertencem ao complexo *esculentum*, enquanto que, as espécies que cruzam com maior grau de dificuldade pertencem ao complexo *peruvianum*. O complexo *esculentum* abrange sete espécies: *L. esculentum*; *L. cheesmanii*; *L. pimpinellifolium*; *L. chmielewskii*; *L. parviflorum*; *L. hirsutum* e *L. pennellii*. Dentro desse grupo, *L. esculentum* e *L. pimpinellifolium* cruzam-se com muita facilidade, independentemente da espécie utilizada como genitor feminino. Entretanto, incompatibilidade unilateral poderá ser observada nos cruzamentos em que *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, e *L. chmielewskii* forem utilizadas como genitores femininos e *L. esculentum* como genitor masculino.

L. chilense e *L. peruvianum* pertencem ao complexo *peruvianum*, ocorrendo dificuldades nos cruzamentos dessas duas espécies com as demais espécies do gênero *Lycopersicon*. Nos cruzamentos de *L. esculentum* com *L. chilense* ou *L. peruvianum*, quando *L. esculentum* é utilizada como genitor feminino, ocorre abortamento de embrião, o que pode ser superado por meio de técnicas de cultura de embrião. Entretanto, quando *L. esculentum* é utilizada

como genitor masculino, observa-se, em ambos os cruzamentos, a ocorrência de incompatibilidade unilateral (Giordano e Silva, 1999).

L. esculentum, *L. cheesmanii* e *L. parviflorum* são tipicamente autógamas, enquanto que determinadas populações de *L. pimpinellifolium* podem apresentar plantas com graus variáveis de autogamia ou de alogamia. Espécies, como *L. chmielewskii*, são tipicamente alógamas. *L. hirsutum*, *L. pennellii*, *L. peruvianum*, por sua vez apresentam mecanismos de auto-incompatibilidade que favorecem a polinização cruzada (Taylor, 1986).

2.2. Morfologia

Lycopersicon esculentum (tomateiro) é uma planta herbácea, perene, mas cultivada como anual, de hábito de crescimento prostrado ou estendido. O sistema radicular do tomateiro, como na maioria das dicotiledôneas, é constituído por raiz pivotante, desde que não haja interrupção do seu desenvolvimento pelo transplante, podendo alcançar 1,5 m de profundidade. O caule do tomateiro jovem é ereto, herbáceo, succulento e coberto de pêlos glandulares. Durante a frutificação o tomateiro não suporta seu próprio peso na posição ereta sem que receba um suporte artificial. Distinguem-se três hábitos de crescimento em tomateiro: indeterminado, determinado e anão (Pinto e Casali, 1980).

As folhas do tomateiro são alternadas, simples, partidas e cobertas com pêlos, na maioria glandulares, que emitem um odor característico ao serem esmagados com o manuseio. A inflorescência, em cimeira, pode assumir a forma simples, bifurcada ou ramificada. O tipo simples ocorre com maior frequência na parte inferior da planta; os tipos ramificados desenvolvem-se na parte superior. As flores, em cimeira, são pequenas, hermafroditas e autógamas. O cálice possui cinco sépalas verdes e as pétalas são amarelas lanceoladas e largas. O número de estames é de cinco, os quais são organizados próximos, formando um cone, de anteras coniventes que são amarelas, curtas e largas. O ovário é súpero, o estilete terminal e o estigma indiviso. Os frutos são carnosos e succulentos (baga). Possuem formato globular-achatado a alongado e entre dois e dez lóculos (Pinto e Casali, 1980). São compostos pela película (casca), polpa, placenta e sementes.

2.3. Abordagem econômica

O tomateiro é considerado como uma das mais importantes solanáceas cultivadas no mundo inteiro, tanto em cultivo convencional quanto em cultivo protegido (Hartman e St. Clair, 1999). De acordo com os dados do AGRIANUAL (2001), o Brasil é o maior produtor da América Latina sendo os principais estados produtores: Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. E em 2003 com a produção nacional de 3.693.832 tonelada/ha, o tomateiro permaneceu entre as olerícolas mais produtivas (IBGE, 2004),

A importância do tomate é, basicamente, devido à sua participação na dieta humana seja na forma *in natura* ou processada. Além disso, o tomate é uma excelente fonte de vitamina A e de licopeno. Estudos demonstram que a dieta rica em tomate e seus derivados apresenta efeito benéfico na saúde humana, sendo o licopeno, carotenóide presente em frutos vermelhos, o principal responsável devido à sua propriedade antioxidante, a qual confere proteção às células de danos oxidativos, reduzindo assim, o risco de doenças crônicas (Rao *et al.*, 1998 citados por Moreira, 2002)

2.4. Recursos genéticos e banco de germoplasma

A variabilidade de plantas de interesse sócio-econômico atual e potencial para a utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins, é denominada recursos genéticos vegetais (Nass, 2001). O uso racional dos recursos pode contribuir para a redução da fome e pobreza, problemas que assolam milhares de pessoas no mundo inteiro devido, especialmente, ao aumento da população mundial e conseqüentemente, ao aumento da demanda por alimentos.

No entanto, grande parte dos recursos genéticos vegetais tem sido perdida devido ao mau uso, destruição dos “habitats” naturais, aumento populacional, industrialização, destruição dos centros de diversidade, além da falta de consciência do homem, que no geral, é pouco cuidadoso com a natureza. Essa perda é denominada erosão genética (Jaramilo e Baena,

2000). A erosão genética provoca o estreitamento da base genética das espécies e a consciência desse fato tem provocado uma nova postura do homem no sentido de concentrar esforços para conservar os recursos genéticos vegetais.

Há dois métodos básicos para a conservação de recursos genéticos: *ex-situ* e *in-situ*. No primeiro, a conservação é feita em condições artificiais, fora do “habitat” natural, enquanto que no segundo o germoplasma é conservado no seu “habitat” natural (Nass, 2001).

Segundo van Hintum *et al.* (2000), citado por Moreira (2002) os bancos de germoplasma funcionam com conservação *ex-situ* e podem ser constituídos por três tipos básicos de coleções:

- a) **Coleção base** - cuja função é armazenar a longo prazo amostras representativas de todos os acessos (termo utilizado para qualquer registro de um banco de germoplasma) que fazem parte da coleção de uma espécie. Cada país têm sua coleção base. No Brasil, a coleção base é localizada no CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos/EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia).
- b) **Coleção ativa** - é uma sub-coleção da coleção base, cuja função é armazenar a curto e médio prazos os recursos genéticos de uma espécie, podendo ser distribuídos para pesquisadores e instituições afins. As coleções ativas são mantidas em instituições diversas que têm por responsabilidade: garantir a sua diversidade genética (seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, seja por favorecer o intercâmbio com outros bancos de germoplasma); multiplicá-las; distribuí-las aos usuários e promover a sua caracterização por diferentes metodologias.
- c) **Coleção nuclear** - é uma sub-amostra da coleção base com a função de representar, com um mínimo de repetições, a diversidade genética de determinada espécie.

2.5. Divergência Genética

De forma bastante simples, pode-se definir a divergência genética como a distância genética entre populações, indivíduos ou organismos, com base numa série de características, que podem ser morfoagronômicas, fisiológicas,

bioquímicas, polimorfismos de DNA, dentre outras (Amaral Junior, 1998). Por uma conceituação mais clássica, a divergência genética expressa a diferença entre as frequências alélicas das populações (Falconer, 1981).

Atualmente, a grande implicação dos estudos de divergência genética está no conhecimento do grau de variabilidade genética das populações, devido à preocupação que ora ocorre com a erosão genética, ou seja, com a redução da variabilidade genética das populações vegetais, decorrente da substituição das antigas variedades por formas genotípicas uniformes (Amaral Junior, 1998).

Egashira *et al.* (2000), estudando a variabilidade das espécies *L. peruvianum* e *L. chilense*, espécies relacionadas ao tomateiro cultivado, concluíram que estas tem a maior variabilidade do gênero *Lycopersicon* e que a base genética destas espécies é claramente diferente da base das espécies mais relacionadas a *L. esculentum*. Os autores sugerem que a exploração dessa diversidade poderá aumentar a variabilidade da espécie cultivada.

2.6. Marcadores Morfológicos

Até meados de década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram aqueles controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como a deficiência clorofílica, a cor da pétala ou a morfologia foliar. Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise da ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre esses marcadores e caracteres de importância econômica em populações segregantes (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Além disso, a disponibilidade de marcadores morfológicos era essencialmente restrita às poucas espécies de plantas utilizadas como sistemas modelo para estudos de genética, tais como milho, tomate e ervilha, nas quais a intensidade de estudos e a disponibilidade de informações genéticas eram maiores.

A caracterização morfológica de um banco de germoplasma é normalmente a forma mais acessível de quantificar sua diversidade genética e é bastante utilizada (Rabbani *et al.*, 1998 e Ritschel e Huamán, 2002).

Nos estudos sobre a diversidade genética nas coleções de germoplasma podem ser realizados a partir de caracteres morfológicos de natureza qualitativa ou quantitativa (Moreira *et al.*, 1994).

Mesmo com todas as desvantagens, os marcadores morfológicos ainda têm tido papel fundamental na divulgação das características agrônômicas de novos materiais genéticos e podem influenciar decisivamente na escolha das variedades por parte de agricultores.

Ritschel e Huamán (2002) realizaram uma pesquisa na qual utilizando apenas 25 características morfológicas, foi possível identificar 256 tipos morfológicos dentre 324 acessos nativos de batata-doce, sendo 223 acessos com morfologia única e 33 grupos de acessos morfológicamente duplicados.

2.7. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um 'marcador genético'. Entre suas propriedades, um marcador genético deve ser capaz de diferenciar os progenitores e de ser reproduzido com precisão na progênie. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética. Também as marcas de DNA podem ser usadas para 'DNA *fingerprinting*', isto é, para identificar acessos de plantas ou de isolados de um microorganismo, ou para complementar estudos de sistemática (Lopes *et. al.*, 2002). Um marcador genético ideal deve apresentar alto nível de polimorfismo, estabilidade em diferentes ambientes, detectar grande número de locos não ligados, além de apresentar herança simples.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram os marcadores genéticos baseados no DNA, destacando-se o RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphisms") , RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e SSR ("Simple Sequence Repeats"), que se baseiam na variação natural da seqüência de bases do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998) e

segmento de DNA amplificado, via reação de polimerase (PCR), após digestão com enzima de restrição (AFLP). O principal avanço que essas técnicas trouxeram foi a possibilidade de acessar diretamente o genótipo de um indivíduo. Além disso, o fato de haver um número ilimitado de descritores de DNA disponíveis faz com que eles sejam de grande importância para caracterização de cultivares (Milach, 1998).

2.8. A técnica de PCR

A técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), descrita inicialmente por Mullis (1990), baseia-se na amplificação simultânea das duas fitas de DNA de um segmento específico, usando-se dois oligonucleotídeos (*primers*) de seqüências conhecidas e são complementares às regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado (Saiki *et al.*, 1985). Nessa técnica, ocorrem ciclos repetidos de desnaturação por aquecimento, pareamento dos *primers* em seqüências complementares do DNA-molde e extensão desses pela DNA polimerase. Os *primers* se ligam às fitas opostas da seqüência-alvo, de tal modo que a síntese de DNA pela polimerase ocorra na região do DNA compreendida entre os oligonucleotídeos, duplicando-se efetivamente a quantidade daquele segmento de DNA a cada ciclo de amplificação.

O PCR só foi possível graças à descoberta de uma enzima que sintetiza DNA (DNA polimerase) que resiste a temperatura de até 95°C, necessária para a desnaturação do DNA durante o processo de síntese. A mais usada é a *Taq* polimerase, extraída da arqueobactéria *Thermus aquaticus*. A principal desvantagem da técnica PCR é o fato dela requerer o sequenciamento do gene de interesse, para o desenho dos *primers* (Santos, 1994).

2.9. Marcadores moleculares baseados em PCR

O advento da técnica da reação de polimerização em cadeia (PCR) (Mullis e Faloona, 1987) acelerou o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares.

A técnica denominada RAPD (Williams *et al.*, 1990), baseada na amplificação via PCR de segmentos de DNA genômico, por meio de iniciadores

arbitrários, tornou-se muito popular, principalmente por sua acessibilidade tecnológica e seu baixo custo.

O polimorfismo de RAPD está baseado em mutações nos sítios de anelamento dos iniciadores, caracterizando-se pela presença ou ausência de produtos amplificados. É, portanto, um marcador com padrão de segregação dominante, com o qual não é possível a distinção entre homocigotos e heterocigotos, o que diminui o seu poder de informação desse tipo de marcador.

Os marcadores RAPD têm sido utilizados em estudos de diversidade, bem como na diferenciação e na caracterização de raças fisiológicas de fungos fitopatogênicos e têm demonstrado bastante eficiência para esse tipo de estudo (Vilarinhos *et al.*, 1995; Alzate-Marin *et al.*, 1997). A técnica de RAPD foi eficiente na análise da distância genética entre 28 cultivares de feijão comum, em que foram obtidos 144 produtos de amplificação polimórficos, num total de 276, utilizando-se de 45 *primers* (Vasconcelos *et al.*, 1996).

Os genomas de organismos eucariotos são caracterizados pela ocorrência de grandes quantidades de seqüências repetidas de nucleotídeos de várias classes, dentre elas uma classe de seqüências curtas de DNA (2 a 4 pares de bases - pb), repetidas em tandem, denominadas seqüências simples repetitivas (SSR) ou microssatélites (Litt e Luty, 1989). Regiões contendo SSR são amplificadas individualmente por meio de PCR, utilizando um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação. Essas características têm feito dos microssatélites o marcador mais apropriado para o desenvolvimento de “*fingerprints*” genéticos únicos e a discriminação de cultivares (Cregan *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1994; Diwan e Cregan, 1997; Russel *et al.*, 1997).

A identificação de locos microssatélites exige a confecção de uma biblioteca de DNA, com fragmentos de aproximadamente 500 pb. Esses fragmentos são clonados em plasmídios e utilizados na transformação de *Escherichia coli*. Colônias transformadas são hibridizadas com sondas de nucleotídeos radioativos, tais como G(AT)11 e CCC (ATT)10. Os clones que hibridizam são seqüenciados para a identificação de seqüências com

repetições curtas (características de microssatélite). Nas seqüências contendo microssatélites, identificam-se regiões adequadas para confecção de *primers* flanqueando a região repetitiva, e que produzam fragmentos entre 100 e 250 pb.

Uma vez obtidos os *primers*, marcadores microssatélites são mais fáceis de utilizar do que RFLP, por exemplo, pois são baseados na técnica de PCR, que permite a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo. Para o tomate, segundo Areshchenkova e Ganal (2002), encontram-se disponíveis cerca de 21 pares *primers* de microssatélites, o que facilita grandemente a utilização dessa técnica como rotina, pois não é necessário identificar os locos microssatélites. Além disso, os SSR são mais baratos, mais econômicos e requerem menos trabalho do que os marcadores RFLPs, resultando em conteúdo elevado de informação de polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Para soja, já estão disponibilizados no mercado cerca de 650 pares de *primers* de microssatélites pela Invitrogen, o que facilita grandemente a utilização desta técnica como rotina, pois não é necessário identificar os locos microssatélites. Rongwen *et al.* (1995), utilizando sete pares de *primers* de microssatélites para caracterizar 96 genótipos de soja, encontraram de 11 a 26 alelos por loco. Apenas quatro pares de *primers* foram suficientes para discriminar 95 dos 96 genótipos avaliados. Russell *et al.* (1997), estudando 11 locos de SSR em 24 genótipos de cevada, encontraram três combinações de quatro SSR, que identificaram todos os genótipos avaliados. Estes autores conseguiram distinguir inclusive duas linhas irmãs, que possuíam distância nula, com base na genealogia.

2.9.1. Marcadores RAPD

A técnica denominada RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (Williams *et al.*, 1990) é uma variação da técnica de PCR que possibilita a síntese de DNA *in vitro*, a partir de um DNA molde. É utilizado um *primer* de seqüência aleatória de 10 pb, que vai se ligar a regiões complementares no DNA-alvo. A amplificação ocorrerá quando o mesmo *primer* estiver flaqueando um segmento de DNA em sentido oposto e em sítios distanciados de 500 a

2000 pb, o que possibilita a síntese desse segmento pela *Taq* DNA polimerase. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA, distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência de DNA. Repetidos ciclos de desnaturação do DNA-alvo, ligação do *primer* e extensão dos mesmos produzem os fragmentos de DNA, que são visualizados em gel de agarose. O número e o tamanho dos fragmentos amplificados depende da seqüência do *primer* usado e da seqüência de bases do DNA molde (Tingey e Del Tufo, 1993).

O polimorfismo evidenciado pela técnica de RAPD é devido a mutações de ponto, ou deleções no sítio de pareamento do *primer*, ou inserções entre sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal que impossibilita a sua amplificação. O RAPD é uma técnica de fácil execução, de custo reduzido e aplicável a qualquer tipo de organismo. No entanto, existem problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que são marcadores dominantes. Este tipo de marcador possibilita a detecção de apenas um alelo por loco, sendo que a presença de uma banda no gel identifica indivíduos homozigotos dominantes (AA) ou heterozigotos (Aa), não permitindo a distinção entre eles. O homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda. A ausência de banda pode indicar ainda a presença de qualquer outro alelo, que não aquele que produz a banda, em locos multi-alélicos.

Apesar das desvantagens deste tipo de marcador, Lima *et al.* (2003) trabalharam com a caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira (espécies de estreita base genética) utilizando o RAPD e verificaram que este marcador é eficiente para este fim, pois 62% dos produtos amplificados eram polimórficos, possibilitando a separação das cultivares em diferentes grupos.

2.9.2. Marcadores AFLP

O AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”) é uma classe de marcadores que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade da amplificação do PCR, apresentando-se como uma ferramenta poderosa na caracterização de genomas e no mapeamento genético (Vos *et*

al., 1995). Os marcadores são fragmentos de restrição detectados após uma amplificação seletiva por PCR. O DNA genômico é digerido simultaneamente com duas enzimas de restrição, sendo *EcoRI* e *MseI* as mais usadas. A seguir, os fragmentos de DNA gerados são ligados a adaptadores nos sítios de *EcoRI* e de *MseI* e amplificados por PCR, utilizando-se *primers* que contêm seqüências complementares aos adaptadores. A seletividade é alcançada pela adição de nucleotídeos arbitrários à extremidade 3' do *primer*, causando aumento na seletividade do *primer* e resultando numa redução na complexidade dos produtos de amplificação por PCR. A detecção dos fragmentos polimórficos é feita em gel de seqüenciamento, utilizando um dos *primers* seletivos marcados com radioatividade ou fluorescência.

Uma das vantagens do AFLP é o grande poder de detecção de variabilidade genética, uma vez que a técnica explora polimorfismos de restrição e de amplificação. Como os *primers* utilizados nas etapas de amplificação são longos, em torno de 20 pb, a especificidade da reação é aumentada significativamente, quando comparada com o RAPD. Uma das limitações do AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco que, à semelhança do RAPD, também são marcadores dominantes.

Como o AFLP é realizado em várias etapas, incluindo digestão do DNA com enzimas de restrição, a técnica torna-se mais complexa. Outro fato que contribui para aumentar esta complexidade é que a resolução dos polimorfismos precisa ser realizada em géis de seqüenciamento, utilizando radioatividade ou fluorescência, e nem todos os laboratórios estão capacitados para trabalhar com tais metodologias (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Suliman-Pollatschek *et al.* (2002), com apenas quatro combinações de *primers* AFLP de tomate produziu 298 bandas e destas 159 foram polimórficas entre as linhagens comerciais.

2.9.3. Marcadores microssatélites (SSRs)

Os genomas de organismos eucariotos são caracterizados pela ocorrência de grandes quantidades de seqüências repetidas de nucleotídeos de várias classes, dentre elas, se destaca uma classe de seqüências de DNA

curtas (2 a 4 bp), repetidas em tandem, denominadas seqüências simples repetitivas (SSR) ou microssatélites (Litt e Luty, 1989).

As seqüências de microssatélites têm sido detectadas em diversos organismos. Em geral, no DNA de plantas a seqüência (AT)_n está presente em maior abundância. Regiões contendo seqüências simples repetitivas são amplificadas individualmente por meio de PCR utilizando-se um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. A amplificação ocorrerá quando dois *primers* estiverem flanqueando um segmento de DNA em direção oposta e distanciados de 100 a 300 pb, o que possibilita a síntese desse segmento pela *Taq* DNA polimerase.

Bertini *et al.* (2003), trabalhando com algodoeiro herbáceo verificaram o potencial de marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética entre indivíduos da mesma espécie, em 31 pares de *primers* foram amplificados 31 locos polimórficos, num total de 66 alelos e média e 2,13 alelos por loco.

Alcântara Neto (2001) constatou que o microssatélite é o marcador molecular mais indicado para a caracterização genética de soja, devido à natureza co-dominante e multi-alélica deste marcador, além de ser extremamente conservado dentro da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram utilizados acessos do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, 41 acessos na caracterização molecular (Tabela 1) e 40 acessos na caracterização morfológica.

Tabela 1. Acessos de tomate do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, utilizados neste trabalho

Acesso	Nº BIOAGRO	Procedência	Data de coleta
Débora	1	Variedade comercial	Desconhecida
Santa Clara	2	Variedade comercial	Desconhecida
24	3	Teófilo Otoni – MG	20/09/66
55	4	Vitória da Conquista –BA	21/09/66
83	5	Feira de Santana –BA	22/09/66
121	6	Salvador –BA	23/09/66
161	7	Muribeca –SE	25/09/66
184	8	Vitória de Santo Antão -PE	27/09/66
185	9	Vitória de Santo Antão -PE	27/09/66
186	10	Vitória de Santo Antão -PE	27/09/66
216	11	Vitória de Santo Antão -PE	27/09/66
218	12	Pesqueira –PE	29/09/66
224	13	Alagoinhas-BA	01/10/66
225	14	Alagoinhas-BA	01/10/66
226	15	Alagoinhas-BA	01/10/66
243	16	Petrolândia -PE	30/09/66
320	17	Goiânia-GO	21/11/66
327	18	Estiva-GO	21/11/66
351	19	Jussara-GO	22/11/66
378	20	Itapiraquan-GO	22/11/66
406 ITA	21	Goiás -GO	23/11/66
406SAL	22	Goiás -GO	23/11/66
603	23	Barbacena- MG	13/12/66
606	24	Barbacena- MG	14/12/66
616	25	Barbacena- MG	14/12/66
674	26	São Gonçalo Sapucaí -MG	15/12/66
700	27	Cuiabá –MT	09/01/67

Continua...

Continuação

Acesso	Nº BIOAGRO	Procedência	Data de coleta
773	28	Porto Simão –MT	11/01/67
813	29	Cuiabá-MT	14/01/66
987	30	Campinas –SP	28/12/66
988	31	Campinas –SP	28/12/66
989	32	Campinas –SP	28/12/66
990	33	Campinas –SP	28/12/66
993	34	Campinas –SP	28/12/66
994	35	Campinas –SP	28/12/66
1020	36	Belo Horizonte -MG	22/06/67
1211	37	Rio Casca –MG	27/07/67
1214	38	São Gonçalo –MT	05/06/67
1254	39	Campinas –SP	28/12/60
981	40	Campinas –SP	28/12/66
997	41	Campinas –SP	28/12/66

3.2. Caracterização Morfológica

Para a caracterização morfológica, cinco flores, uma por indivíduo foram coletadas após a antese e em inflorescências aleatórias de cada um dos 40 acessos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), perfazendo um total de 200 flores. As flores foram conservadas em frascos plástico com álcool 70% (v/v).

3.2.1. Condições de cultivo e delineamento experimental

Na semeadura utilizaram-se três sementes por vaso de cinco litros. Quando as plântulas emitiram os folíolos, fêz-se o desbaste, deixando-se somente uma planta por vaso, que, posteriormente foi transferida para o solo. As plantas foram mantidas na Horta do Departamento de Fitotecnia da UFV, localizada em Viçosa, MG. O substrato utilizado foi terra/esterco na proporção de 3:1, com calagem e adubação com base na análise prévia do solo. A irrigação foi feita por gotejamento.

O delineamento empregado foi o de blocos casualizados com cinco repetições. As parcelas experimentais constaram de oito plantas com

espaçamento de 1 m entre linhas e de 0,5 m entre plantas. A densidade de transplântio foi de 20 plantas por m².

3.2.2. Descritores morfológicos

Foram utilizados os seguintes descritores morfológicos identificadores para a cultura (IPGRI, 1996):

- a) **Comprimento de sépala e de pétala** - expresso em cm, obtido a partir da medição longitudinal de três sépalas e pétalas, por meio de uma régua graduada em mm.
- b) **Comprimento de antera** - expresso em cm, obtido pela medição longitudinal, após um corte na flor no mesmo sentido.
- c) **Comprimento de filete** - expresso em cm, obtido pela medição longitudinal, por meio de uma régua graduada em mm.
- d) **Comprimento de estilete** - expresso em cm, obtido pela medição longitudinal, por meio de uma régua graduada em mm.
- e) **Diâmetro do estigma** - expresso em mm, obtido pela medição transversal, por meio de uma régua graduada em mm.
- f) **Número médio de lóculos do ovário** - obtido pela contagem do número de lóculos. Em indivíduos com mais de um ovário foi utilizada a média do número de lóculos dos dois ovários.
- g) **Diâmetro de ovário** - expresso em mm, obtido a partir da medição transversal, após um corte no ovário no mesmo sentido, por meio de uma régua graduada em mm.

3.2.3. Realização das análises e Material utilizado

As medições deste material foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural que está sob a responsabilidade do Departamento de Biologia Geral da UFV. Para auxiliar na avaliação destes caracteres, foram utilizadas régua de 20 cm, lupa binocular (ZEISS, modelo Stemi 2000-C), com monitor acoplado, placas de petri de vidro, lâminas de vidro, pinças e água destilada (para evitar a desidratação do material durante a observação).

3.2.4. Análise Estatística

As medidas de dissimilaridade foram determinadas segundo o modelo de análise multivariada, o que permitiu a obtenção da matriz de dissimilaridade, matriz de covariância residual e as médias dos acessos.

O grau de dissimilaridade genética entre os acessos foi estimado usando a estatística de Mahalanobis (D^2), a partir das médias dos acessos e da matriz de covariância residual.

Para o agrupamento dos acessos, foi empregado o método hierárquico do vizinho mais próximo, que consiste em identificar, na matriz de dissimilaridade genética, os dois genótipos mais similares, ou seja, com menor valor de D^2 , que irão compor o primeiro grupo. Nas etapas seguintes, opera-se com as matrizes de distâncias genéticas de dimensões cada vez menores, pela identificação dos genótipos mais similares, até que se conclua o agrupamento de todos os genótipos (Morais, 1992; Carvalho, 1993).

O agrupamento foi realizado também por meio do método de otimização de Tocher, o qual consiste em identificar na matriz de dissimilaridade o par de acessos mais similares entre si, formando um grupo inicial e, a partir desse, foi avaliada a possibilidade de inclusão de novos acessos no grupo, adotando-se o critério de que a médias das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre os grupos (Cruz e Regazzi, 1997).

A análise multivariada realizou-se também com base em variáveis canônicas, que segundo Rao (1952), é um processo alternativo para avaliação do grau de similaridade genética entre acesso, que leva em consideração tanto a matriz de covariância residual somente possível em ensaios com repetições quanto a de covariância entre médias fenotípicas das características avaliadas.

Estudou-se a importância relativa dos diversos caracteres, avaliados para a divergência genética entre os genótipos, utilizando-se a metodologia de Singh (1981), que se baseia na participação do total das estimativas das distâncias generalizada de Mahalanobis, considerando todos os possíveis pares de indivíduos, para as partes devida a cada característica.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1997).

3.3. Caracterização Molecular

Para essa caracterização molecular, foram coletadas seis folhas de cada acesso, embaladas em papel alumínio, identificadas, acondicionadas em caixa de isopor e armazenadas a -80°C , para posterior extração de DNA, realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Plantas, localizado no BIOAGRO.

3.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA de folhas de tomate foi realizada com base no protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Entre 200 e 300 mg de folhas foram triturados em gral de porcelana na presença de N_2 líquido, sendo o pó resultante transferido para tubos “ependorf”. A cada tubo foram adicionados 900 μL de tampão de extração, constituído de Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2% (p/v), PVP (2%) e β -mercaptoetanol 0,2% (v/v), sendo este último adicionado separado dos demais componentes, em capela de exaustão. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por, aproximadamente, 40 min, com agitações a cada 10 min. Após incubação, foi feita a desproteinização pela extração com igual volume de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação a 18.845 g por 5 min. Os ácidos nucléicos foram, então, precipitados da fase aquosa, pela adição de 2/3 do seu volume de isopropanol gelado, lavados em etanol 90% gelado e depois em etanol 70%, secados à temperatura ambiente e ressuspensos em 300 μL de TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM), seguindo-se de um tratamento com RNase A, na concentração final de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 37°C , por 60 min.

O DNA foi novamente precipitado mediante adição de 30 μL de NaCl 5 M e 250 μL de isopropanol gelado, seguida de incubação a -20°C por, aproximadamente, 2 h e centrifugação a 18.845 g por 10 min. Após lavagem do precipitado com etanol 90% e etanol 70% gelados e secagem à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspendido em 300 μL de TE ou de água milli-Q autoclavada.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm, sendo uma unidade de absorvância a 260 nm (A_{260}) equivalente a 50 μg de DNA por mL de solução (Sambrook *et al.*, 1989). A pureza do DNA foi estimada por meio da razão A_{260}/A_{280} . A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3.2. Condições de amplificação e de eletroforese

3.3.2.1. RAPD

Foram utilizados 456 *primers* de RAPD neste trabalho, adquiridos junto à Operon Technologies (Alameda, CA, EUA). Destes, somente 30 evidenciaram polimorfismos nas variedades em estudo. A amplificação foi realizada com cada um dos acessos em 25 μL de solução contendo Tris-HCl 12,5 mM, pH 8,3, KCl 62,5 mM, MgCl_2 2,5 mM, 125 μM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,6 μM do par de *primers*, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 20 ng de DNA. O programa de amplificação constou de 40 ciclos. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação do DNA (94 °C por 30 s); uma etapa de pareamento do *primer* (35 °C por 35 s) e uma etapa de alongamento (72 °C por 1 min). Após o 40º ciclo foi realizada uma etapa de alongamento por 7 min a 72 °C. Os produtos de amplificação do DNA foram analisados em gel de agarose 1,2% imerso em tampão TBE 1X (Tris-Borato 0,09 M e EDTA 2 mM pH 8,0), a 120 volts por 3 h. Os géis foram corados com brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel e fotodigitalizados sob luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação Eagle-Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

3.3.2.2. AFLP

Os 24 *primers* de AFLP utilizados neste trabalho foram adquiridos junto a GIBCO-BRL (Alameda, CA, EUA). O DNA genômico de cada indivíduo foi clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI*. A reação de digestão foi feita em um volume total de 25 μL , contendo 5 μL de tampão de reação 5 X,

2 μL de *EcoRI*/ *MseI* (GIBCO-BRL) e 250 ng de DNA genômico. A mistura de reação foi incubada por 3 h a 37 °C, seguido por 15 min a 70 °C para inativar as enzimas. Aos fragmentos de restrição, foram ligados adaptadores específicos para as extremidades coesivas das enzimas *EcoRI* e *MseI*. A ligação foi realizada pela adição de 24 μL do tampão de ligação contendo os adaptadores e de 1 μL da T_4 DNA ligase (GIBCO-BRL), aos 25 μL da reação de digestão. Os tubos permaneceram por 2 h a 20 °C e, em seguida, a mistura foi diluída 6 vezes em TE 0,1 mM.

A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando 4 μL mistura diluída, 1 μL dos pares de *primers* pré-seletivos e 15 μL do *mix* de AFLP (Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA). Os *primers* pré-seletivos possuem, além da seqüência complementar a cada adaptador, um nucleotídeo na extremidade 3' (*EcoRI* + A e *MseI* + C). As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) programado para 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s e 72 °C por 60 s. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos 1:50 em TE 0,1mM.

A amplificação seletiva é uma segunda etapa de amplificação que utiliza os produtos da pré-amplificação diluídos como moldes para *primers*-seletivos que possuem, além da seqüência do *primer* pré-seletivo, combinações ao acaso de dois nucleotídeos na extremidade 3'. As combinações utilizadas dos *primers* seletivos estão listadas na Tabela 2. A amplificação seletiva foi realizada em um volume de 20 μL , contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,8 mM de MgCl_2 , 212 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,25 μM do *primer* de *MseI* e 0,05 μM do *primer* *EcoRI* (Perkin Elmer), uma unidade de *Taq* polimerase e 3,5 μL do DNA diluído (1:50). As reações foram amplificadas com 13 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s e 72 °C por 60 s, até atingir a temperatura de 56 °C, seguidos de 23 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 60 s.

A análise dos fragmentos foi realizada em géis de poliacrilamida desnaturante 4,25% (acrilamida:bisacrilamida19:1) contendo uréia 36% (p/v) em TBE 1X. A Tabela 2 indica os *primers* *EcoRI* marcados com fluorescência, sendo três *primers* com a fluorescência JOE (E_1 , E_5 e E_8), três com a fluorescência TAMRA (E_2 , E_4 e E_7) e dois com FAM (E_3 e E_6). Foram utilizadas

12 combinações de *primers* com oito acessos e destas, três (E_3M_1 , E_8M_1 e E_7M_1) foram utilizadas com os 41 acessos. Os fragmentos amplificados foram analisados no ABI 377 (Applied Biosystems), utilizando um marcador de peso molecular GENESCAN 500-ROX (Perkin-Elmer) em cada linha. Dessa forma foi possível analisar simultaneamente três reações de amplificação seletiva, cada uma marcada com uma fluorescência diferente, em cada gel. Inicialmente, foram transferidas alíquotas de 8 μL , 6 μL e 5 μL das reações contendo fragmentos marcados com as fluorescências JOE, TAMRA e FAM (amarela, azul e verde), respectivamente, para uma placa de ELISA. Dessa mistura, foram transferidos 3,5 μL para os tubos de PCR e adicionados 0,25 μL de GENESCAN 500-ROX; 0,50 μL tampão de amostra concentrado e 0,75 μL de formamida deionizada. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por cinco minutos e mantidas em gelo até serem aplicadas no gel.

Tabela 2 . Identificação dos oito *primers* seletivos *EcoRI* (E1 a E8) e oito *primers* seletivos *MseI* (M1a M8) e das 64 combinações possíveis entre os *primers* seletivos AFLP. Cada um dos *primers* seletivos apresenta uma combinação específica dos nucleotídeos (A = adenina, T = timina, C = citosina e G = guanina) na extremidade 3' do *primer*.

	M₁(-CAA)	M₂ (-CAC)	M₃ (-CAG)	M₄(-CAT)	M₅(-CTA)	M₆(-CTC)	M₇(-CTG)	M₈(-CTT)
E₁(-AAC)	AACCAA	AAC CAC	AAC CAG	AAC CAT	AAC CTA	AAC CTC	AAC CTG	AAC CTT
E₂(-AAG)	AAG CAA	AAG CAC	AAG CAG	AAG CAT	AAG CTA	AAG CTC	AAG CTG	AAG CTT
E₃(-ACA)	ACA CAA	ACA CAC	ACA CAG	ACA CAT	ACA CTA	ACA CTC	ACA CTG	ACA CTT
E₄ (-ACC)	ACC CAA	ACC CAC	ACC CAG	ACC CAT	ACC CTA	ACC CTC	ACC CTG	ACC CTT
E₅(-ACG)	ACG CAA	ACG CAC	ACG CAG	ACG CAT	ACG CTA	ACG CTC	ACG CTG	ACG CTT
E₆ (-ACT)	ACT CAA	ACT CAC	ACT CAG	ACT CAT	ACT CTA	ACT CTC	ACT CTG	ACT CTT
E₇(-ACG)	ACG CAA	ACG CAC	ACG CAG	ACG CAT	ACG CTA	ACG CTC	ACG CTG	ACG CTT
E₈ (-AGG)	AGG CAA	AGG CAC	AGGCAG	AGG CAT	AGG CTA	AGG CTC	AGG CTG	AGG CTT

3.3.3. Análise Estatística

Os dados das bandas RAPD polimórficas foram utilizados para a construção de uma matriz de dados binários, pela atribuição de 1 à presença e 0 à ausência de determinada banda. A distância genética entre os pares foi calculada com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979). Este dados foram utilizados para construir a matriz de dissimilaridade genética utilizada pela análise do método do vizinho mais próximo, método para a determinação dos agrupamentos (Dias, 1998).

O agrupamento foi realizado também por meio do método de otimização de Tocher, o qual consiste em identificar na matriz de dissimilaridade o par de acessos mais similares entre si, formando um grupo inicial e, a partir desse, foi avaliada a possibilidade de inclusão de novos acessos no grupo, adotando-se o critério de que a médias das medidas de dissimilaridade dentre de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre os grupos (Cruz e Regazzi, 1997).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Morfológica

Para caracterizar os acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH), nesta etapa do trabalho foram analisadas oito características da morfologia floral de 40 acessos mantidos no BGH. Essas características foram selecionadas com base nos descritores econômicos recomendados pelo IPIGRI (1996) para a cultura do tomateiro. Foram analisados: comprimento de sépalas, comprimento de pétalas, comprimento de filete, comprimento de estilete, comprimento de antera, diâmetro de estigma, número de lóculos e diâmetro de ovário.

4.1.1. Análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo

No método hierárquico do vizinho mais próximo, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis até que seja estabelecido um dendrograma. As delimitações dos grupos podem ser definidas por exame visual do dendrograma, quando são detectados os pontos de alta mudança de nível. Ao efetuar cortes nesses pontos, estabelecem-se os grupos e os números de indivíduos de cada grupo (Cruz e Regazzi, 1997).

O dendrograma (Figura 1) obtido pela análise de agrupamento pelo método hierárquico do vizinho mais próximo, com base na distância de Mahalanobis. O método de agrupamento admite diferentes interpretações, de acordo com o critério de análise do investigador. Um corte a 35% de distância genética relativa, leva à formação de 13 grupos de acessos (Tabela 3). A 70% de distância, nota-se a presença de quatro diferentes grupos (Tabela 4). E a 90% de distância, tem-se a presença de três grupos (Tabela 5). Nas Tabelas 3, 4 e 5 observa-se que os acessos 17 e 29 apresentaram-se isolados dos outros acessos, em dois grupos constituídos por um único acesso cada. Certamente, estes acessos possuem particularidades que os tornam divergentes dos demais. A localização geográfica poderia ser uma das hipóteses levantadas para tal divergência. No entanto, outros acessos foram

também coletados nas mesmas regiões de procedência dos acessos 17 (Goiânia, GO) e 29 (Cuiabá, MT). O acesso 17, por exemplo, não se enquadra na caracterização morfológica da espécie *L. esculentum*, pois possui números de pétalas (6 a 13), sépalas (6 a 14) e de lóculos (3 a 23) bem maiores do que aqueles que são característicos da espécie. Não é possível afirmar se esse acesso não tenha sofrido algum tipo de interferência por parte do homem. Seria interessante promover cruzamentos entre esse acesso e outros materiais já caracterizados para confirmar ou refutar a hipótese de que se trata de *L. esculentum* ou de outra espécie do gênero *Lycopersicon*. Se observarmos a Figura 1, o acesso 17, mesmo que seja feito um corte em 100% de distância, ficará num grupo isolado, indicando que dentre os acessos ele é o mais divergente.

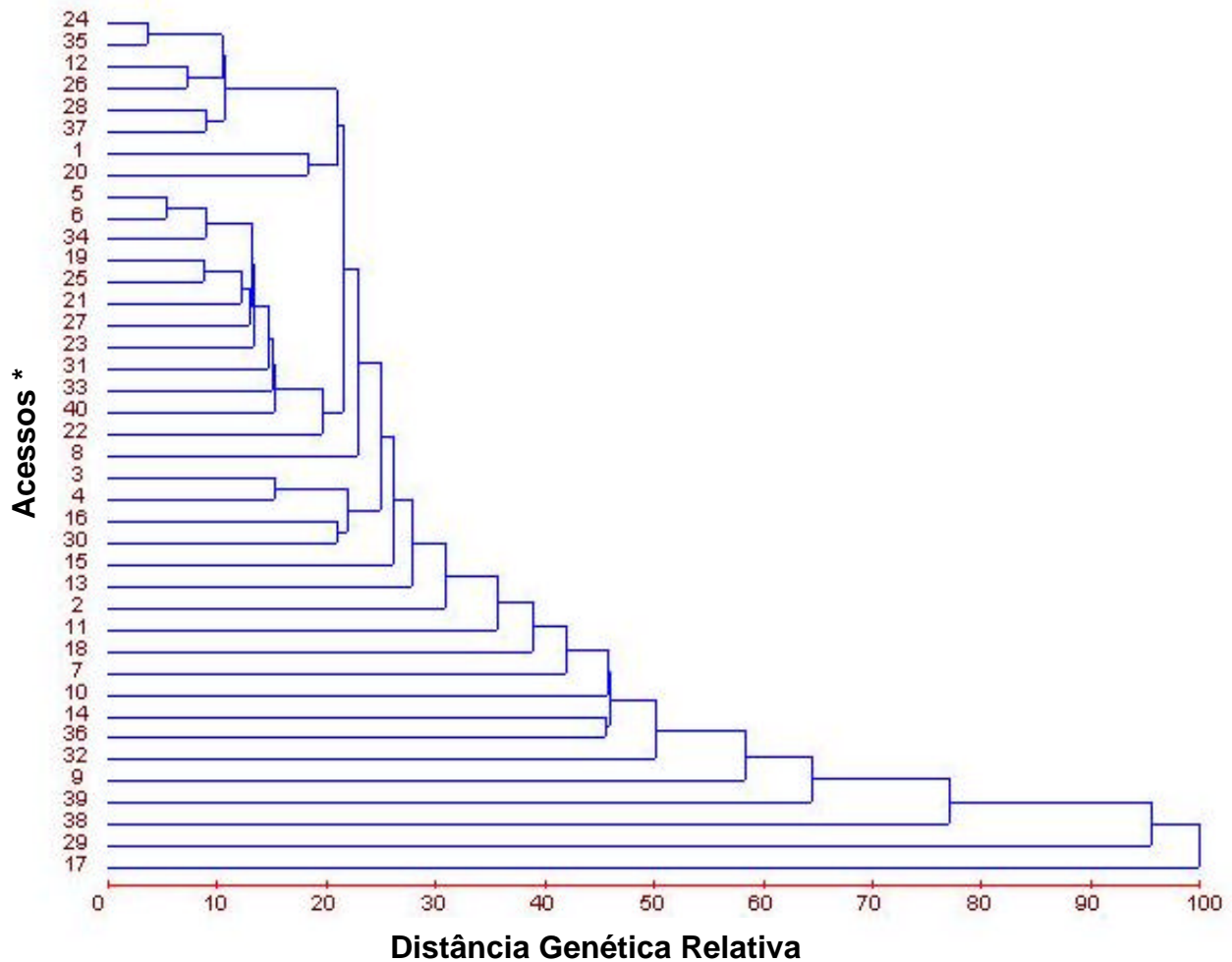


Figura 1. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os acessos, obtida pelo método hierárquico do vizinho mais próximo.
 * Numeração dos acessos de acordo com a Tabela 1 (Materiais e Métodos)

Tabela 3. Agrupamento dos acessos de tomate, pelo método do vizinho mais próximo, com base no dendrograma da Figura 1, considerando um corte a 35% de distância genética relativa.

Grupos	Acessos
1	24, 35, 12, 26, 28, 37, 1, 20, 5, 6, 34, 19, 25, 21, 27, 23, 31, 33, 40, 22, 8, 3, 4, 16, 30, 15, 13.
2	11
3	18
4	7
5	10
6	14
7	36
8	32
9	9
10	39
11	38
12	29
13	17

Tabela 4. Agrupamento dos acessos de tomate, pelo método do vizinho mais próximo, com base no dendrograma da Figura 1, considerando um corte a 70% de distância genética relativa.

Grupos	Acessos
1	24, 35, 12, 26, 28, 37, 1, 20, 5, 6, 34, 19, 25, 21, 27, 23, 31, 33, 40, 22, 8, 3, 4, 16, 30, 15, 13, 2, 11, 18, 7, 10, 14, 36, 32, 9, 39.
2	38
3	29
4	17

Tabela 5. Agrupamento dos acessos de tomate, pelo método do vizinho mais próximo, com base no dendrograma da Figura 1, considerando um corte a 90% de distância genética relativa.

Grupos	Acessos
1	24, 35, 12, 26, 28, 37, 1, 20, 5, 6, 34, 19, 25, 21, 27, 23, 31, 33, 40, 22, 8, 3, 4, 16, 30, 15, 13, 2, 11, 18, 7, 10, 14, 36, 32, 9, 39, 38.
2	29
3	17

4.1.2. Análise de agrupamento pelo método de Tocher

Uma vez que os dados morfológicos foram obtidos com repetição, eles também foram utilizados para o cálculo da distância generalizada de Mahalanobis (D^2). Esse tipo de distância leva em consideração a correlação entre os caracteres analisados. De acordo com as distâncias de Mahalanobis, entre os pares de acessos, verificou-se que o valor mínimo ocorreu entre o par de acessos 24 e 35 ($D^2 = 0,61$) e o máximo para o par 17 e 38 ($D^2 = 77,01$), sendo estes últimos, então, os acessos mais divergentes.

No Método de otimização de Tocher, no qual a utiliza-se a distância de Mahalanobis, a formação dos grupos se dá pela otimização de algum critério de agrupamento. Deste modo, a participação do grupo de indivíduos é realizada por meio da maximização ou minimização de alguma medida pré-fixada, em que os grupos formados são mutuamente exclusivos (Moreira et. al., 1994).

Na Tabela 6 observa-se que houve formação de oito grupos. No grupo 1 está a maior parte dos acessos (70%), e os outros 30% estão distribuídos nos demais grupos da seguinte forma: grupo 2 (10%), grupos 3 e 4 (5%), grupos 5, 6, 7 e 8 (2,5%). Quando comparado com método hierárquico do vizinho mais próximo (Figura 1), o de Tocher forneceu resultados parcialmente semelhantes. Pelo método do vizinho mais próximo, o acesso 29 formou um grupo isolado. Já no método de Tocher, este acesso formou um grupo com o acesso 11. No

método do vizinho mais próximo, o acesso 17 é o mais divergente e pelo método de Tocher, o mais divergente é o acesso 10.

Resultados contrastantes entre esses métodos também foram encontrados por Amaral Júnior (1996), ao avaliar a eficiência da predição do comportamento de híbridos de tomate, por intermédio da correlação entre a distância genética dos genitores e a média dos híbridos, assim como a heterose e a capacidade específica de combinação destes. Da mesma forma, resultados contrastantes foram encontrados por Morais (1992), ao avaliar o potencial de cultivares de arroz irrigado, e por Carvalho (1993), no estudo de divergência genética de algodoeiro herbáceo. No entanto, a discordância nos agrupamentos é perfeitamente aceitável, uma vez que os métodos se baseiam em princípios estatísticos distintos.

Com relação à origem geográfica dos acessos, ambos os métodos de agrupamento forneceram os mesmos resultados, ou seja, não houve relação entre os grupos formados e a procedência dos acessos. Tais resultados eram esperados, uma vez que esses acessos foram coletados na década de 1960 e não há informações a respeito do nível de intercâmbio de materiais genéticos no país à época. Os acessos 8, 9, 10 e 11, por exemplo, são provenientes da cidade de Vitória de Santo Antão (PE), mas como pode ser observado na Tabela 6, eles não ficaram no mesmo grupo e o acesso 10 distanciou-se consideravelmente dos dois primeiros. Além disso, a maioria dos acessos provenientes de Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso e São Paulo (Tabela 1) agruparam-se no grupo 1 (Tabela 6). Nenhum dos estados teve seus acessos agrupados em um mesmo grupo.

Tabela 6. Agrupamento pelo Método de otimização de Tocher, com base em oito características morfológicas avaliadas entre os 40 acessos de tomateiro.

Grupos	Acessos*															
1	24	35	26	12	37	28	22	20	6	34	5	25	4	3	30	19
	33	21	16	23	15	27	31	40	8	13	2	1				
2	14	36	39	32												
3	7	18														
4	11	29														
5	17															
6	9															
7	38															
8	10															

* Numeração dos acessos de acordo com a Tabela 1 (Materiais e Métodos)

4.1.3. Análise por Variáveis Canônicas

Para determinar a contribuição de cada variável original para a variação total observada entre acessos, foi realizada a análise por variáveis canônicas. Cada variável canônica é uma combinação linear das variáveis originais, de forma a representar, em níveis decrescentes, porções da variância total (Das e Gupta, 1984; Cruz e Regazzi, 1997).

Percebe-se que as três primeiras variáveis canônicas (Tabela 7) explicaram 72,92% da variação total (30,55% para a primeira, 27,02% para a segunda e 15,33% para a terceira). De acordo com Cruz e Regazzi (1997), para que haja grau de distorção desprezível na transposição de um espaço n-dimensional para o bidimensional, é necessário que as duas primeiras variáveis canônicas expliquem um mínimo de 80% da variação total. Segundo esses autores, quando esse limite não é atingido, recomenda-se a complementação da dispersão gráfica em relação a terceira e, se necessário, utiliza-se também a quarta variável canônica. No entanto, os gráficos de dispersão não foram construídos, pois em análises preliminares verificou-se que a distorção obtida seria maior do que 20% (dados não mostrados).

Tabela 7. Escores dos 40 acessos de tomateiro em relação às oito variáveis canônicas.

Variável Canônica	Autovalor	Variância (%)	Variância Acumulada (%)
VC1	2,8265	30,5590	30,5590
VC2	2,4994	27,0219	57,5810
VC3	1,4187	15,3389	72,9200
VC4	1,1063	11,9610	84,8810
VC5	0,6341	6,8564	91,7375
VC6	0,3898	4,2147	95,9522
VC7	0,2466	2,6664	98,6186
VC8	0,1277	1,3813	100,0000

4.1.4. Importância relativa das características para a divergência

Na aplicação de análises multivariadas, em princípio, utiliza-se um número considerável de características de importância para a cultura, para a determinação da divergência existente entre os acessos. No entanto, se o número de características utilizado for elevado, é possível que muitas delas contribuam pouco para a discriminação dos acessos, por serem relativamente invariantes entre si ou serem redundantes, em virtude de apresentarem alta correlação com outras características. A redução do número de características, com eliminação daquelas que menos contribuem para o estudo, deve facilitar a interpretação dos dados, sem causar perda considerável de informações (Cruz, 1990; Xavier 1996).

Na Tabela 8 observa-se a importância relativa de cada característica estudada em relação aos 40 acessos de tomate, pelo método de Singh (1981), organizados em ordem decrescente de importância para a divergência genética.

Tabela 8. Importância relativa dos caracteres avaliados nos acessos de tomateiro.

Característica	Valor em %
Comprimento de Sépalas	23,92
Comprimento de Filete	15,44
Comprimento de Estilete	14,23
Diâmetro de Estigma	12,72
Comprimento de Antera	12,65
Número de Lóculos	11,34
Comprimento de Pétalas	5,04
Diâmetro de Ovário	4,60

4.2. Caracterização Molecular

Apesar da análise de caracteres da morfologia floral ter permitido a separação dos acessos em grupos distintos, foi também realizada a sua caracterização por marcadores moleculares do DNA, com o objetivo de complementar os estudos morfológicos. Esses marcadores são abundantes, não sofrem influência do ambiente e portanto, levantou-se a hipótese de que permitiriam uma análise dos acessos com maior resolução.

4.2.1. Extração do DNA total

O método do CTAB para a extração do DNA utilizado nas ampliações pelas técnicas de RAPD e AFLP, mostrou-se bastante eficiente, possibilitando a obtenção de grande quantidade de DNA, com um grau de pureza suficiente para as ampliações (Tabela 9).

As concentrações das amostras de DNA obtidas a partir dos 41 acessos de *Lycopersicon esculentum* foram estimadas por meio de leitura espectrofotométrica a 260 nm e variaram entre 58,40 e 569 µg/µL (Tabela 9). A razão A260/A280, que indica o grau de pureza da amostra, variou entre 1,19 e 1,84, indicando que nem todas as amostras apresentavam um elevado grau de pureza (Sambrook *et al.*, 1989). A integridade do DNA foi avaliada

visualmente por análise eletroforética em gel de agarose 0,8%. Como pode ser observado na Figura 2, as amostras apresentaram baixo nível de degradação.

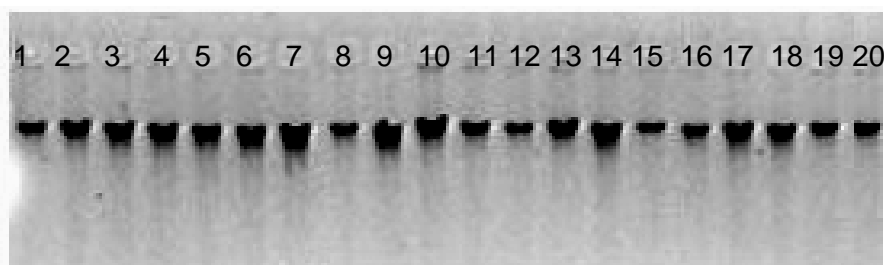


Figura 2. Análise da integridade do DNA extraído a partir de 20 acessos de *Lycopersicon esculentum*.

Tabela 9. Leituras espectrofotométricas e concentração de DNA dos 41 acessos de tomateiro.

Acessos	A260nm	A280nm	Razão A260/A280	Concentração (mg/mL)
1	0,85	0,56	1,52	426,90
2	0,38	0,28	1,37	194,95
3	0,21	0,14	1,50	109,90
4	0,17	0,09	1,79	86,15
5	0,31	0,20	1,55	157,85
6	0,75	0,47	1,59	377,70
7	0,59	0,38	1,57	298,30
8	1,13	0,83	1,36	569,00
9	0,47	0,31	1,51	237,20
10	0,49	0,36	1,36	248,75
11	0,14	0,07	1,84	73,05
12	0,47	0,36	1,32	237,70
13	0,58	0,41	1,39	290,95
14	0,53	0,37	1,43	267,35
15	0,31	0,20	1,54	158,55
16	0,23	0,17	1,34	119,80
17	0,57	0,40	1,44	289,65
18	0,65	0,42	1,53	325,75

Continua.....

Acessos	A260nm	A280nm	Razão A260/A280	Concentração (mg/mL)
19	0,82	0,56	1,48	414,95
20	0,75	0,57	1,32	376,70
21	0,97	0,71	1,36	487,30
22	0,48	0,33	1,44	240,80
23	0,88	0,64	1,38	444,80
24	1,12	0,74	1,52	562,00
25	0,33	0,22	1,50	169,90
26	0,65	0,45	1,44	325,75
27	0,29	0,20	1,48	149,85
28	0,23	0,16	1,41	119,70
29	0,50	0,32	1,55	254,80
30	0,61	0,35	1,72	309,45
31	0,69	0,42	1,64	346,75
32	0,90	0,58	1,55	454,30
33	0,64	0,38	1,65	321,20
34	1,42	1,20	1,19	714,80
35	1,06	0,71	1,48	532,15
36	0,56	0,35	1,61	283,25
37	0,45	0,27	1,64	225,25
38	1,06	0,73	1,45	534,15
39	0,11	0,06	1,76	58,40
40	0,21	0,14	1,52	109,05
41	0,54	0,34	1,59	273,95

4.2.2. Análise por marcadores RAPD

Nesta etapa do trabalho, após a quantificação do DNA dos acessos, foi realizado um teste com dois dos 41 acessos, tomados ao acaso, utilizando 456 *primers* RAPD. Este teste permitiu a seleção de 30 *primers* que apresentaram bandas polimórficas e somente estes foram testados nos 41 acessos. Os 30 *primers* (Tabela 10) geraram 244 bandas e destas 64 (35%) foram polimórficas. O número de bandas por *primer* variou entre um (OPAC-6, OPAD-10, OPAG-

07, OPAG-15, OPAH-02, OPAM-02, OPF-16, OPL-13, OPP-17, OPR-19 e OPX-17) e cinco (OPK-04), sendo este o *primer* que mais evidenciou polimorfismos.

Com relação ao número adequado de marcadores para o estudo de diversidade genética, Santos (1994) salientou que o ideal é a utilização de quantidade suficiente de *primers* que permita cobrir a quase totalidade do genoma. Segundo Colombo et al. (1998) citado por Lima *et al.* (2003), 10 a 30 *primers*, gerando 50 a 100 bandas polimórficas, seriam suficientes para estimar relações genéticas dentro e entre espécies.

Tabela 10. Relação dos 30 *primers* e o número de bandas polimórficas a eles associados.

<i>Primer</i>	Bandas polimórficas	<i>Primer</i>	Bandas polimórficas	<i>Primer</i>	Bandas polimórficas
A1	4	AH2	1	P17	1
AC6	1	AJ13	4	R15	3
AD10	1	AM2	1	R19	1
AD12	4	AM9	3	W2	3
AE3	2	AN7	2	W6	3
AE10	3	C19	2	W9	2
AE15	2	F16	1	W13	2
AF20	3	K4	5	W15	2
AG7	1	L13	1	W16	2
AG15	1	P16	2	X17	1

4.2.3. Dissimilaridade genética por meio de análises multivariadas

Após ter estudado a diversidade genética de 40 acessos de tomateiro a partir de características morfológicas da flor, por meio de análises multivariadas, foi realizado também o estudo molecular com 41 acessos, por meio de análises multivariadas.

Os padrões de bandas RAPD de maior intensidade e cuja amplificação pôde ser reproduzida, foram transformados em planilhas do programa computacional Excel, considerando-se 1 para presença e 0 para ausência de

banda. Esses dados permitiram a determinação das distâncias genéticas entre os acessos, as quais variaram entre 7% e 69% (Tabela 11). A maior distância genética observada (69%), foi entre os acessos 16 e 22 provenientes de Petrolândia (PE) e Goiás (GO), respectivamente. A menor distância genética observada (7%), foi entre os acessos 3 e 4, provenientes de Teófilo Otoni (MG) e Vitória da Conquista (BA), cidades localizadas a cerca de 200 km uma da outra. A distância de 7% foi também obtida entre os acessos 5 e 13, ambos provenientes da Bahia, das cidades de Feira de Santana e Alagoinhas, respectivamente.

Tabela 11. Matriz de distâncias genéticas entre os acessos de *Lycopersicon esculentum* Mill. analisados dois a dois. Os acessos estão identificados pelos números dispostos de 1 a 41, de acordo com a Tabela 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41									
1	0																																																	
2	0,11	0																																																
3	0,19	0,13	0																																															
4	0,17	0,16	0,07	0																																														
5	0,18	0,19	0,17	0,10	0																																													
6	0,11	0,14	0,17	0,15	0,09	0																																												
7	0,09	0,14	0,17	0,17	0,13	0,09	0																																											
8	0,17	0,20	0,24	0,24	0,15	0,13	0,10	0																																										
9	0,21	0,17	0,25	0,20	0,17	0,14	0,16	0,21	0																																									
10	0,37	0,33	0,29	0,29	0,32	0,29	0,34	0,35	0,18	0																																								
11	0,14	0,15	0,14	0,14	0,19	0,16	0,12	0,19	0,18	0,26	0																																							
12	0,25	0,26	0,25	0,22	0,23	0,23	0,18	0,23	0,20	0,31	0,20	0																																						
13	0,17	0,18	0,14	0,07	0,08	0,10	0,12	0,19	0,16	0,29	0,16	0,20	0																																					
14	0,31	0,29	0,23	0,23	0,24	0,21	0,26	0,26	0,23	0,29	0,25	0,32	0,21	0																																				
15	0,16	0,21	0,20	0,17	0,18	0,13	0,11	0,20	0,19	0,35	0,17	0,21	0,15	0,24	0																																			
16	0,51	0,54	0,48	0,48	0,49	0,48	0,42	0,53	0,47	0,46	0,50	0,42	0,48	0,55	0,37	0																																		
17	0,23	0,24	0,28	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,32	0,18	0,22	0,16	0,25	0,21	0,49	0																																	
18	0,19	0,18	0,19	0,16	0,15	0,15	0,15	0,21	0,14	0,26	0,16	0,20	0,12	0,23	0,17	0,45	0,18	0																																
19	0,27	0,28	0,24	0,22	0,18	0,22	0,22	0,23	0,21	0,22	0,24	0,26	0,20	0,27	0,28	0,42	0,19	0,17	0																															
20	0,21	0,17	0,20	0,18	0,12	0,16	0,14	0,16	0,18	0,29	0,18	0,22	0,13	0,25	0,19	0,46	0,20	0,16	0,16	0																														
21	0,26	0,29	0,33	0,33	0,34	0,31	0,23	0,26	0,35	0,44	0,30	0,32	0,31	0,34	0,34	0,66	0,33	0,33	0,32	0,28	0																													
22	0,23	0,34	0,36	0,33	0,32	0,28	0,26	0,26	0,38	0,47	0,30	0,38	0,31	0,40	0,34	0,69	0,33	0,36	0,32	0,33	0,11	0																												
23	0,23	0,26	0,25	0,25	0,23	0,18	0,16	0,21	0,24	0,40	0,22	0,27	0,25	0,39	0,23	0,47	0,27	0,30	0,32	0,25	0,28	0,25	0																											
24	0,18	0,19	0,24	0,22	0,20	0,16	0,13	0,20	0,19	0,32	0,15	0,21	0,20	0,34	0,16	0,40	0,17	0,20	0,25	0,19	0,29	0,27	0,16	0																										
25	0,29	0,28	0,24	0,27	0,23	0,25	0,20	0,18	0,26	0,33	0,24	0,23	0,22	0,30	0,28	0,48	0,19	0,24	0,23	0,22	0,27	0,24	0,21	0,23	0																									

Continua...

Tabela 11 – Continuação

26	0,21	0,22	0,23	0,20	0,19	0,19	0,16	0,21	0,20	0,29	0,15	0,22	0,18	0,31	0,19	0,49	0,20	0,18	0,24	0,18	0,25	0,20	0,17	0,14	0,14	0															
27	0,28	0,27	0,21	0,21	0,20	0,24	0,21	0,26	0,20	0,24	0,20	0,18	0,21	0,28	0,22	0,33	0,23	0,16	0,12	0,18	0,31	0,31	0,25	0,17	0,20	0,16	0														
28	0,30	0,29	0,23	0,25	0,21	0,23	0,21	0,23	0,22	0,32	0,20	0,29	0,23	0,23	0,21	0,52	0,30	0,23	0,29	0,20	0,28	0,28	0,22	0,21	0,22	0,15	0,16	0													
29	0,25	0,26	0,25	0,25	0,19	0,20	0,20	0,18	0,29	0,37	0,24	0,29	0,23	0,33	0,26	0,50	0,27	0,20	0,26	0,19	0,31	0,28	0,22	0,23	0,21	0,14	0,20	0,17	0												
30	0,19	0,24	0,23	0,23	0,21	0,16	0,12	0,14	0,25	0,37	0,22	0,24	0,20	0,28	0,21	0,46	0,23	0,20	0,27	0,23	0,28	0,25	0,19	0,19	0,19	0,18	0,20	0,18	0,12	0											
31	0,19	0,25	0,21	0,21	0,24	0,21	0,19	0,19	0,28	0,38	0,23	0,33	0,23	0,32	0,27	0,51	0,26	0,28	0,27	0,28	0,32	0,29	0,23	0,24	0,27	0,23	0,26	0,26	0,23	0,15	0										
32	0,27	0,28	0,27	0,27	0,35	0,32	0,27	0,27	0,31	0,39	0,26	0,31	0,27	0,35	0,35	0,56	0,32	0,32	0,28	0,34	0,27	0,27	0,32	0,25	0,33	0,32	0,27	0,34	0,37	0,29	0,24	0									
33	0,24	0,23	0,31	0,29	0,25	0,22	0,20	0,20	0,21	0,32	0,26	0,28	0,24	0,34	0,25	0,59	0,26	0,24	0,25	0,21	0,32	0,32	0,28	0,20	0,30	0,23	0,24	0,26	0,26	0,23	0,22	0,27	0								
34	0,28	0,26	0,25	0,25	0,23	0,20	0,23	0,28	0,22	0,26	0,27	0,24	0,23	0,28	0,23	0,43	0,30	0,20	0,18	0,22	0,36	0,36	0,30	0,21	0,32	0,22	0,15	0,25	0,27	0,25	0,36	0,32	0,26	0							
35	0,21	0,18	0,19	0,19	0,17	0,17	0,15	0,14	0,16	0,32	0,20	0,22	0,16	0,23	0,20	0,48	0,18	0,14	0,20	0,16	0,26	0,28	0,23	0,17	0,20	0,16	0,14	0,16	0,18	0,13	0,16	0,24	0,14	0,18	0						
36	0,19	0,22	0,20	0,20	0,19	0,16	0,14	0,14	0,22	0,34	0,22	0,29	0,18	0,28	0,17	0,43	0,20	0,20	0,22	0,20	0,31	0,28	0,19	0,19	0,22	0,18	0,20	0,20	0,17	0,13	0,15	0,32	0,21	0,22	0,11	0					
37	0,20	0,26	0,25	0,22	0,21	0,18	0,18	0,23	0,17	0,28	0,24	0,24	0,20	0,25	0,19	0,42	0,24	0,20	0,23	0,24	0,32	0,30	0,22	0,19	0,23	0,15	0,15	0,17	0,19	0,15	0,20	0,33	0,23	0,16	0,15	0,10	0				
38	0,21	0,22	0,21	0,19	0,20	0,19	0,17	0,21	0,18	0,26	0,23	0,25	0,16	0,23	0,20	0,45	0,23	0,19	0,17	0,18	0,28	0,28	0,25	0,17	0,24	0,18	0,14	0,16	0,20	0,13	0,21	0,24	0,14	0,13	0,09	0,11	0,11	0			
39	0,28	0,29	0,23	0,28	0,24	0,23	0,21	0,21	0,32	0,42	0,29	0,32	0,23	0,31	0,21	0,46	0,28	0,30	0,29	0,25	0,31	0,25	0,22	0,26	0,19	0,25	0,23	0,25	0,25	0,23	0,26	0,34	0,31	0,27	0,20	0,13	0,22	0,20	0		
40	0,23	0,29	0,31	0,26	0,27	0,23	0,21	0,21	0,33	0,50	0,30	0,38	0,23	0,37	0,29	0,55	0,28	0,31	0,32	0,31	0,34	0,37	0,31	0,37	0,35	0,39	0,38	0,39	0,39	0,28	0,23	0,32	0,32	0,44	0,26	0,23	0,32	0,31	0,28	0	
41	0,30	0,28	0,30	0,32	0,33	0,28	0,23	0,25	0,34	0,49	0,34	0,39	0,27	0,36	0,28	0,54	0,35	0,30	0,37	0,27	0,33	0,42	0,35	0,31	0,37	0,41	0,38	0,38	0,44	0,30	0,36	0,31	0,31	0,32	0,27	0,30	0,39	0,27	0,27	0,25	0

4.2.3.1. Análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo

A Figura 3 apresenta o dendrograma obtido pela análise de agrupamento pelo método hierárquico do vizinho mais próximo, com base na distância Euclidiana média. A Tabela 12 apresenta a formação de 26 grupos a partir dos 41 acessos analisados, considerando um corte no eixo horizontal do dendrograma, realizado a 35% de distância genética relativa. Ao realizar o corte a 70% de distância, nota-se a presença de três diferentes grupos (Tabela 13), e a 90% de distância tem-se a presença de dois grupos (Tabela 14).

Pelas Tabelas 12, 13 e 14 pode-se observar que o acesso 16 formou um grupo isolado dos outros acessos. Mesmo a 100% de distância relativa (Figura 3), o acesso 16 permaneceu isolado, indicando que dentre os acessos ele é o mais divergente pelas análises moleculares. Assim como observado na análise morfológica, ficou claro na análise molecular que não há uma correlação entre diversidade genética e origem geográfica, pois o acesso 16, que foi coletado no mesmo estado (Pernambuco) dos acessos 8, 9, 10, 11 e 12, apresentou grande divergência com relação a estes. Por outro lado, os acessos 21 e 22 provenientes de Goiás, formaram um grupo isolado (Tabela 12), com corte realizado em 35% de distância genética. De acordo a matriz de distâncias genéticas (Tabela 11), a distância entre esses acessos é de 11% , mostrando que eles são geneticamente muito próximos entre si.

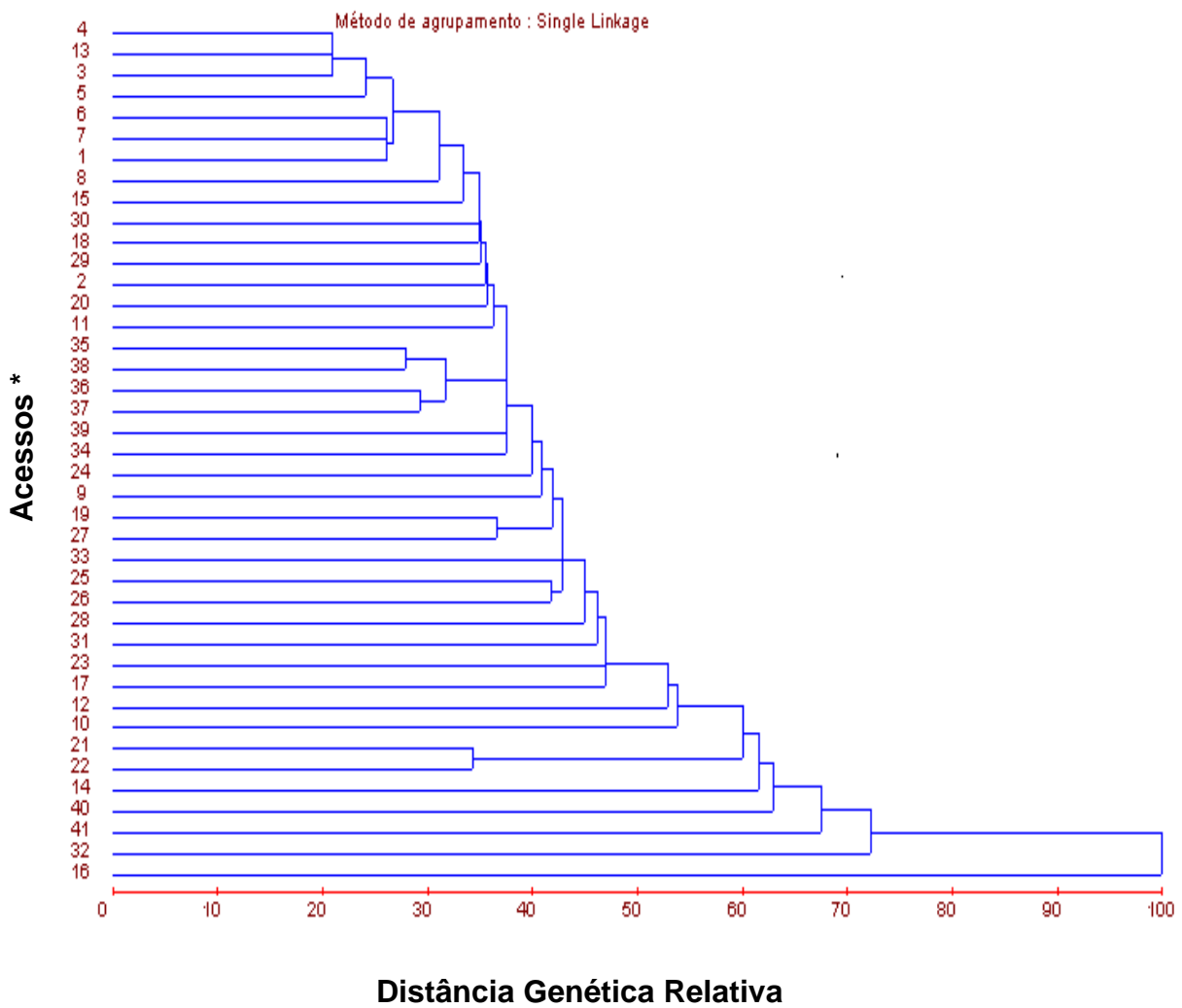


Figura 3. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os acessos de tomateiro, obtida pelo método hierárquico do vizinho mais próximo. * Numeração dos acessos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 12. Agrupamento dos acessos de tomateiro, pelo método do vizinho mais próximo, com base no dendrograma da Figura 3, considerando um corte a 35% de distância genética relativa.

Grupos	Acessos
1	4, 13, 3, 5, 6, 7, 1, 8, 15, 30, 18, e 29
2	2
3	20
4	11
5	37, 36, 38 e 35
6	39
7	34
8	24
9	9
10	19
11	27
12	33
13	25
14	26
15	28
16	31
17	23
18	17
19	12
20	10
21	21 e 22
22	14
23	40
24	41
25	32
26	16

Tabela 13. Agrupamento dos acessos de tomateiro, pelo método do vizinho mais próximo, com base no dendrograma da Figura 3, considerando um corte a 70% de distância genética relativa.

Grupos	Acessos
1	4, 13, 3, 5, 6, 7, 1, 8, 15, 30, 18, 29, 2, 20, 11, 35, 38, 36, 37, 39, 34, 24, 9, 19, 27, 33, 25, 26, 28, 31, 23, 17, 12, 10, 21, 22, 14, 40, e 41
2	32
3	16

Tabela 14. Agrupamento dos acessos de tomateiro, pelo método do vizinho mais próximo, com base no dendrograma da Figura 3, considerando um corte a 90% de distância genética relativa.

Grupos	Acessos
1	4, 13, 3, 5, 6, 7, 1, 8, 15, 30, 18, 29, 2, 20, 11, 35, 38, 36, 37, 39, 34, 24, 9, 19, 27, 33, 25, 26, 28, 31, 23, 17, 12, 10, 21, 22, 14, 40, 41 e 32
2	16

4.2.3.2. Análise de agrupamento pelo método de Tocher

Observa-se (Tabela 15) que houve a formação de apenas dois grupos; no grupo 1 foram agrupados todos os acessos, com exceção do acesso 16, que foi agrupado no grupo 2. Este resultado está de acordo com aquele obtido pelo método de agrupamento do vizinho mais próximo, no qual o acesso 16 mostrou-se bastante divergente dos demais (Figura 3).

A estimativa de distâncias de elevada magnitude entre pares de indivíduos do grupo 1, como entre acessos 10 e 40 (50%), indica a presença de variabilidade dentro deste grupo, justificando-se, então o subagrupamento. A

formação dos grupos e subgrupos de acessos pelo Método de Tocher, utilizando-se como medida de dissimilaridade a matriz de distância genética gerada pelos coeficientes de dissimilaridade com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), está apresentada na Tabela 16. Foram formados oito subgrupos, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 e 1.8, comprovando a existência de variação entre a maior parte dos acessos.

Todos os acessos provenientes de Minas Gerais, a maioria dos acessos da Bahia, Mato Grosso e São Paulo foram agrupados no subgrupo 1.1 (Tabela 16), reforçando, mais uma vez, que não existe relação entre diversidade genética e origem geográfica dos acessos analisados.

Tabela 15. Agrupamento pelo Método de otimização de Tocher, com base na matriz de distância genética avaliada entre os 41 acessos de tomateiro.

Grupos	Acessos																
1	3	4	13	5	6	18	7	11	1	2	15	20	35	8	36	38	24
	9	26	30	37	27	17	34	29	28	19	25	23	12	31	33		
	39	14	32	22	21	40	41	10									
2	16																

Tabela 16. Agrupamento pelo Método de otimização de Tocher, com base na matriz de distância genética avaliada entre os 41 acessos de tomateiro.

Grupos	Subgrupos	Acessos															
1		3	4	13	5	6	17	7	11	1	2	15	19				
	1.1	34	8	35	37	23	9	25	29	36	26						
		16	33	28	27	18	24	22	12	30	32						
	1.2	20	21														
	1.3	31															
	1.4	38															
	1.5	39															
	1.6	14															
	1.7	40															
	1.8	10															
2		16															

Quando comparado ao método hierárquico do vizinho mais próximo (Figura 3), o de Tocher mostrou resultados semelhantes. Pelo método do vizinho mais próximo, foram estabelecidos dois grupos, quando o corte foi realizado a 90% de distância. Os dois métodos demonstraram que o acesso 16 foi o mais divergente.

4.2.4. Análise por marcadores AFLP

O AFLP representa uma das tecnologias mais recentes para obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de eucariotos e procaríotos. O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR. Além disso, é um marcador muito utilizado em estudos moleculares de espécies de plantas cultivadas que apresentam uma baixa taxa de polimorfismo de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Apesar destas vantagens, neste trabalho com 41 acessos de tomateiro não foi evidenciada bandas polimórficas, utilizando 24 combinações de *primers* AFLP, por esta razão não foi realizada nenhuma análise estatística dos dados.

4.2.5 Análise morfológica versus análise molecular

A partir da observação dos resultados da análise morfológica e molecular, podemos concluir que eles não foram concordantes; na análise morfológica o acesso 17 foi o mais divergente e na análise molecular foi o acesso 16. Com relação ao método do vizinho mais próximo, realizando um corte a 35% de distância genética relativa, foi observado a formação de 13 grupos pela análise morfológica e 26 grupos pela análise molecular. A partir da análise das matrizes de distância genética, observamos que os pares de acessos mais divergentes e os menos divergentes, pela análise morfológica foram 17-38 e 24-35, respectivamente, e pela análise molecular foram os pares 16-22 os mais divergentes e 3-4 e 5-13 os menos divergentes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Roldán-Ruiz *et al.* (2001), em estudo comparativo entre as análises morfológica e molecular na descrição do

parentesco entre variedades de centeio, no qual a correlação de Pearson foi negativa entre as dissimilaridades morfológicas e as moleculares. E em alguns trabalhos (Wayne e O'Brien, 1986; Moser e Lee, 1994; Schmitt *et al.*, 1995 e Burstin e Charcosset, 1997), não houve correlação significativa entre as distâncias morfológicas e as moleculares.

5. CONCLUSÕES

Com o objetivo de realizar a caracterização morfológica e molecular de acessos de *Lycopersicon esculentum* do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, foram feitas análise da sua morfologia floral e a do seu genoma por marcadores moleculares RAPD e AFLP.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- 1- Os acessos possuem considerável variabilidade em relação às características morfológicas.
- 2- Não houve relação entre a origem geográfica dos acessos e a sua diversidade genética, considerando a caracterização morfológica e molecular.
- 3- A técnica RAPD mostrou-se confiável e de fácil execução, credenciando esse tipo de marcador como uma ferramenta na avaliação da diversidade genética de tomate.
- 4- Os resultados indicam que não existe material duplicado entre os acessos caracterizados.
- 5- Os agrupamentos obtidos, com base nos dados morfológicos e moleculares não foram coincidentes entre si, provavelmente pelo fato das marcas moleculares obtidas não estarem relacionadas com os genes ligados à determinação da morfologia floral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL . Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: **FNP Consultoria e Comércio**, 545p. 2001.

ALCÂNTARA NETO, F. de. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. Viçosa: UFV, 46p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G.S.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, G.A.; PAULA Jr., T.J.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E.G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 85-88. 1997.

AMARAL JUNIOR, A. T. do. **Análise dialélica de betacaroteno, vitamina C, sólidos solúveis e produção e variabilidade em cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via marcadores RAPD**. Viçosa: UFV, 198p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

AMARAL JUNIOR, A. T. do. **Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais**. Campos dos Goytacazes:UENF, 56p.1998.

ARESHCHENKOWA, T.; GANAL, M. W. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 229-235. 2002.

BERTINI, C. H. C. de M.; SCHUSTER, I.; SEDIYAMA T.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Determinação genética em cultivares de algodoeiro herbáceo por marcadores microssatélites. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Algodão**, p. 1-5. 2003.

BURSTIN, J.; CHARCOSSET, A. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. **Heredity**, v. 79, p.477-483. 1997.

CARVALHO, L. P. **Divergência Genética e análise dialélica em *Gossypium hirsutum* L. var *latifolium* Hutch.** Viçosa: UFV, 203p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.

CREGAN, P. B.; BHAGWAT, A. A.; AKKAYA, M. S.; ROGWEN, J. Microsatellite fingerprint and mapping of soybean. **Methodology Molecular Cellular Biology**, v. 5, p. 49-61. 1994.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** Piracicaba: ESALQ, 188p. Tese (Doutorado). 1990.

CRUZ, C. D. **Programa Genes:** aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 442p. 1997

CRUZ, C. D. e REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa, MG:UFV, 394p. 1997.

D'ARCY, W. G. *Solanaceae* studies. In: **The Biology and Taxonomy of the *Solanaceae*.** London: Academic Press, p.3-47. 1979.

DAS, P. K.; GUPTA, T. D. Multivariate analysis in black grain (*Vigna mungo* (L.) Herpper). **Indian Journal Genetics of Plant Breeding**, v. 44, n.18, p.243-247. 1984.

DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isozimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e animais.** Viçosa: UFV, p.405-475. 1998.

DIWAN, N.; CREGAN, P.B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p.723-733. 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1990.

EGASHIRA, H.; ISHIARA, H.; TAKASHINA, T.; IMANISHI, S. Genetic diversity of the 'peruvianum complex' (*Lycopersicon peruvianum* L.) and *L. chilense* revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, v. 116, p.23-31. 2000.

ESPINOSA, W. **Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco**. Brasília: IICA, 301p. 1991.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 2^a ed. London: Longman, 340p. 1981.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **World Agricultural Production**, Rome: 110p. (FAO Food and Nutrition. Paper, 51). 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1998.

GIORDANO, L. B.; SILVA, C. Hibridação em tomate. In: Borém, A. (Ed.) **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, p.463-480. 1999.

HARTMAN, J.B.; StCLAIR, D. A. Variation for insect resistance and horticultural traits in tomato inbred backcross populations derived from *Lycopersicon perellii*. **Crop Science**, v. 38, p.1501-1508. 1999.

IBGE, Anuário estatístico 2003 [04/05/2004]. (<http://www.ibge.gov.br>)

IPIGRI, Descriptors for tomato (*Lycopersicon* spp.). Roma: **IPIGRI**, 56p.1996.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Material de apoio a la capacitación en conservación *ex-situ* de recursos fitogenéticos**. Cali: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), 122p. 2000.

KALOO, G. Introducion. In: KALOO, G. (Ed.). **Genetic Improvement of tomato**. Berlin: Springer-Verlang, 358p. 1991.

LE-MINH-HONG. Aspectos basicos del mejoramiento del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para condiciones tropicales. **Cultivos Tropicales**, v. 14, n. 1, p.86-97. 1993.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p.397-401. 1989.

LIMA, M. R.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; RASEIRA, M. do C. B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p.349-355. 2003.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p.56-60. 2002.

MILACH, S. C. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: **Biowork I**, 1998, BORÉM, A.; DEL GIÚDICE, M. P.; SAKIYAMA, N. S.; MOREIRA, M.A.; PORTUGAL, R. S. (Eds.). Viçosa, p. 43-58, 1998.

MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O tomateiro**. 2º ed. Campinas: Fundação Cargil, 397p. 1989.

MÔNACO, L.C. **Melhoramento do tomateiro**. Boletim de Campo, v. 184, p.79-85, 1964.

MORAIS, O. P. **Análise multivariada da divergência genética dos progenitores, índices de seleção e seleção combinada numa população de arroz oriunda de intercruzamentos, usando macho-esterilidade.** Viçosa: UFV, 251p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.

MOREIRA, G. R. **Diversidade genética da suscetibilidade e coleção nuclear de *Tuta absoluta* em *Lycopersicon* spp.** Viçosa: UFV, 78p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W. dos; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagens e metodologia para avaliação de germoplasma.** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 115p. 1994.

MOSER, H.; LEE, M. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis and genetic variance in oats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 947-956. 1994.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 1, n. 1, p. 56-65. 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 155, p. 335-350. 1987.

NASS, L. L. **Utilização de recursos genéticos no melhoramento.** In: NASS, L. L. *et al.* (Eds.) Recursos genéticos e melhoramento – Plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p. 29-56. 2001.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p.5269-5273. 1979.

PINTO, C. M. F.; CASALI, V. W. D. Origem e botânica do tomateiro. **Informe Agropecuário**, v. 6, n.66, p.8-9. 1980.

RAO, C. R. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley and Sons, 389p. 1952.

RABBANI, M. A.; IWABUCHI, A.; MURAKAMI, Y.; SUKUZI, T.; TKAYANAGI, K. Phenotypic variation and the relationships among mustard (*Brassica juncea* L.) germplasm from Pakistan. **Euphytica**, v.101, p. 357-366. 1998.

RICK, C. M. Biosynthetic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In: HAWKES, J.G. *et al.* (Eds.). **The biology and taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press, p. 667-668. 1979.

RITSCHER, P. S. e HUAMÁN, Z. Variabilidade morfológica da coleção de germoplasma de batata-doce da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p.485-492. 2002.

ROLDÁN-RUIZ, I.; VAN, F. A. E.; GILLILAND, T. J.; DUBREUIL, P.; DILLMANN, C.; LALLEMAND, J.; LOOSE, M. D.; BARIL, C. P. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.1138-1150. 2001.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.43-48. 1995.

RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, v. 40, p. 442-450. 1997.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, B. K.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p.1350-1354. 1985.

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

SANTOS, J. B. dos. Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. **Horticultura Brasileira**, v. 12, n. 2, p.282-286. 1994.

SCHMITT, L. H.; KITCHENER, D. J.; HOW, R. A. A genetic perspective of mammalian variation and evolution in the Indonesian archipelago: biogeographic correlates in the fruit bat genus *Cynopterus*. **Evolution**, v. 49, p.399-412. 1995.

SILVA, D. J. H.; MOURA, M. C. C. L.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 2, p.108-114. 2001.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.41, p.237-245. 1981.

SULIMAN-POLLATSCHEK, S.; KASHKUSH, K.; SHATS, H.; HILLEL, J.; LAVI, U. Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum*. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v.7, p.583-597. 2002.

TAYLOR, I. B. Biosystematics of the tomato. In: ATHERTON, J. G., RUDICH, J. (Eds.) **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman e Hall, p.1-34. 1986.

THOMAS, M. R.; CAIN, P.; SCOTT, N. S. DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p.939-949.1994.

TINGEY, S.V.; DEL TUFO, J.P. Genetic analysis with Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Plant Physiology**, v.101, p.349-352. 1993.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: SPI, 62p.1996.

VASCONCELOS, M. J. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, p. 447-451. 1996

VILARINHOS, A. D.; PAULA Jr., T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 194-198.1995

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

XAVIER, A. **Aplicação da análise multivariada da divergência genética no melhoramento genético de *Eucalyptus* spp.** Viçosa: UFV, 126p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,1996.

WAYNE, R. K.; O'BRIEN, S. J. Empirical demonstration that structural genes and morphometric variation of mandible traits are uncoupled between mouse strains. **Journal of Mammalogy**, v. 67, p.441-449. 1986.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSAKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p.6531-6535. 1990.

7. APÉNDICE

Apêndice 1 - Matriz binária de dados RAPD

A	A1	A1	A1	A1	AC6	AD10	AD12	AD12	AD12	AD12	AE3	AE3	AE10	AE10	AE10	AE15	AE15	AF20	AF20	AF20	AG7	AG15	AH2	AJ13	AJ13	AJ13	AJ13	AM2	AM9	AM9	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
3	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
5	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
6	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	
7	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
8	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	
10	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
11	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
12	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	
13	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
14	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
15	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
16	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
17	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	
18	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
19	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	
20	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
21	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
22	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	
23	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	
24	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	
25	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	
26	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	
28	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
29	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	
30	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
31	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
32	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
34	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
35	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	
36	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	
37	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	
39	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	
40	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
41	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	

Apêndice 1 - Matriz binária de dados RAPD

Continuação

A	K4	K4	K4	K4	L13	P16	P16	P17	R15	R15	R15	R19	W2	W2	W2	W6	W6	W6	W9	W9	W13	W13	W15	W15	W16	W16	X17	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
9	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
10	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	
12	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
14	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
15	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
17	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
18	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
19	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
20	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
21	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	
22	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	
23	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	
24	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
25	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
26	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	
27	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
28	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
29	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	
32	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
33	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	
34	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
35	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
39	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	
40	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
41	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	

Apêndice 2- Matriz de dados Morfológicos

Acesso	CS	CP	CA	CF	CE	DE	NL	DO
1	1.5	1.5	1.0	0.3	0.9	0.3	2.0	2.2
2	1.6	1.5	1.0	0.2	0.7	0.6	2.6	2.0
3	1.6	1.4	1.0	0.1	0.8	0.7	4.2	1.7
4	1.4	1.4	1.0	0.1	0.9	0.4	3.0	1.9
5	1.3	1.4	0.9	0.2	0.9	0.3	2.0	1.6
6	1.4	1.3	0.9	0.2	0.9	0.3	2.0	1.6
7	0.7	1.1	0.8	0.1	0.8	0.8	5.6	1.9
8	1.1	1.2	0.8	0.1	0.8	0.4	4.4	1.9
9	2.0	1.5	1.0	0.1	1.0	0.4	2.0	3.1
10	1.2	1.2	0.8	0.3	0.8	0.2	2.0	1.2
11	1.8	1.6	0.9	0.1	0.8	1.0	5.6	2.6
12	1.8	1.4	0.9	0.2	0.9	0.4	2.0	1.5
13	1.0	1.4	0.8	0.2	0.8	0.3	2.0	1.0
14	1.3	1.5	1.0	0.3	0.8	0.7	6.0	2.8
15	1.1	1.3	0.9	0.1	0.8	0.7	4.0	1.9
16	1.5	1.4	0.9	0.2	0.8	0.6	2.0	1.7
17	1.3	1.3	0.9	0.1	0.7	1.9	14.6	4.8
18	0.8	1.1	0.6	0.2	0.7	0.2	2.0	1.0
19	1.3	1.1	0.8	0.2	0.8	0.4	2.8	1.6
20	1.6	1.5	0.9	0.2	0.9	0.2	2.0	1.6
21	1.2	1.3	0.8	0.2	0.8	0.4	3.0	1.5
22	1.7	1.4	1.0	0.2	1.0	0.5	2.4	2.0
23	1.1	1.3	0.9	0.2	0.9	0.3	2.8	1.8
24	2.0	1.4	1.0	0.2	0.9	0.3	2.0	1.6
25	1.4	1.2	0.8	0.2	0.8	0.3	2.4	1.2
26	1.9	1.5	0.9	0.2	0.9	0.4	2.0	2.0
27	1.1	1.2	0.8	0.1	0.7	0.2	2.2	1.0
28	1.7	1.5	1.0	0.2	1.0	0.2	2.0	1.2
29	1.9	1.4	0.9	0.2	0.6	1.0	7.6	2.4
30	1.5	1.4	0.9	0.1	0.8	0.4	2.2	1.8
31	0.9	1.1	0.8	0.2	0.7	0.3	2.2	1.5
32	2.0	1.8	1.0	0.2	0.9	1.0	6.2	2.8
33	1.4	1.3	0.8	0.2	0.8	0.6	4.0	2.4
34	1.4	1.4	0.9	0.2	1.0	0.3	2.0	1.5
35	2.0	1.5	1.0	0.2	0.9	0.3	2.0	1.5
36	1.4	1.7	1.0	0.2	0.9	1.2	7.8	3.2
37	1.8	1.5	0.9	0.2	0.9	0.2	2.0	1.5
38	2.1	1.2	0.9	0.3	0.9	0.2	2.0	1.6
39	1.5	1.4	1.0	0.2	0.9	1.2	10.8	3.2
40	1.1	1.2	0.8	0.2	0.7	0.4	3.6	1.3

Comprimento de Pétalas (CP); Comprimento de Sépalas (CS) ; Comprimento de Antera (CA) ; Comprimento de Filete (CF); Comprimento de Estilete (CE); Diâmetro de Estigma (DE); Número de Lóculos (NL) e Diâmetro de Ovário (DO)