

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SELEÇÕES IRRADIADAS
DE FIGUEIRA POR MARCADORES MOLECULARES (RAPD e
AFLP)**

Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2010

**D
I
S
S.
/
R
O
D
R
I
G
U
E
S**

**M.
G.
F.**

**2
0
1
0**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SELEÇÕES IRRADIADAS
DE FIGUEIRA POR MARCADORES MOLECULARES (RAPD e
AFLP)**

Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Baldo Geraldo Martins
Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2010

R696c Rodrigues, Maria Gabriela Fontanetti
Caracterização Genética de Seleções Irradiadas de Figueira por
Marcadores Moleculares (RAPD e AFLP) / Maria Gabriela Fontanetti
Rodrigues. -- Jaboticabal, 2001
viii, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001
Orientador: Antonio Baldo Geraldo Martins
Co-Orientador: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Luiz de Souza Corrêa e Bianca Waléria
Bertoni
Bibliografia

1. *Ficus carica*. 2. Variabilidade Genética. 3. Mutação. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:634.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SELEÇÕES IRRADIADAS DE FIGUEIRA POR MARCADORES MOLECULARES (RAPD E AFLP)

AUTORA: MARIA GABRIELA FONTANETTI RODRIGUES

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO BALDO GERALDO MARTINS

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANTONIO BALDO GERALDO MARTINS

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. BIANCA WALERIA BERTONI

Universidade de Ribeirão Preto



Prof. Dr. LUIZ DE SOUZA CORREA

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Data da realização: 08 de setembro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA GABRIELA FONTANETTI RODRIGUES - Cajuru, 11 de julho de 1985, filha de Rogério de Oliveira Rodrigues e Luzia Marta Fontanetti Rodrigues. Engenheira Agrônoma formada em agosto de 2008 pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Ilha Solteira - SP, onde foi Bolsista FAPSEP de iniciação científica por dois anos. Durante o mestrado, que teve início em março de 2009, foi Bolsista FAPESP e coordenadora do V e VI Curso de Inverno de Genética. Experiência em Melhoramento de Frutíferas, com ênfase em mutação, radiação com raios gamma e marcadores moleculares RAPD e AFLP.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

DEDICO

Aos meus pais Rogério de
Oliveira Rodrigues e Luzia
Marta Fontanetti Rodrigues

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar ao meu lado, me iluminando, me ajudando em todas as minhas conquistas e me dando forças para sempre seguir em frente.

Agradeço aos meus pais, Rogério e Luzia, pois com eles eu aprendi o verdadeiro valor das coisas, das pessoas, da vida. Com eles eu entendi o que é ser amada, amiga, filha. Com eles sinto-me muito mais madura e confiante para enfrentar meus dias. Com eles percebi que posso também sonhar acordada. Hoje sei que vivo o sentimento mais lindo de todos e tenho muito orgulho em dividi-lo com eles.

Agradeço ao meu professor e orientador Antonio Baldo Geraldo Martins por ter acreditado em mim e me apoiado em todas as decisões, não só profissionais, mas também de vida. Também a minha co-orientadora, Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pois sem ela não teria sido possível a realização deste trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo pela bolsa de Mestrado, a qual foi fundamental para meu crescimento profissional.

À professora Bianca Waleria Bertoni pelo auxílio na realização das análises moleculares através da técnica AFLP e pela permissão para que as mesmas fossem efetuadas na Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Agradeço também a ajuda e apoio dos amigos e colegas, que tornaram esses anos de estudo muito mais agradáveis e divertidos, dando sentido as palavras companheirismo e amizade. Muito obrigada a todos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Origem e Descrição da Planta.....	3
2.2. Indução de Mutação no melhoramento da figueira.....	5
2.3. Marcadores Moleculares.....	6
2.3.1. RAPD.....	8
2.3.2. AFLP.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Local.....	13
3.2. Material Vegetal.....	14
3.3. Análise Molecular.....	17
3.3.1. Extração de DNA.....	17
3.3.2. Análise RAPD.....	19
3.3.3. Análise AFLP.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. RAPD.....	27
4.2. AFLP.....	31
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	37

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SELEÇÕES IRRADIADAS DE FIGUEIRA POR MARCADORES MOLECULARES (RAPD e AFLP)

RESUMO - A figueira (*Ficus carica* L.) é uma frutífera de grande importância mundial e, neste sentido, o melhoramento genético se torna uma linha de pesquisa importante para a melhoria da cultura, sendo necessário reunir informações sobre esta espécie, principalmente em relação à sua variabilidade genética, para que projetos de propagação e manejo adequados sejam realizados. O presente trabalho teve como objetivo verificar a existência de variabilidade genética, por marcadores moleculares RAPD e AFLP, de seleções originadas de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama. O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus de Jaboticabal - SP, utilizando-se estacas de cinco seleções de figueira obtidas em trabalho anterior realizado na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, comparando-as entre si e utilizando a cultivar Roxo-de-Valinhos como parâmetro de comparação. Não há polimorfismo entre os tratamentos, indicando uma possível variação epigenética, devendo ser testada com outras técnicas sensíveis à uma possível metilação do DNA.

PALAVRAS-CHAVE: *Ficus carica*, variabilidade genética, mutação.

GENETIC CHARACTERIZATION OF IRRADIATED FIG SELECTIONS BY MOLECULAR MARKERS (RAPD AND AFLP)

SUMMARY - The fig (*Ficus carica* L.) is a fruit of great importance worldwide and in this sense, the genetic improvement becomes an important line of research to improve the culture, it is necessary to gather information about this species, especially in relation to their variability gene for propagation projects and handling are carried out. This study aims to determine the existence of genetic variability of selections originated from cuttings from buds irradiated with gamma rays, using the RAPD and AFLP molecular markers. The experiment was conducted at the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal - SP, using cuttings from five fig selections obtained in a previous study conducted at the Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, comparing them with each other and using the Roxo-de-Valinhos cultivar for comparison. There was no polymorphism between treatments, indicating a possible epigenetic variation and should be tested with other techniques sensitive to a DNA methylation.

KEYWORDS: *Ficus carica*, genetic variability, mutation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de figos da América do Sul e destacam-se três estados produtores: Rio Grande do Sul com sua produção destinada à indústria, São Paulo com a produção de frutos para mesa e Minas Gerais com frutos tanto para mesa como para indústria. O cultivo da figueira baseia-se exclusivamente na plantação de uma única cultivar, a “Roxo de Valinhos”, que é caracterizada pelo elevado vigor e produtividade.

A cultura apresenta alguns problemas relativos a pragas e doenças, que dificultam o cultivo, reduzindo os lucros, dos quais podem-se destacar: nematóides, ferrugem, seca da figueira, broca da figueira e mosca do figo. Pesquisas que possam encontrar soluções para alguns desses problemas trariam enorme contribuição para o desenvolvimento da cultura. Nesse sentido o melhoramento genético passa a ser uma linha de pesquisa altamente importante.

Os programas de melhoramento de figueira por métodos convencionais para a obtenção de novas cultivares são raros em muitos países, como o Brasil, principalmente pela pequena variabilidade genética encontrada, pois a ficicultura está toda implantada com uma única cultivar, a Roxo de Valinhos, que produz frutos sem sementes; e pela dificuldade de obtenção de plantas originadas pela fusão de gametas, uma vez que a vespa *Blastophaga psenes*, responsável pela polinização natural, não existe no país (FERREIRA et al., 2009). Com isso o uso de mutagênicos poderá trazer bons resultados.

Outro possível benefício com o uso de mutagênicos na cultura da figueira é a resistência à mosca do figo (*Zaprionus indianus* Gupta.), que causam grandes danos à cultura e provocam o aumento nos gastos com tratamentos culturais.

Como relatado por LAPINS (1983) e DONINI (1984), o uso de mutagênicos em frutíferas pode ter vários objetivos, tais como: aumento da variabilidade genética em cultivares já adaptadas, de forma que se permita a alteração de uma ou poucas características (porte compacto, resistência a doenças, coloração, precocidade, etc.) sem outras alterações no genótipo; quebrar ligações gênicas de características

indesejáveis; revelar e tornar homogêneas, quimeras existentes e tornar mutantes estáveis; supressão de incompatibilidade em cruzamento entre parentais distantes e produção de sexualidade transitória em apomíticas (TULMANN NETO et al., 1999).

Tradicionalmente, os métodos utilizados para identificação de genótipos, bem como para estimar as relações filogenéticas existentes entre eles, são baseados em estudos morfológicos (GALET, 1979). Porém essas características podem ser modificadas pela ocorrência de pragas, doenças e condições ambientais.

A detecção dos efeitos desses agentes mutagênicos pode ser obtida com mais precisão com emprego de marcadores moleculares, apresentando-se como uma ferramenta fundamental para um melhor e mais preciso entendimento sobre a variabilidade dos materiais em estudo e um grande avanço para o desenvolvimento de novas cultivares, uma vez que, com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (OLIVEIRA et al., 1996).

1.1. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi verificar a existência de variabilidade genética entre seleções de figueira originadas de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama em trabalho anterior, entre si e quando comparados à testemunha, “Roxo-de-Valinhos”, utilizando-se as técnicas RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem e Descrição da Planta

A figueira comum, *Ficus carica* L., é uma frutífera pertencente à família Moraceae e apresenta um número diplóide ($2n$) de cromossomos igual a 26. A família Moraceae inclui 60 gêneros e mais de 2.000 espécies de árvores, arbustos, trepadeiras e pequenas ervas. O gênero *Ficus* compreende cerca de 1.000 espécies, algumas das quais produtoras de frutos comestíveis, e é dividido em 48 subgêneros com base em características que diferenciam os grupamentos de espécies (PEREIRA & NACHTIGAL, 1999). Adapta-se a uma ampla diversidade climática, sendo cultivada tanto em regiões sub-tropicais quentes, como em clima temperado (PEREIRA, 1981).

É originária do Sul da Arábia, de onde foi difundida para a Europa e, posteriormente, para a América. Outras fontes indicam ser a figueira oriunda da Ásia Menor, mais especialmente da Cária. Sabe-se que a figueira foi inicialmente cultivada pelos árabes e judeus em regiões semi-áridas no sudeste da Ásia. Os próprios árabes levaram a figueira para a Península Ibérica, onde foi difundida para a África, América e Europa, junto com seus primeiros colonizadores (SOUZA et al., 2007).

O figo está entre as vinte principais frutas exportadas pelo Brasil e vem mantendo a terceira posição no ranking de volume comercializado, entre as frutas de clima temperado, com 900 toneladas (IEA, 2008). Neste sentido, o Brasil ocupa a 10ª colocação em termos de produção mundial, sendo responsável por 2% da mesma (FAO, 2004).

Além de sua expressão econômica e participação na complementação da dieta alimentar, a ficicultura é caracterizada como atividade de pequenas áreas, contribuindo para a sobrevivência da propriedade agrícola familiar, de grande importância para o equilíbrio social da população rural.

Na década de 1980, houve uma queda da área plantada com esta cultura, reduzindo para cerca de 300 mil plantas, 110 produtores e 230 hectares. Este declínio

foi devido à grande ocorrência de doenças e a concorrência com outras espécies frutíferas, que está sendo revertido pela ampliação da região produtora de figos, tanto em São Paulo quanto em Minas Gerais, especialmente na região Sul de Minas. (SOUZA et al., 2007).

Os principais estados produtores de figo no Brasil são: Rio Grande do Sul com sua produção destinada à indústria, São Paulo com a produção de frutos para mesa e Minas Gerais com frutos tanto para mesa como para indústria. No Estado de São Paulo existem cerca de 25 cultivares de figueira das quais a única cultivada comercialmente é a “Roxo de Valinhos” (PEREIRA & NACHTIGAL, 1999).

A “Roxo de Valinhos” é do tipo comum, de grande valor econômico, caracterizando-se pela sua rusticidade, vigor e produtividade. É a cultivar que melhor tem se adaptado ao sistema de poda drástica usada nas principais regiões produtoras, mantendo, por isso, um porte arbustivo e a frutificação somente em ramos do ano (PEREIRA & NACHTIGAL, 1999; CORREA & BOLIANI, 1999). A árvore possui crescimento amplo que pode atingir até 4 m de altura.

Os frutos desta variedade apresentam casca com coloração roxo-violácea escura, alcançando até 7,5 cm de comprimento e 60 a 90 g de peso. São de formato oblongo-piriformes, de pescoço curto e grosso, praticamente sem limite de separação com o corpo do receptáculo. A polpa mostra coloração róseo-avermelhada característica, com cavidade central, sucosa, macia e de sabor agridoce agradável (CORREA & BOLIANI, 1999).

Os frutos da cultivar Roxo -de -Valinhos podem ser utilizados para o consumo “in natura” quando maduros ou industrializados verdes, inchados e maduros ou rami. O grande defeito desta cultivar é apresentar frutos com o ostíolo muito aberto e com facilidade para ocorrer rachaduras quando maduros, o que favorece o ataque de pragas e, principalmente, de doenças.

2.2. Indução de mutação no melhoramento da figueira

Sabe-se que as plantas de propagação vegetativa, como ocorrem com o *Ficus carica*, cuja propagação no Brasil se dá por estaquia, apresentam algumas dificuldades para a aplicação dos métodos clássicos de melhoramento (DONINI, 1976). No caso da figueira tem-se apenas o caprifigo como planta que apresenta flores masculinas, aliado a isso, pouco se conhece da figueira sobre sua base genética relativa às características a serem melhoradas. Assim, pode-se dificultar a realização de cruzamentos e posteriores seleções e recuperação de um genótipo que associe as características básicas da cultivar original e as que se pretendiam introduzir.

Possivelmente por estas razões é que mutações somáticas espontâneas em muitas frutíferas têm contribuído para a obtenção de cultivares de grande importância econômica, como, por exemplo, no caso de citros no Brasil (DOMINGUES et al., 1995). O melhoramento da figueira apresenta algumas destas dificuldades citadas e por isto outras técnicas, tais como indução de mutação, podem ser sugeridas, já que os mutagênicos podem aumentar em milhares de vezes a frequência de mutações espontâneas.

Como citado por TULMANN NETO et al. (1999), mutagênicos físicos (diferentes tipos de radiações) e químicos podem ser utilizados “in vivo” ou “in vitro” no melhoramento de plantas, aumentando a variabilidade genética e permitindo a obtenção de genótipos de interesse.

Como relatado por LAPINS (1983) e DONINI (1984) o uso de mutagênicos em frutíferas pode ter vários objetivos, tais como: aumento da variabilidade genética em cultivares já adaptadas, de forma que se permita a alteração de uma ou poucas características (porte compacto, resistência a doenças, coloração, precocidade, etc.) sem outras alterações no genótipo; quebrar ligações gênicas de características indesejáveis; revelar e tornar homogêneas quimeras existentes e tornar mutantes estáveis; supressão de incompatibilidade em cruzamento entre parentais distantes e produção de sexualidade transitória em apomíticas (TULMANN NETO et al., 1999).

A técnica de indução de mutação por irradiação tem sido muito empregada em programas de melhoramento de plantas. A mutação por irradiação pode ser utilizada com o objetivo de modificar algumas características para que se tornem úteis ao homem (COIMBRA et al., 2004).

Como se discutiu anteriormente, existem varias razões que tornam a figueira uma cultura atrativa para o uso de indução de mutação. Apesar disto, existem poucos trabalhos em que essa alternativa tem sido utilizada. SPIEGEL-ROY (1990) cita que em figueira, gemas dormentes foram irradiadas com raios-gama e a LD₅₀ (dose que causa 50% de letalidade) foi determinada como 25 Gy. Mas para cada genótipo deve-se fazer um ensaio preliminar antes do início da pesquisa.

AKUHUND-ZADE (1981) tratou com raios-gama (doses de 50 a 100 Gy) estacas com gemas axilares, obtendo mutantes de porte compacto e mutantes precoces, os quais foram submetidos a ensaios de produção, sendo um deles (Bol) liberado para os produtores. Num outro trabalho russo, um mutante de figo (variedade Bolinzhir) foi obtido após a irradiação com as mesmas dosagens de raios-gama (50 a 100 Gy), conforme relata KERKADZE (1987).

No Brasil SANTOS et al. (1997), trabalhando com doses de raio-gama em estacas de figo “Roxo-de-Valinhos”, verificaram que 30 Gy nesse caso, seria mais interessante, para melhor aproveitamento de dosagens ideais.

2.3. Marcadores Moleculares

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofílica, cor de pétala ou morfologia foliar. Os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de

ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios de certas mutações limitaram sua utilização (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

A revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. Dez anos após os primeiros trabalhos com descritores de proteínas e enzimas, surgiram os baseados na análise do DNA, com capacidade de detectar variações genéticas adicionais. Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular e por meio de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético obtidos diretamente do DNA. O número de marcadores disponíveis passou a ser virtualmente ilimitado, podendo ser obtido em qualquer organismo vivo e a sua utilização ampliada para a grande maioria das espécies até então pouco estudadas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Por marcadores moleculares define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade existente ao longo da molécula de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, ao custo, à facilidade de uso, à consistência e repetibilidade dos resultados (MILACH, 1998a).

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de comprimento de fragmentos de restrição de DNA ("Restriction Fragment Length Polymorphism" – RFLP) (GRODZICKER et al. 1974). Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR) (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al. 1988) levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Aliadas às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA, estas metodologias têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas eucariotos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Enquanto os descritores de proteína mostram apenas o produto da expressão de genes ativos, os de DNA permitem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo. Mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes podem ser identificadas com análise de DNA, mas não com análise morfológica ou de proteínas (MILACH, 1998b).

Os marcadores moleculares são uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genômicos, uma vez que detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA e não sofrem qualquer tipo de influência ambiental, superando as dificuldades encontradas nas caracterizações morfológicas, fenológicas e organolépticas (SOUZA, 2001). Com base nesse polimorfismo, é possível fazer inferências sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos, o que em última análise permite aumentar a eficiência dos programas de melhoramento. E, segundo JOHNS et al. (1997), também permitem obter melhores estimativas da diversidade genética de uma determinada população.

Para KONSTANTINOV et al. (2005), aplicações possíveis de marcadores moleculares incluem: identificação e verificação de velhos e novos acessos coletados, detecção de duplicatas, análise de pureza genética, análise de diversidade genética, construção de coleções de base e seleção de genes de interesse agrônomico. Além disso, os marcadores moleculares podem ser usados para avaliação da estrutura e função do genoma em processos evolucionário nas plantas cultivadas.

Dentre os marcadores moleculares de DNA mais utilizados, pode-se destacar o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), e microssatélites (SSR) (KARP et al. 1996; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MELO et al. 2001).

2.3.1. Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso – RAPD

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de utilizar “primers” mais curtos e de sequência arbitrária para

dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência. Esta técnica foi desenvolvida por dois grupos nos Estados Unidos. WILLIAMS et al. (1990) patentearam a técnica com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), isto é, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Além de facilitar e acelerar os estudos que já ocorriam com as espécies tradicionais (ex: milho, tomate, arroz), a tecnologia RAPD permitiu a realização de estudos em espécies anteriormente não contempladas. As aplicações incluem: obtenção de “fingerprints” (impressões digitais) genômicos de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com algumas características distintas: utiliza como “primer” um único oligonucleotídeo, contendo, geralmente, 10 bases, ao invés de um par de “primers” (GUERRERO et al., 1997). Outra vantagem da técnica RAPD é que os primers utilizados podem encontrar, aleatoriamente, regiões de homologia no DNA e, portanto, não necessita do conhecimento prévio de seqüências do genoma a ser analisado (CAIXETA et al., 2003).

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma, duas seqüências de DNA complementares ao “primer” arbitrário devem estar suficientemente adjacentes e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado na forma de banda num gel de eletroforese. Cada “primer” arbitrário dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando em várias bandas no gel (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores dominantes. Dominância neste caso não se refere ao

conceito clássico de interação gênica entre alelos, e sim do ponto de vista da interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo. Ao se observar uma banda RAPD no gel, não é possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou duas cópias da sequência amplificada. A técnica RAPD detecta apenas um alelo em cada loco. A ausência de banda representa o conjunto de todos os outros alelos daquele loco que não podem ser amplificados. Embora a grande maioria dos marcadores RAPD possua um comportamento “dominante”, existe a possibilidade de se amplificar marcadores co-dominantes, ou seja, amplificar ambos os alelos de um loco (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dados experimentais de mapeamento genético em diversas espécies indicam que os locos de marcadores RAPD estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sem evidências de agrupamento de marcadores em regiões específicas (WILLIAMS et al., 1993; GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994; PLOMION et al., 1995). As sequências internas dos segmentos amplificados pertencem a todas as classes de abundância de DNA no genoma, desde sequências de cópia única até altamente repetitivas.

Além das vantagens já mencionadas, a técnica de RAPD se baseia na amplificação do DNA, o que resulta em várias vantagens práticas, que podem ser resumidas em simplicidade e rapidez. A obtenção de dados é pelo menos duas ordens de magnitude mais rápida que a técnica de RFLP, que é baseada na hibridização do DNA (PARAN et al., 1991). Por não utilizar sondas, é eliminada a necessidade de isótopos radioativos ou marcação não radioativa. Outra grande vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo (da ordem de dezenas de nanogramas). Permite ainda, gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo, oferecendo a possibilidade de amostrar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os “primers” utilizados para a detecção de variação ao nível de DNA são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP que são pré-selecionadas para regiões de cópia única (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

No entanto, a principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é

amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos por RAPD, esta limitação é comumente descrita como “dominância” dos marcadores. Outra limitação é o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD. Uma banda RAPD observada no gel só pode ser considerada um marcador de comportamento Mendeliano depois de verificada sua segregação de parentais para descendentes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2.3.2. Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados – AFLP

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*) se baseiam na amplificação seletiva, via PCR, de fragmentos de DNA genômico total gerados pela clivagem com enzimas de restrição (VOS et al. 1995; LIU, 1998).

É um marcador que combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR. De acordo com os mesmos autores, desde seu desenvolvimento (ZABEAU, 1993), esta técnica tem sido utilizada de forma crescente para finalidades de “fingerprinting”, mapeamento genético localizado e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas que apresentam uma baixa taxa de polimorfismo de DNA.

A análise de AFLP, de acordo com FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), LIU (1998) e RAMALHO et al. (2000), consiste em quatro etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando “primers” especificamente desenhados para reconhecer sequências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução.

A vantagem que mais destaca esta tecnologia das demais é o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos num único gel. O índice de “multiplex” do ensaio AFLP, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel é o mais alto entre as tecnologias disponíveis. A técnica de AFLP é, portanto, muito eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma. A segunda vantagem é o grande poder de detecção de variabilidade genética, que explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como no ensaio de RAPD. Consegue-se com isso uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos.

Outra vantagem é a maior robustez do ensaio AFLP quando comparado com o ensaio RAPD. Isto se deve basicamente ao fato de que “primers” bem mais longos são utilizados na etapa de PCR, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação, evitando com isso a competição que ocorre durante a PCR no ensaio RAPD. O AFLP reúne, portanto, a vantagem da PCR específica com a vantagem de RAPD em se explorar sequências arbitrárias (VOS et al., 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2000).

De forma análoga aos marcadores RAPD, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, ou seja, o fragmento que é amplificado. As demais variações alélicas são classificadas como um alelo nulo. Marcadores AFLP são, portanto, marcadores “dominantes” e os dados têm natureza binária (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; LIU, 1998 e RAMALHO et al., 2000). Eventualmente, de acordo com LIU (1998), as marcas podem ser identificadas como co-dominantes.

Outros aspectos que podem limitar as análises de AFLP, segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), são: o maior número de etapas que envolvem as análises, o maior número de reagentes e equipamentos de biologia molecular necessários, além de requerer DNA de qualidade e com alto nível de pureza. A digestão parcial ou a má qualidade do DNA poderá levar a interpretações equivocadas do polimorfismo.

O marcador AFLP analisa a presença ou ausência de sítios de enzimas de restrição e as sequências polimórficas adjacentes a esses sítios. Embora seja uma técnica mais sofisticada e recente, têm sido desenvolvidos alguns trabalhos com AFLP (técnica AFLP, com marcação por fluorescência) em frutíferas, principalmente para caracterização de variedades, como em pessegueiro e nectarina (MANUBENS et al., 1999); videira (SCOTT et al., 2000); macieira (TIGNON et al., 2001); bananeira (BENATTI et al., 2001) e maracujazeiro (AUKAR et al., 2001).

De acordo com CERVERA et al. (1996), as técnicas de marcadores moleculares têm facilitado e potencializado a análise genética de plantas e vêm se tornando uma ferramenta extremamente útil no melhoramento genético de várias espécies. Técnicas baseadas em AFLP têm sido aplicadas no mapeamento genético (ZIMNOCH-GUZOWSKA et al., 2000; KATENGAM et al., 2002; STROMMER et al., 2002), DNA “fingerprinting” (POWELL et al., 1996), estudos de diversidade genética (RUSSELL et al., 1997), análise parental (GERBER et al., 2000) e análise de características quantitativas (HOFFMAN & DAHLEEN 2002; SALLAND et al., 2003 e AITKEN et al., 2006). Os marcadores AFLP também têm apresentado bons resultados para outras aplicações, como caracterização da variação somaclonal decorrentes da cultura de tecidos e órgãos vegetais (POPESCU et al., 2002), identificação de mutantes (SCOTT, et al., 2000) e análise de quimeras (FRANKS et al., 2002) ratificando a utilidade dessa ferramenta na análise genética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

As estacas das quais retirou-se os materiais para análise foram instaladas e conduzidas na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal - SP, no encontro aproximado das coordenadas geográficas 21^º14' de Latitude Sul e 48^º16' de Longitude Oeste, com altitude ao redor de 559 m.

O clima da região é Cwa (subtropical), segundo a classificação de KOEPPEN (1948); apresentando uma temperatura média anual de 22 °C.

O solo, reclassificado segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 1999), é um Latossolo Vermelho eutrófico, A moderado, de textura argilosa.

A análise molecular dos materiais utilizando marcadores RAPD foi realizada no Laboratório de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal – SP. Já a análise molecular dos materiais utilizando marcadores AFLP foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

3.2. Material Vegetal

Em trabalho desenvolvido anteriormente na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira FEIS/UNESP – Campus de Ilha Solteira - SP, foram levadas para Piracicaba - no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), 450 estacas de figueira “Roxo-de-Valinhos” com 40 cm de comprimento.

Estas foram irradiadas com raios gama, na dose de 30 Gy, a 10 cm do ápice de cada estaca. As estacas foram enraizadas (formaram uma nova planta) e as gemas irradiadas deram origem a ramos que foram podados por 6 vezes consecutivas, e somente nesse momento é que foram retiradas estacas desses ramos para a instalação da etapa de seleção e caracterização morfológica do referido trabalho.

Das 450 plantas iniciais, selecionou-se 5 plantas devido suas características morfológicas únicas e divergentes da padrão “Roxo-de-Valinhos”, descritas a seguir:

Tratamento 01- Cultivar Roxo de Valinhos - testemunha:



Fonte: arquivo pessoal

Tratamento 02- Seleção Planta Irradiada - 440 (PI - 440): fruto alongado



Fonte: arquivo pessoal

Tratamento 03- Seleção Planta Irradiada - 433 (PI - 433): pedúnculo longo



Fonte: arquivo pessoal

Tratamento 04- Seleção Planta Irradiada - 189 (PI - 189): fruto grande com ostíolo fechado.



Fonte: arquivo pessoal

Tratamento 05- Seleção Planta Irradiada - 214 (PI - 214): fruto grande



Fonte: arquivo pessoal

Tratamento 06- Seleção Planta Irradiada - 301 (PI - 301): fruto alongado e grande



Fonte: arquivo pessoal

Estas 5 plantas foram multiplicadas vegetativamente em local protegido do tipo telado, com irrigação do tipo nebulização intermitente, e foram levadas a campo para serem comparadas com a cultivar Roxo-de-Valinhos em plantio comercial.

Todas as características observadas inicialmente se mantiveram constantes e as seleções PI 189 e PI 301 foram superiores à “Roxo-de-Valinhos” quanto a maioria das características avaliadas (RODRIGUES et al. 2009), como pode ser observado na tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Médias das características de produção e qualidade dos frutos de figueiras. Ilha Solteira - SP, 2008.

Tratamentos	Nº Frutos/ planta	Massa/ fruto	Produtividade	Comprimento dos frutos	Diâmetro dos frutos	Sólidos Solúveis	Acidez Titulável
		g	t/ha	cm	cm	°Brix	%
Testemunha	22,00 bcd*	38,56 b	2,27 bcd	5,30 a	4,17 b	12,74 a	0,15 b
PI - 440	17,00 d	21,75 cd	0,99 e	4,43 a	3,33 de	9,50 b	0,13 b
PI - 433	18,67 cd	35,67 b	1,79 cde	5,06 a	4,03 bc	10,84 ab	0,13 b
PI - 189	30,00 ab	44,24 ab	3,76 a	4,77 a	4,47 ab	12,48 ab	0,14 b
PI - 214	20,33 bcd	43,40 ab	2,36 bcd	4,63 a	4,53 ab	11,94 ab	0,13 b
PI - 301	23,33 bcd	43,83 ab	2,72 abc	4,70 a	4,37 ab	12,41 ab	0,14 b
CV (%)	16,43	10,97	16,86	15,91	4,09	9,27	7,31

*Médias nas colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para o presente estudo foram utilizadas estas cinco seleções de plantas irradiadas tidas como mutantes, comparando-se os resultados entre si e com a cultivar Roxo-de-Valinhos, utilizada como parâmetro para efeito de comparação com os materiais.

3.3. Análise Molecular

3.3.1. Extração do DNA

A etapa de preparação do material vegetal para a extração do DNA constituiu-se em coleta de folhas jovens, sem manchas ou perfurações, as quais foram lavadas em água corrente e retiradas as nervuras.

A extração de DNA total genômico dos tecidos vegetais foi realizada segundo técnica descrita por LODHI et al. (1994), com modificações, descrita a seguir: 0,1 g de folhas frescas de cada amostra foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizada em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL, contendo 1,0 mL de Tampão de Extração (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2% 2-βmercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl-pH 8,0.). Após 25 minutos de incubação a 60°C, foram adicionados 1,0 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugando por 15 minutos a 10000 rpm a 23°C. Em um novo tubo, o sobrenadante foi transferido, ao qual adicionou-se 500 µL de NaCl 5 M e 2 volumes

de etanol (100%). Após incubação à -80°C por 5 minutos, centrifugou-se à 6000 rpm por 5 minutos à 4°C e depois à 10000 rpm por 5 minutos à 4°C . Em seguida, o pellet formado foi lavado em 1,0 mL de etanol (70%), posto para secar, e ressuspendido em 100 μL de TE. Após o pellet ter dissolvido totalmente, tratou-se com 20 μL de RNase, incubando à 37°C por 20 minutos como ilustrado na figura 1.

A quantificação do DNA e sua qualidade foram realizadas com auxílio de espectrofotômetro, tendo-se medido a absorbância de cada amostra em contraste com uma amostra de H_2O destilada livre de DNA nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK et al., 1989). A qualidade do DNA foi verificada durante sua quantificação, observando-se a relação encontrada entre as leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, que deve ser entre 1,8 e 2,0, o que caracteriza um DNA de bom peso molecular, como mostra a tabela 1.

Tabela 2: Quantificação dos DNAs das amostras de figueira, em espectrofotômetro. Jaboticabal - SP, 2009.

<i>Tratamentos</i>	<i>260nm</i>	<i>280nm</i>	<i>260nm/280nm</i>	<i>280nm/260nm</i>	<i>Proteína $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>Ac. Nucléicos $\mu\text{g/mL}$</i>
Testemunha	0,8229	0,4354	1,8899	0,5291	1.2583	2057.6257
Seleção 440	1,5232	0,7884	1,9321	0,5176	2.3116	3808.8093
Seleção 433	0,8728	0,4650	1,8768	0,5328	1.3378	2182.4248
Seleção 189	0,8936	0,4607	1,9399	0,5155	1.3543	2234.5039
Seleção 214	0,9984	0,5166	1,9327	0,5174	1.5150	2496.5195
Seleção 301	0,5539	0,2944	1,8816	0,5315	0.8483	1385.1537

Para certificação da qualidade, amostras do DNA extraído foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas à eletroforese para observação da formação de banda sem arraste.

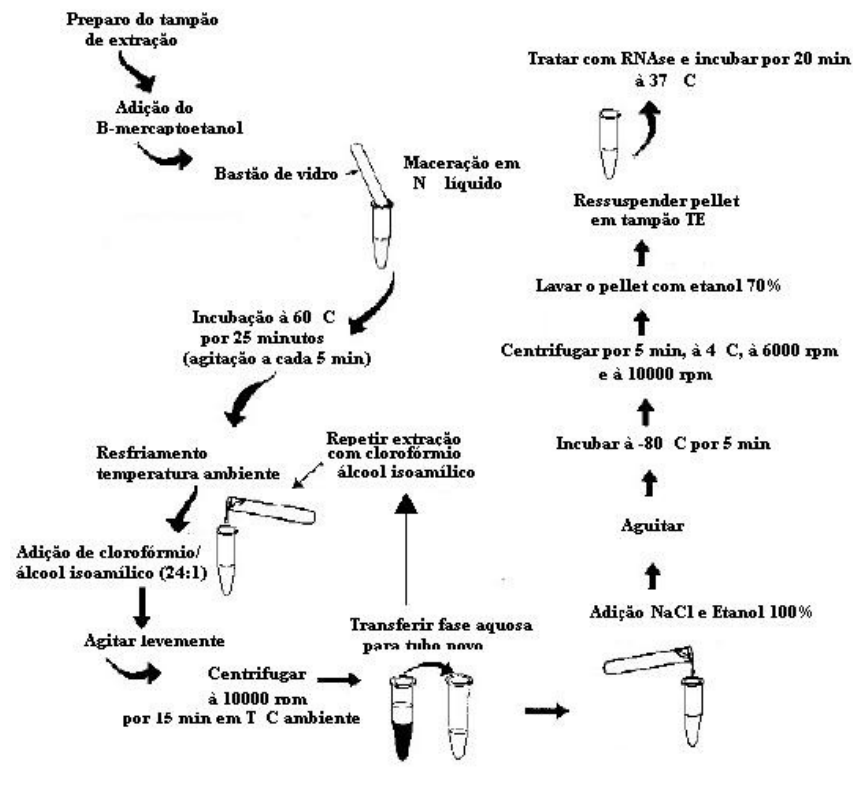


Figura 1. Diagrama esquemático do protocolo de extração de DNA.

3.3.2. Análise por RAPD

Para a reação de amplificação do DNA, foram realizados ensaios de adequação das concentrações de DNA e de “primers”, além de diferentes programas a serem executados no termociclador.

Primeiramente foram avaliados 40 “primers” de RAPD sendo estes respectivos aos kits C e F da marca *Operon Technologies*.

Os kits *Operon RAPD® 10mer* contêm “primers” de 10 bases para uso em mapeamento genético e DNA “fingerprinting”. A *Operon* possui atualmente 1.200 “primers” de 10 bases diferentes. Estes “primers” são vendidos em kits com 20 “primers” cada que são chamados de “Kit A” a “Kit Z”. Os oligos são selecionados aleatoriamente de um grupo de seqüências com um conteúdo de (G+C) de 60% a 70% e sem extremidades auto-complementares.

Cada tubo contendo um “primer” 10mer contém “primer” suficiente para aproximadamente 1000 reações de amplificação. Para evitar confusão no nome dos “primers”, a Operon coloca o prefixo “OP” antes dos nomes dos “primers”. Por exemplo, a quarta sequência do kit H é chamada “OPH-04”.

Posteriormente outro conjunto de “primers”, denominado UBC RAPD Primer Synthesis Project Oligonucleotide Set 100/3, adquirido da Unidade de Serviço de Ácidos Nucléicos - Proteínas da University of British Columbia - UBC (Vancouver, Canada), foi utilizado neste estudo. Os kits UBC RAPD 10mer contêm 100 “primers” de 10 bases para uso em mapeamento genético e DNA “fingerprinting”. Para síntese dos “primers”, os oligos foram purificados por eluição com Tris/EDTA. Alíquotas de 10 µL cada foram liofilizadas com ar seco e ressuspendidas em 200 µL de TE para fins de uso, de acordo com o fabricante.

As sequências dos “primers” Operon RAPD e UBC RAPD avaliados encontram-se a seguir, respectivamente, nas tabelas 2 e 3.

Tabela 3: Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de RAPD, com suas respectivas sequências.

Nome do Primer Kit C	Sequência	Nome do Primer Kit F	Sequência
OPC-01	5´ -TTCGAGCCAG-3´	OPF-01	5´ -ACGGATCCTG-3´
OPC-02	5´ -GTGAGGCGTC-3´	OPF-02	5´ -GAGGATCCCT-3´
OPC-03	5´ -GGGGGTCTTT-3´	OPF-03	5´ -CCTGATCACC-3´
OPC-04	5´ -CCGCATCTAC-3´	OPF-04	5´ -GGTGATCAGG-3´
OPC-05	5´ -GATGACCGCC-3´	OPF-05	5´ -CCGAATTCCC-3´
OPC-06	5´ -GAACGGACTC-3´	OPF-06	5´ -GGGAATTCGG-3´
OPC-07	5´ -GTCCCACGA-3´	OPF-07	5´ -CCGATATCCC-3´
OPC-08	5´ -TGGACCGGTG-3´	OPF-08	5´ -GGGATATCGG-3´
OPC-09	5´ -CTCACCGTCC-3´	OPF-09	5´ -CCAAGCTTCC-3´
OPC-10	5´ -TGTCTGGGTG-3´	OPF-10	5´ -GGAAGCTTGG-3´
OPC-11	5´ -AAAGCTGCGG-3´	OPF-11	5´ -TTGGTACCCC-3´
OPC-12	5´ -TGTCATCCCC-3´	OPF-12	5´ -ACGGTACCAG-3´
OPC-13	5´ -AAGCCTCGTC-3´	OPF-13	5´ -GGCTGCAGAA-3´
OPC-14	5´ -TGCGTGCTTG-3´	OPF-14	5´ -TGCTGCAGGT-3´
OPC-15	5´ -GACGGATCAG-3´	OPF-15	5´ -CCAGTACTCC-3´
OPC-16	5´ -CACACTCCAG-3´	OPF-16	5´ -GGAGTACTGG-3´
OPC-17	5´ -TTCCCCCAG-3´	OPF-17	5´ -AACCCGGGAA-3´
OPC-18	5´ -TGAGTGGGTG-3´	OPF-18	5´ -TTCCCGGGTT-3´
OPC-19	5´ -GTTGCCAGCC-3´	OPF-19	5´ -CCTCTAGACC-3´
OPC-20	5´ -ACTTCGCCAC-3´	OPF-20	5´ -GGTCTAGAGG-3´

Tabela 4: Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de RAPD, com suas respectivas seqüências.

Nome do Primer	Seqüência	Nome do Primer	Seqüência
UBC-201	5`-CTGGGGATTT- 3`	UBC-251	5`-CTTGACGGGG- 3`
UBC-202	5`-GAGCACTTAC- 3`	UBC-252	5`-CTGGTGATGT- 3`
UBC-203	5`-CACGGCGAGT- 3`	UBC-253	5`-CCGTGCAGTA- 3`
UBC-204	5`-TTCGGGCCGT- 3`	UBC-254	5`-CGCCCCATT- 3`
UBC-205	5`-CGGTTTGGAA- 3`	UBC-255	5`-TTCCTCCGGA- 3`
UBC-206	5`-GAGGACGTCC- 3`	UBC-256	5`-TGCAGTCGAA- 3`
UBC-207	5`-CATATCAGGG- 3`	UBC-257	5`-CGTCACCGTT- 3`
UBC-208	5`-ACGGCCGACC- 3`	UBC-258	5`-CAGGATACCA- 3`
UBC-209	5`-TGCACTGGAG- 3`	UBC-259	5`-GGTACGTACT- 3`
UBC-210	5`-GCACCGAGAG- 3`	UBC-260	5`-TCTCAGCTAC- 3`
UBC-211	5`-GAAGCGCGAT- 3`	UBC-261	5`-CTGGCGTGAC- 3`
UBC-212	5`-GCTGCGTGAC- 3`	UBC-262	5`-CGCCCCAGT- 3`
UBC-213	5`-CAGCGAACTA- 3`	UBC-263	5`-TTAGAGACGG- 3`
UBC-214	5`-CATGTGCTTG- 3`	UBC-264	5`-TCCACCGAGC- 3`
UBC-215	5`-TCACACGTGC- 3`	UBC-265	5`-CAGCTGTTCA- 3`
UBC-216	5`-CATAGACTCC- 3`	UBC-266	5`-CCACTCACCG- 3`
UBC-217	5`-ACAGGTAGAC- 3`	UBC-267	5`-CCATCTTGTG- 3`
UBC-218	5`-CTCAGCCCAG- 3`	UBC-268	5`-AGGCCGCTTA- 3`
UBC-219	5`-GTGACCTCAG- 3`	UBC-269	5`-CCAGTTCGCC- 3`
UBC-220	5`-GTCGATGTGC- 3`	UBC-270	5`-TGCGCGCGGG- 3`
UBC-221	5`-CCCGTCAATA- 3`	UBC-271	5`-GCCATCAAGA- 3`
UBC-222	5`-AAGCCTCCCC- 3`	UBC-272	5`-AGCGGCCCAA- 3`
UBC-223	5`-GATCCATTGC- 3`	UBC-273	5`-AATGTCGCCA- 3`
UBC-224	5`-TCTCCGGTAT- 3`	UBC-274	5`-GTTCCCGAGT- 3`
UBC-225	5`-CGACTCACAG- 3`	UBC-275	5`-CCGGGCAAGC- 3`
UBC-226	5`-GGGCCTCTAT- 3`	UBC-276	5`-AGGATCAAGC- 3`
UBC-227	5`-CTAGAGGTCC- 3`	UBC-277	5`-AGGAAGGTGC- 3`
UBC-228	5`-GCTGGGCCGA- 3`	UBC-278	5`-GGTTCAGCT- 3`
UBC-229	5`-CCACCCAGAG- 3`	UBC-279	5`-AGACATTAGA- 3`
UBC-230	5`-CGTCGCCCAT- 3`	UBC-280	5`-CTGGGAGTGG- 3`
UBC-231	5`-AGGGAGTTCC- 3`	UBC-281	5`-GAGAGTGGAA- 3`
UBC-232	5`-CGGTGACATC- 3`	UBC-282	5`-GGGAAAGCAG- 3`
UBC-233	5`-CTATGCGCGC- 3`	UBC-283	5`-CGGCCACCGT- 3`
UBC-234	5`-TCCACGGACG- 3`	UBC-284	5`-CAGGCGCACA- 3`
UBC-235	5`-CTGAGGCAAA- 3`	UBC-285	5`-GGGCGCCTAG- 3`
UBC-236	5`-ATCGTACGTG- 3`	UBC-286	5`-CGGAGCCGGC- 3`
UBC-237	5`-CGACCAGAGC- 3`	UBC-287	5`-CGAACGGCCG- 3`
UBC-238	5`-CTGTCCAGCA- 3`	UBC-288	5`-CCTCCTTGAC- 3`
UBC-239	5`-CTGAAGCGGA- 3`	UBC-289	5`-ATCAAGCTGC- 3`
UBC-240	5`-ATGTTCCAGG- 3`	UBC-290	5`-CCGCGAGCAC- 3`
UBC-241	5`-GCCCGACGCG- 3`	UBC-291	5`-AGCTGAAGAG- 3`
UBC-242	5`-CACTCTTTGC- 3`	UBC-292	5`-AAACAGCCCG- 3`
UBC-243	5`-GGGTGAACCG- 3`	UBC-293	5`-TCGTGTTGCT- 3`
UBC-244	5`-CAGCCAACCG- 3`	UBC-294	5`-TGATTGGCCA- 3`
UBC-245	5`-CGCGTGCCAG- 3`	UBC-295	5`-CGCGTTCCTG- 3`
UBC-246	5`-TATGGTCCGG- 3`	UBC-296	5`-CCGCTGGGAG- 3`
UBC-247	5`-TACCGACGGA- 3`	UBC-297	5`-GCGCATTAGA- 3`
UBC-248	5`-GAGTAAGCGG- 3`	UBC-298	5`-CCGTACGGAC- 3`
UBC-249	5`-GCATCTACCG- 3`	UBC-299	5`-TGTCAGCGGT- 3`
UBC-250	5`-CGACAGTCCC- 3`	UBC-300	5`-GGCTAGGGCG- 3`

Amplificação: Cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 20 μL , em tubo tipo “eppendorf” previamente estéril, contendo: 8,6 μL H_2O Milli-Q, 2,0 μL Tampão 1X, 0,5 μL de MgCl_2 , 0,4 μL de dNTPs, 3,0 μL de “primer” diluído de acordo com o fabricante, 0,5 μL de Taq DNA Polimerase e 5,0 μL de DNA genômico vegetal (20 ng/200 μL) diluídos de acordo com a quantificação feita anteriormente em espectrofotômetro.

Os DNAs foram amplificados utilizando-se termociclador (PTC-100 Programade Thermal Controller – MJ Research, Inc.) e submetidos a um ciclo de 94 °C por 2 minutos; 94 °C por 1 minuto; 36 °C por 1 minuto; 72 °C por 1 minuto; 38 vezes (94 °C por 1 minuto; 36 °C por 1 minuto; 72 °C por 1 minuto), 72 °C por 7 minutos; e, finalmente, um ciclo de 4 °C por 15 minutos para resfriar as amostras.

Eletroforese: Em cada tubo contendo 20 μL do DNA amplificado, foram adicionados 5,0 μL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,01%; glicerol 40%). Desta mistura, 20 μL foram aplicados nas canaletas de gel de agarose 1,5% (dissolvida em TEB 1X – TRIS 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) e submetidos à eletroforese horizontal no sistema Sunrise (Gibco BRL), em tensão de 80 V por 1 hora e 30 minutos. Para coloração do gel de agarose foram adicionados 50 μL de Brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no tampão de eletrodo (TEB 1X).

Como padrão de peso molecular, foi utilizado o “ladder” de 1 Kb (GIBCO), e o controle negativo foi realizado para cada reação de RAPD, verificando-se assim, se as soluções utilizadas não apresentavam contaminação. No controle negativo foram utilizadas todas as soluções anteriormente descritas, com exceção do DNA.

Visualização dos resultados: a visualização dos resultados das amostras, após a eletroforese foi realizada em equipamento de fotodocumentação (Gel Doc – 1000 – Bio Rad) e gravada para análises.

3.3.3. Análise por AFLP

Os marcadores moleculares AFLP foram utilizados para determinar a variabilidade genética seguindo o protocolo adaptado por VOS et al. (1995).

Digestão: O DNA genômico (200 ng) foi digerido conjuntamente com as enzimas de restrição EcoRI e MseI, em uma reação contendo 23,75 µL de H₂O Milli-Q, 0,5 µL de Tampão 100X BSA, 5,0 µL de Tampão 10X OPA, 0,5 µL da enzima MseI (5 unidades) e 0,25 µL da enzima EcoRI (5 unidades). A reação de digestão foi incubada em termociclador modelo PTC™-100 (MJ Research Inc) e submetida a um ciclo de 37 °C por 15 horas; 70 °C por 15 minutos e 4 °C overnight.

Posteriormente os fragmentos gerados foram ligados às seqüências adaptadoras específicas complementares às extremidades clivadas pelas duas enzimas.

Preparo dos Adaptadores: As seqüências de adaptadores utilizadas para a ligação das enzimas foram: Primer Adaptador EcoRI: CTCGTAGACTGCGTACC/AATTGGTACGCAGTCTAC e Primer Adaptador MseI: GACGATGAGTCCTGAG/TACTCAGGACTCAT, em reações descritas na tabela 4:

Tabela 5: Mix das reações para o preparo dos adaptadores para ligação das enzimas EcoRI e MseI.

<i>Reagente</i>	<i>MseI</i>	<i>ECORI</i>
Oligo 1 (Forward)	64,0 µl (500ng/µl)	5,6 µl (600ng/µl)
Oligo 2 (Reverse)	56,0 µl (500ng/µl)	4,8 µl (620ng/µl)
Tampão 10X OPA	7,0 µL	6,0 µL
H₂O Milli-Q	13,0 µL	103,6 µL

Ligação dos Adaptadores: em cada amostra após a digestão, foram acrescentados 6,7 µL de H₂O Milli-Q, 1,0 µL do adaptador para o corte da EcoRI, 1,0 µL do adaptador para o corte da MseI, 1,0 µL de tampão T4 DNA ligase e 0,3 µL da enzima T4 DNA ligase. As amostras foram incubadas em termociclador por 3 horas a 23 °C.

Após a incubação das amostras, estas foram visualizadas em gel de agarose (1,0%) para verificar a completa digestão e corte dos DNAs.

Amplificação Pré-Seletiva: O DNA clivado e ligado aos adaptadores (50 µl) foi pré-amplificado com iniciadores contendo uma base seletiva, Eco-A/Msel-T. Os produtos da PCR de pré-amplificação seletiva foram utilizados como molde na segunda reação, denominada amplificação seletiva, na qual foram utilizados iniciadores com 2 e 3 nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade 3' dos iniciadores.

Para a reação de pré-amplificação, foi adicionado 0,5 µl EcoRI + (1 oligo) (25 ng/µl), 0,5 µl Msel + (1 oligo) (25 ng/µl), 0,4 µl dNTPs 2,5 mM, 1 µl 10X Buffer Mg Free (Promega), 0,6 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) (Promega) e 2,5 µl do DNA ligado. A pré-amplificação foi realizada de acordo com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 25 vezes (94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), e 72°C por 5 minutos. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos 4 vezes e armazenados a -20°C.

Amplificação Seletiva: Na amplificação seletiva AFLP-PCR, foi adicionado 1,0 µl EcoRI + (X oligo) (25 ng/µl), 1,2 µl Msel + (X oligo) (25 ng/µl), 0,4 µl dNTPs 2,5 mM, 2,0 µl 10X Buffer Mg Free (Promega), 1,2 µl MgCl₂, (25 mM), 0,5µl Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) (Promega) e 1,5 µl DNA pré-amplificado.

As combinações de primers utilizadas estão descritas na tabela 5 a seguir, com um total de doze combinações:

Tabela 6: Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de AFLP, com suas respectivas combinações.

Combinação	Primer ECORI + A	Primer Msel + T
1	E+ AG	M+ TA
2	E+ ATT	M+ TA
3	E+ ATC	M+ TTC
4	E+ AG	M+ TAA
5	E+ AGT	M+ TA
6	E+ AGA	M+ TT
7	E+ AAT	M+ TTC
8	E+ A	M+ TAA
9	E+ AGT	M+ T
10	E+ ATC	M+ TA
11	E+ ATT	M+ TCG
12	E+ AAT	M+ TAA

A amplificação seletiva foi realizada de acordo com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 11 vezes (94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto), 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 22 vezes (94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) e 72°C por 2 minutos. Os produtos da amplificação foram armazenados a -20°C.

Preparo das placas com gel de poliacrilamida: na placa de base, após limpa 2 vezes com álcool 95%, foi espalhado 1,5 mL de Repel-silane para o gel não grudar. Na placa de coloração, na qual o gel deve ficar afixado, foi aplicado uma solução contendo 1,0 mL de álcool 95%, 5,0 µL de ácido acético glacial e 5,0 µL de Bind-silane. O gel foi preparado com 120 mL de matriz de poliacrilamida (252 g de uréia, 36 g de acrilamida e 1,8 g de bisacrilamida), 120 µL de TEMED e 800 µL de APS (95 mg/mL). Após a secagem do gel de poliacrilamida, foi realizada uma pré-corrida de 1 hora, à 50°C com uma corrente de 80 W.

Eletroforese: Após a amplificação seletiva, o resultante de cada reação foi misturado a 8 µL de "Loading buffer" (10 ml formamida deionizada, 200 µL de EDTA (0,5 M) pH 8,0, 10 mg de bromofenol blue e 10 mg de xylene cyanol). A seguir, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para gelo. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o "ladder" de 50 bp, desnaturado juntamente com as amostras.

Os produtos AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada em corrente constante de 80 W e temperatura máxima de 50°C por quatro horas.

Coloração: O gel foi corado com solução de nitrato de prata e revelado em carbonato de sódio seguindo protocolo descrito por CRESTE et al. (2001), descrito na tabela 6 a seguir:

Tabela 7: Procedimento de colorimetria por fotorevelação das placas de poliacrilamida. Ribeirão Preto, 2009.

<i>Etapa</i>	<i>Solução</i>	<i>Tempo</i>
Fixação	2670mL H ₂ O destilada 30 mL ácido acético glacial 300mL etanol absoluto	10 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto
Pré-tratamento	3000 mL H ₂ O destilada 45 mL ácido nítrico	2,40 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto
Impregnação	3000 mL H ₂ O destilada 6g nitrato de prata	25 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	30 segundos
Lavagem	H ₂ O destilada	30 segundos
Revelação	4000 mL H ₂ O destilada 120g sódio carbonato anidro 2160µL formaldeído	Até a visualização das bandas
Bloqueio	2850 mL H ₂ O destilada 150 mL ácido acético glacial	5 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto

Visualização dos resultados: a visualização dos resultados das amostras, após a eletroforese, foi realizada com leitura visual, seguida de contagem das bandas para análise, e fotografadas para documentação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RAPD

De um total de 140 “primers” utilizados na avaliação da caracterização genética dos mutantes de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama e da cultivar Roxo-de-Valinhos, 105 foram capazes de amplificar fragmentos bem definidos, entre 250 e 1500 pares de base. Os 105 primers selecionados geraram 439 fragmentos, com o número de bandas produzidas por “primer” variando de 1 (OPC – 06 e OPC – 10) até 11 (OPF – 10), com uma média de 4,2 fragmentos por “primer”.

SAWAZAKI et al. (2002), trabalhando com caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores RAPD, encontraram 353 fragmentos de DNA amplificados com a utilização de 26 “primers”, sendo, deste total de bandas, 250 polimórficas, obtendo uma média de 13,5 bandas totais por “primer”. PEREIRA et al. (2008) identificaram 88 bandas com a utilização de 20 “primers” de RAPD na análise da diversidade genética entre acessos de capim-elefante, com uma média de 4,4 bandas por “primer”. Já SILVA et al. (2008), com a técnica de RAPD para caracterização de genótipos de mirtilo, foram gerados 89 marcadores a partir de 9 “primers” utilizados. E SALLA et al. (2002) analisando a variabilidade genética em acerola, de 94 “primers” testados, 37 forneceram produtos nítidos de amplificação e boa repetibilidade, com um total de 164 marcadores amplificados, e uma média de 4,0 bandas por “primer”.

Como pode ser observado, a quantidade de fragmentos de DNA amplificados (bandas) é variável em relação ao material em estudo e dos “primers” utilizados, estando a média de bandas por “primer” encontrada neste trabalho de acordo com a literatura, podendo o número de bandas por “primer” testado ser visualizado nas tabelas 7 e 8 a seguir:

Tabela 8: Número de bandas por “primer” testado, discriminando o total de bandas monomórficas e polimórficas, obtidas com marcadores Operon RAPD. Jaboticabal - SP, 2010.

<i>Primer</i>	<i>Bandas Monomórficas</i>	<i>Bandas Polimórficas</i>	<i>Total de Bandas</i>	<i>Primer</i>	<i>Bandas Monomórficas</i>	<i>Bandas Polimórficas</i>	<i>Total de Bandas</i>
OPC – 01	5	0	5	OPF – 01	8	0	8
OPC – 02	8	0	8	OPF – 02	6	0	6
OPC – 03	0	0	0	OPF – 03	5	0	5
OPC – 04	7	0	7	OPF – 04	7	0	7
OPC – 05	9	0	9	OPF – 05	8	0	8
OPC – 06	8	0	8	OPF – 06	4	0	4
OPC – 07	7	0	7	OPF – 07	5	0	5
OPC – 08	4	0	4	OPF – 08	8	0	8
OPC – 09	3	0	3	OPF – 09	7	0	7
OPC – 10	1	0	1	OPF – 10	11	0	11
OPC – 11	5	0	5	OPF – 11	2	0	2
OPC – 12	4	0	4	OPF – 12	5	0	5
OPC – 13	3	0	3	OPF – 13	5	0	5
OPC – 14	3	0	3	OPF – 14	8	0	8
OPC – 15	4	0	4	OPF – 15	3	0	3
OPC – 16	1	0	1	OPF – 16	7	0	7
OPC – 17	2	0	2	OPF – 17	1	0	1
OPC – 18	6	0	6	OPF – 18	0	0	0
OPC – 19	6	0	6	OPF – 19	0	0	0
OPC – 20	8	0	8	OPF – 20	10	0	10
TOTAL	-	-	94	TOTAL	-	-	110

Tabela 9: Número de bandas por “primer” testado, discriminando o total de bandas monomórficas e polimórficas, obtidas com marcadores UBC RAPD. Jaboticabal - SP, 2010.

<i>Primer</i>	<i>Bandas Monomórficas</i>	<i>Bandas Polimórficas</i>	<i>Total de Bandas</i>	<i>Primer</i>	<i>Bandas Monomórficas</i>	<i>Bandas Polimórficas</i>	<i>Total de Bandas</i>
UBC - 201	0	0	0	UBC - 251	4	0	4
UBC - 202	2	0	2	UBC - 252	3	0	3
UBC - 203	4	0	4	UBC - 253	7	0	7
UBC - 204	3	0	3	UBC - 254	3	0	3
UBC - 205	4	0	4	UBC - 255	0	0	0
UBC - 206	3	0	3	UBC - 256	2	0	2
UBC - 207	0	0	0	UBC - 257	0	0	0
UBC - 208	9	0	9	UBC - 258	1	0	1
UBC - 209	9	0	9	UBC - 259	0	0	0
UBC - 210	6	0	6	UBC - 260	2	0	2
UBC - 211	9	0	9	UBC - 261	1	0	1
UBC - 212	7	0	7	UBC - 262	1	0	1
UBC - 213	8	0	8	UBC - 263	0	0	0
UBC - 214	0	0	0	UBC - 264	4	0	4
UBC - 215	0	0	0	UBC - 265	3	0	3
UBC - 216	0	0	0	UBC - 266	0	0	0
UBC - 217	0	0	0	UBC - 267	0	0	0
UBC - 218	1	0	1	UBC - 268	2	0	2
UBC - 219	1	0	1	UBC - 269	1	0	1
UBC - 220	1	0	1	UBC - 270	4	0	4
UBC - 221	0	0	0	UBC - 271	0	0	0
UBC - 222	4	0	4	UBC - 272	6	0	6
UBC - 223	0	0	0	UBC - 273	0	0	0
UBC - 224	0	0	0	UBC - 274	0	0	0
UBC - 225	2	0	2	UBC - 275	5	0	5
UBC - 226	2	0	2	UBC - 276	4	0	4
UBC - 227	0	0	0	UBC - 277	5	0	5
UBC - 228	8	0	8	UBC - 278	0	0	0
UBC - 229	0	0	0	UBC - 279	0	0	0
UBC - 230	4	0	4	UBC - 280	3	0	3
UBC - 231	4	0	4	UBC - 281	0	0	0
UBC - 232	2	0	2	UBC - 282	4	0	4
UBC - 233	0	0	0	UBC - 283	2	0	2
UBC - 234	2	0	2	UBC - 284	2	0	2
UBC - 235	4	0	4	UBC - 285	6	0	6
UBC - 236	1	0	1	UBC - 286	0	0	0
UBC - 237	3	0	3	UBC - 287	2	0	2
UBC - 238	2	0	2	UBC - 288	0	0	0
UBC - 239	2	0	2	UBC - 289	2	0	2
UBC - 240	3	0	3	UBC - 290	3	0	3
UBC - 241	4	0	4	UBC - 291	0	0	0
UBC - 242	1	0	1	UBC - 292	2	0	2
UBC - 243	2	0	2	UBC - 293	1	0	1
UBC - 244	4	0	4	UBC - 294	0	0	0
UBC - 245	2	0	2	UBC - 295	2	0	2
UBC - 246	0	0	0	UBC - 296	2	0	2
UBC - 247	0	0	0	UBC - 297	1	0	1
UBC - 248	6	0	6	UBC - 298	0	0	0
UBC - 249	8	0	8	UBC - 299	4	0	4
UBC - 250	4	0	4	UBC - 300	0	0	0
TOTAL	-	-	141	TOTAL	-	-	94

Dos 439 fragmentos produzidos neste trabalho, observou-se 100% de bandas monomórficas, ou seja, não apresentaram variação quanto à presença ou ausência de bandas de mesmo comprimento em pares de base entre os indivíduos em estudo, indicando que nenhum dos 140 “primers” utilizados detectou variação entre os indivíduos de figueira, quando comparados entre si e com o padrão “Roxo-de-Valinhos”, como pode ser observado na figura 2.

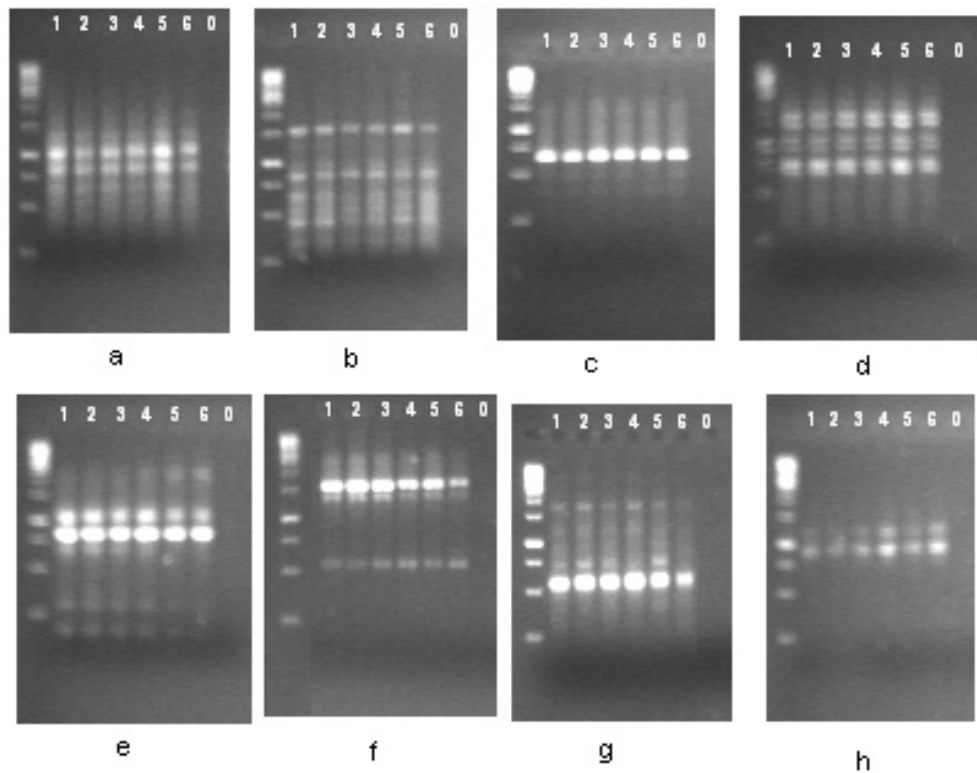


Figura 2. Produtos da amplificação com marcadores do tipo RAPD de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama e da cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de agarose (1,5%): a) primer OPC-05; b) primer OPC-06; c) primer OPC-16; d) primer OPF-09; e) primer OPF-13; f) primer UBC-203; g) primer UBC-248 e h) primer UBC-283. As numerações de 1 a 6 referem-se aos genótipos: 1-“Roxo-de-Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A marcação 0 indica o controle negativo das reações. Jaboticabal - SP, 2010.

4.2. AFLP

A utilização das 12 combinações de “primers” na avaliação da caracterização genética dos mutantes de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama e da cultivar Roxo-de-Valinhos, permitiu a obtenção de 1064 marcas, obtendo uma média de 88,68 bandas por combinação de “primers” avaliados.

WICKERT et al. (2007), trabalhando com marcadores *f*AFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro, com a utilização de 24 combinações de “primers”, obtiveram 272 marcas moleculares diferenciadoras dos três genótipos de umezeiro, de um total de 648 marcas, obtendo assim, uma média de 27 bandas por combinação de “primers”. SANTOS et al. (2008), obtiveram 141 e 58 bandas polimórficas e monomórficas, respectivamente, de AFLP, em 14 combinações de iniciadores (CI) EcoR1/Mse1, analisando a variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, com uma média de 14,2 bandas por combinação de iniciadores. BASTIANEL et al. (2006), trabalhando com diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott', de 64 combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas na análise *f*AFLP, somente 59 produziram produtos de amplificação com resolução suficiente, gerando 416 bandas. Já SANTOS et al. (2001), utilizando apenas 3 combinações de “primers” AFLP, obtiveram 437 bandas, com uma média de 145,6 bandas por combinação, no estudo de variedades clonais de cacau, o que mostra que a quantidade de bandas observadas com a técnica do AFLP depende do material e das combinações de “primers” utilizadas, assim como no RAPD. A quantidade de bandas produzidas por cada combinação de “primers” pode ser visualizada na seguinte tabela 9:

Tabela 10: Número de bandas por combinações de “primer” testado, discriminando o total de bandas monomórficas e polimórficas, obtidas com marcadores AFLP. Jaboticabal, 2010.

<i>Combinação</i>	<i>Bandas Monomórficas</i>	<i>Bandas Polimórficas</i>	<i>Total de Bandas</i>
1	101	0	101
2	76	0	76
3	68	0	68
4	101	0	101
5	97	1	98
6	114	0	114
7	64	0	64
8	75	0	75
9	89	0	89
10	74	0	74
11	82	0	82
12	122	0	122
TOTAL			1064

Dos 1064 fragmentos produzidos neste trabalho, observou-se apenas 1 banda polimórfica obtida com a combinação 5 de “primers”, e o polimorfismo se deu entre o indivíduo 3, cuja característica principal é o pedúnculo longo, em relação aos demais, ou seja, apenas uma banda apresentou variação quanto à presença ou ausência de bandas de mesmo comprimento em pares de base entre os indivíduos em estudo. Esta única banda polimórfica pode ser observada ampliada na figura 3. As figuras 4 e 5 mostram os géis de poliacrilamida com todas as combinações realizadas.

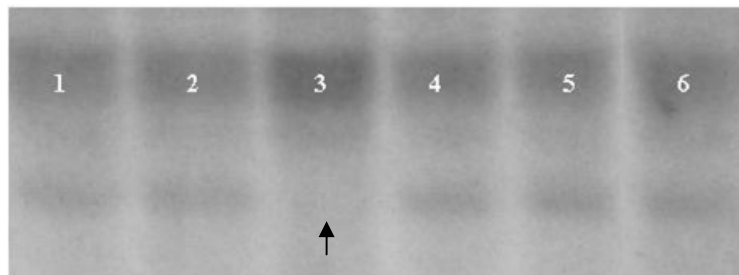


Figura 3. Polimorfismo obtido com a combinação 5, diferenciando geneticamente o indivíduo 3 dos demais tratamento devido a ausência de banda na posição indicada com uma seta. As numerações de 1 a 6 referem-se aos genótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. Jaboticabal, 2010.



Figura 4. Produtos da amplificação com marcadores do tipo AFLP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama e da cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida: a) combinação 1; b) combinação 2; c) combinação 3; d) combinação 4; e) combinação 5 e f) combinação 6. As numerações de 1 a 6 referem-se aos genótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A marcação PM indica o peso molecular. Jaboticabal, 2010.

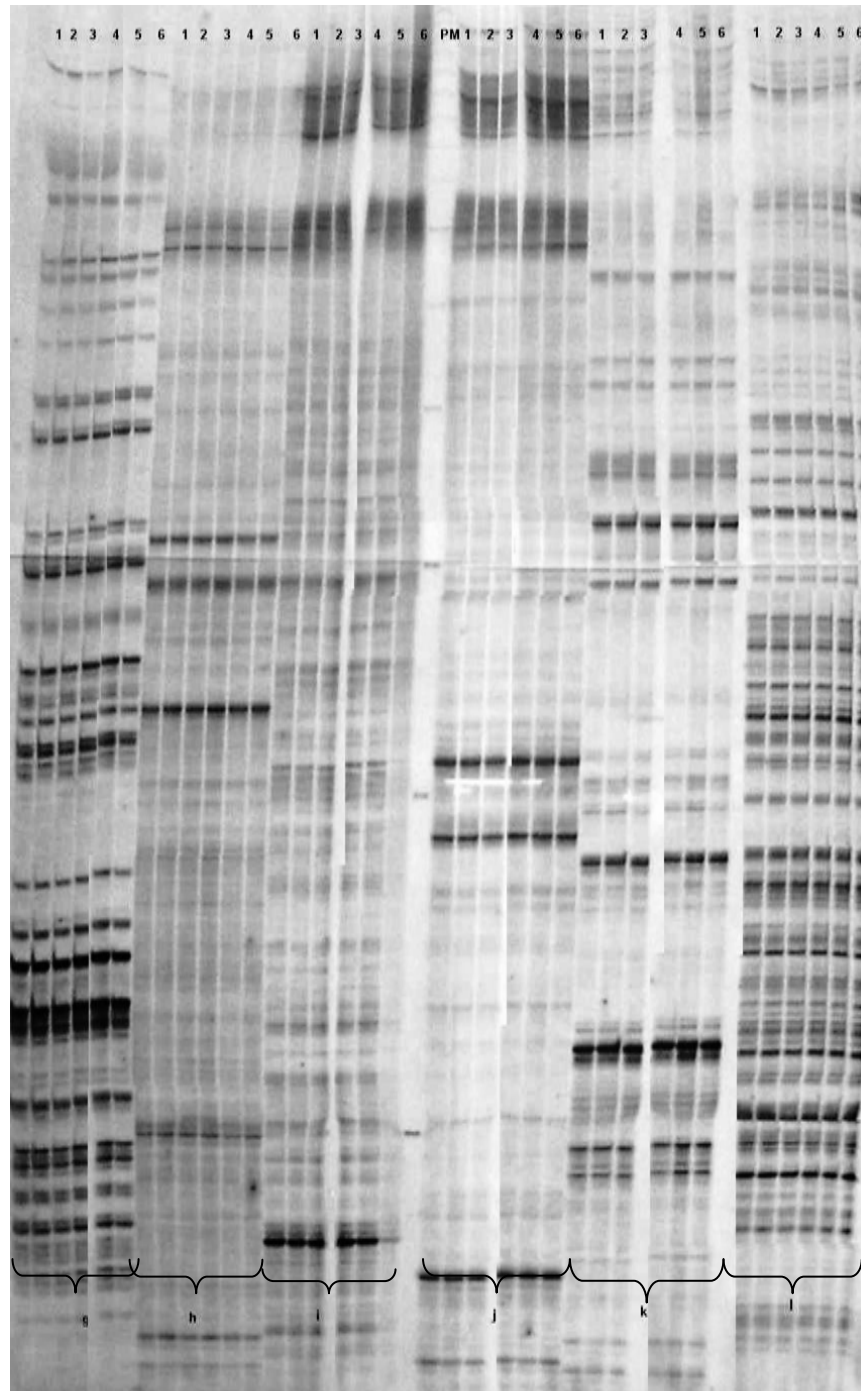


Figura 5. Produtos da amplificação com marcadores do tipo AFLP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama e da cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliácridamida: g) combinação 7; h) combinação 8; i) combinação 9; j) combinação 10; k) combinação 11 e l) combinação 12. As numerações de 1 a 6 referem-se aos genótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A marcação PM indica o peso molecular. Jaboticabal, 2010.

SOUZA et al. (2005), trabalhando com dissimilaridade genética em mutantes de aveia originados por irradiação com raios gama, identificaram um total de 880 marcadores, dos quais 195 foram polimórficos para 18 oligonucleotídeos de ISSR, sendo obtidas médias de 48,9 marcadores totais e 10,8 marcadores polimórficos. Esses resultados concordam com os obtidos por LI & GE (2001), que verificaram 122 bandas polimórficas para 12 oligonucleotídeos avaliados quando trabalhavam com variação genética e diversidade clonal de *Psammochloa villosa* (Poaceae).

MALONE (2005), com o objetivo de caracterizar morfológica e molecularmente 35 mutantes de arroz derivadas de irradiação com raios gama através do emprego de marcadores AFLP, obteve, de 9 combinações de “primers”, um total de 206 marcadores, sendo 184 polimórficos entre as famílias estudadas, evidenciando o grande potencial da técnica de AFLP em detectar a variabilidade genética presente nestas famílias de arroz e, a alta influencia da mutação na criação de variabilidade entre indivíduos.

De acordo com esses dados encontrados na literatura, os resultados obtidos com os marcadores moleculares utilizados mostram que não houve número significativo de bandas polimórficas para caracterizar os indivíduos em estudo como sendo diferentes geneticamente entre si.

Em experimento anterior já mencionado, as estacas retiradas da cultivar Roxo-de-Valinhos eram fenotípica e geneticamente idênticas à que lhes deu origem. Entretanto, após o estresse sofrido por elas através da radiação gama a qual foram submetidas, um grande número de tipos diferentes de fenótipos entre os indivíduos pôde ser observado.

Após a propagação vegetativa destes indivíduos diferentes, tidos como mutantes, as características fenotípicas se mantiveram, sem modificar o DNA, como observado anteriormente; o que pode caracterizar uma variação epigenética, que, de acordo com BORÉM (1997), se define como sendo variações relacionadas com a regulação gênica em resposta a algum estímulo, e que persistem mesmo após a remoção deste estímulo, mas não herdadas pelas progênes de origem sexual, porém

perpetuada por propagação assexuada, sem envolver mudanças permanentes no genótipo.

A metilação do DNA é um tipo de modificação química do DNA e, como tal, é o mais bem caracterizado mecanismo epigenético, podendo provocar uma variação epigenética, a qual pode ser causada por indução de mutações, como a presença de citocinina no meio de cultura em plantas micropropagadas. A metilação do DNA tem sido associada com a expressão gênica alterada em numerosas espécies de plantas (KAEPLER et al., 2000).

A metilação consiste na transferência de grupos metil a algumas das bases citosinas do DNA situadas previa e contigualmente a uma guanina; por exemplo, ao carbono número 5 do anel de pirimidina de citosina (DODGE et al., 2002; HAINES et al., 2001). Em plantas, a metilação do DNA tem sido associada à regulação da expressão gênica, a defesa do genoma, diferenciação celular, inativação da cromatina, e imprinting genômico. As plantas superiores são predominantemente metiladas no dinucleotídeo CpG e no trinucleotídeo CpXpG sob a forma de 5-metilcitosina (FINNEGAN et al., 1998).

É conhecido que no DNA de plantas, a metilação de citosina, formando 5-metilcitosina, leva a repressão de genes, provocando alterações na transcrição genética sem necessidade de que se produza uma alteração na sequência do DNA, sendo um dos mecanismos responsáveis pela plasticidade fenotípica (HEPBURN et al., 1987; QUEMADA et al., 1987).

Com a exposição à radiação gama, nas gemas que deram origem as seleções de figueira (*Ficus carica* L.) utilizadas neste trabalho, pode ter ocorrido uma variação epigenética, ou seja, sem alterar a sequência do DNA, porém alterando o fenótipo das plantas; nesse caso, a técnica de MSAP (*Methylation-sensitive amplified polymorphism*), que é uma variação da técnica de AFLP, utilizando, ao invés da enzima de restrição MseI, uma enzima de restrição sensível a metilação do DNA, como descrito por THANANANTA et al. (2006), se torna uma ferramenta importante na determinação do polimorfismo entre os tratamentos, podendo ser associada com o sequenciamento e posterior estudos de bioinformática.

5. CONCLUSÕES

1. Os indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio gama não diferem geneticamente entre si e entre a cultivar Roxo-de-Valinhos, pelas técnicas dos marcadores moleculares RAPD e AFLP.
2. Os diferentes fenótipos observados entre os tratamentos podem ser devido à uma variação epigenética provocada pela metilação do DNA, em decorrência da exposição das gemas que originaram os mutantes, à radiação gama.
3. Técnicas que possam detectar o polimorfismo provocado pela metilação do DNA, como a análise MSAP e o sequenciamento, devem ser testadas.

6. REFERÊNCIAS

AITKEN, K.S.; JACKSON, A.P.; McINTYRE, C.L. Quantitative trait loci identified for sugar related traits in sugarcane *Saccharum spp* cultivar x *Saccharum officinarum* population, **Theoretical and Applied Genetics**. v.20, p.100-112, 2006.

AKUHUND-ZADE, I.M. Radiation mutagenesis in subtropical crops. **Teoretical Prikl Aspekty Radiata Biology Technology**. Tekhnol, p.50-51, 1981.

AUKAR, A.P.A.; ZAINDAN, H.A.; FREITAS, M.L.; LEMOS, E.G.M. fAFLP analysis of genetic diversity within and between *Passiflora spp*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, **Anais**. Águas de Lindóia, SP, 47, 2001.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C. de; CRISTOFANI, M.; MACHADOI, M.A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por AFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 779-784, 2006.

BENATTI, T.R.; SOUZA, A.C.D.; SCARPARE FILHO, J.A.; SANTOS, P.C.; TULMANN NETO, A.; KIDO, E.A.; FIGUEIRA, A. Detecção de marcadores AFLP associados ao nanismo em bananenira (*Musa spp*). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, **Anais**. Águas de Lindóia, SP, 47, 2001.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa:UFV, 1997.

CAIXETA, R.P.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S.; TRUGILHO, P.F. Variação genética em populações de *Eucalyptus spp*. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.357-363, 2003.

CERVERA, M.T.; GUSMÃO, J.; STEENACKERS, M.; VANGYSEL, A.; VANMONTAGU, M.; BOERJAN, W. Application of AFLP – based molecular markers to breeding of *Populus spp*. **Plant Growth Regulation**, v.20, n.1, p.47-52, 1996.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Genetic variability in populations of oat induced by chemical and physical mutagenic agents. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, p.48-56, 2004.

CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira, do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, p.259, 1999.

CRESTE, S.; TULMANN NETO,A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorfisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver stining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306. 2001.

DODGE, E.; RAMSAHOYE, B. H.; WO, Z. G.; OKANO, M.; LI, E. Methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. **Gene**, n.289, p.41–48, 2002.

DOMINGUES, E.T., TULMANN NETO, A., Teófilo Sobrinho, J. Importância das mutações somáticas no melhoramento das variedades cítricas. **Laranja**, v.16, n.2, p.235-249, 1995.

DONINI, B. Breeding methods and applied mutagenesis in fruit plants. In: PROCEEDINGS WORKSHOP EUROPEAN COMMUNITY, 1976, Wageningen. **The use of Ionizing Radiation**, Wageningen: ITAL, p. 445-478, 1976.

DONINI, B. Use of induced mutations in improvement of vegetatively propagated crops. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Induced mutations for crop improvement in Latin America**. Viena, p.79-98, 1984.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: EMBRAPA/CNPS, 412p, 1999.

FERREIRA, E.A.; PASQUAL, M.; TULMANN NETO, A. *In Vitro* sensitivity of fig plantlets to gamma ray. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n.4, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p, 1998.

FINNEGAN, E. J.; GENGER R. K.; PEACOCK W. J.; DENNIS E. S. DNA methylation in plants. **Plant Molecular Biology**. 49: 223–247, 1998.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION – FAO (2004). **Statistical** – database. Disponível em <www.apps.fao.org>. Acesso em 2 abril de 2005.

FRANKS, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M.R. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.2/3, p.192-199, 2002.

GALET, A. **A practical ampelography: grapevine identification**. Ithaca: Lommstock, 248p, 1979.

GERBER, S., MARIETTE, S., BODÉNÈS, C. AND KREMER, A. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v.9, p.1037-1048. 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R.R. Genetic linkage maps of eucalyptus grandis and E. urophylla using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Genetics**, p.1121-1137, 1994.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperatures-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, p. 439-446, 1974.

GUERRERO, F. D., JAMROZ, R. C., KAMMLAH, D., KUNZ, S. E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. *Insect Bioch. Molecular Biology*, v. 27, p. 745-55, 1997.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, p.715-740, 1999.

HAINES, T. R.; RODENHISER, D. I.; AINSWORTH, P. J. "Allele-Specific Non-CpG Methylation of the Nf1 Gene during Early Mouse Development". **Developmental Biology**, n.240, p.585–598, 2001.

HEPBURN, A.G.; BELANGER, F.C. & MATTHEIS, J.R. DNA methylation in plants. **Developmental Genetics**, v.8, p.475-493, 1987.

HOFFMAN, D. & DAHLEEN, L. Markers polymorphic among malting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars of a narrow gene pool associated with key QTLs. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 105, p. 544–554, 2002.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **A Cultura do figo em São Paulo**. Disponível em < <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=2314>>. Acesso em abril de 2008.

JONHS, M.A.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J., HINRICHSEN, P.; BASCUR, G.; MUNOZ, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **CropScience**, v.37, p.605-613, 1997.

KAEPPLER, Shawn M.; KAEPPLER, Heidi F. and RHEE, Yong. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 2-3, p. 179-188, 2000.

KATENGAM, S.; CRANE, J.M.; KNAPP, S.J. The development of a genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**. v.104, p. 92–96, 2002.

KARP, A.; SEBERG, BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, v.78, n.2, p.143-149, 1996.

KERKADZE, I.G. Radiation mutagenesis in subtropical crops. **Radiatsionnyi Mitogenez-I-Ego-Rol-V-Evolutsii-I-Seleksii**, 231-254, 1987.

KÖEPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Econômica, 478p, 1948.

KONSTANTINOV, K.; DRINIC, S.M.; SIJACIC, M.; ISAJEV, V.; MATARUGA, M. Molecular markers application for genetic resources characterization of different plant species. In: The role of biotechnology, Turin, Italy, **Annals**, p.179-180, 2005.

LAPINS, K.O. Mutation breeding. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue Press, p. 74-99, 1983.

LI, A.; GE, S. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. **Annals of Botany**, London, v.87, p.585-590, 2001.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. New York: CRC Press, 611p, 1998.

LODHI, M.A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.12, n.1, p.6-13, 1994.

MALONE, E. **Caracterização morfológica e molecular em mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à tolerância a toxidez por alumínio**. 2005. 60f. – Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

MANUBENS, A.; LOBOS, S.; JADUE, Y.; TORO, M.; MESSINA, R.; HADSER, M.; SEELENFREUND, D. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.17, p.255-267. 1999.

MELO, W.M.C.; PINHO, R.G.V.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. Utilização de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares para a avaliação da divergência genética entre híbridos de milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v.48, n.276, p.195-207, 2001.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, p. 14-17, 1998a.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, p. 17-28, 1998b.

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

OLIVEIRA, A.C.; RICHTER, T.; BENNETZEN, J. L. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. **Genome**, Canada, v.39, p.579-587, 1996.

PARAN, I.; KESSELI, R.; MICHELMORE, R. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 34, p. 1021-1027, 1991.

PEREIRA, F. M. **Cultura da figueira**. Piracicaba: Livroceres, p.73, 1981.

PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. Botânica, biologia e cultivares de figueira. In: CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira do plantio a comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP. p. 25-36, 1999.

PEREIRA, A.V.; MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.S.; NASCIMENTO, C.S.; CAMPOS, A.L.; LEDO, F.J.S. Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.7, 2008.

PLOMION, C.; O`MALLEY, D.M.; DUREL, C.E. Genomic analysis in maritime pine (pinus pinaster) comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 90, p.1028-1034, 1995.

POPESCU, C.F.; FALK, A.; GLIMELIUS, K. Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines. **Vitis**, Siebeldingen, v.41, n.4, p.177-182, 2002.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p. 225–238, 1996.

QUEMADA, H.; ROTH, E.J. & LARK, K.G. Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes Hpa II and Msp I. **Plant Cell Reports**, v. 6, p.63-66, 1987.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras, MG: UFLA. 472p, 2000.

RODRIGUES, M.G.F.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C. Caracterização de mutantes da cv. Roxo-de-Valinhos e comportamento de cultivares de figueiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n.3, 2009.

RUSSELL, R.J.; FULLER, J.D.; MACAULAY, M.; HATS, B.G.; JAHOOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley

accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 714–722, 1997.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S.J.; HIGUCHI, G.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, p. 487-491, 1988.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. USO DE MARCADORES MOLECULARES NA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, 2002.

SALLAND, C.; LORIEUX, M.; ROUMEN, E.; THARREAU, D.; BERRUYER, R.; SVESTASRANI, P.; GRASMEUR, O.; GHESQUIRE, A.; NOTTEGHEM, J.L. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast resistant variety IR 64 using a QTL mapping strategy. **Theoretical and Applied Genetics**. v.106, p. 794–803, 2003.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, P.C. et al. Sensitividade de estacas de figo a radiação gama. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.150, 1997.

SANTOS, R. C.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A.S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALLE, R.R.M. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 13, n. 2, p. 79-89, 2001.

SANTOS, C.A.F.; RODRIGUES, M.A.; ZUCCHI, M.I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1037-1043, 2008.

SAWAZAKI, H.E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C.A. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, 2002.

SILVA, S.D.A.; ANTUNES, L.E.C.; ANTHONISEN, D.G.; LEMÕES, J.S.; GONÇALVES, E.D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, 2008.

SCOTT, K.D.; PACEY, T.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. **Euphytica**, v.113, n.3, p.245-249, 2000.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Mello, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p.939-965, 2001.

SOUZA, V.Q.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; LUZ, V.K.; OLIVEIRA, A.C. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Braganti**, v.64, n.4, pp. 569-575, 2005.

SOUZA, O.P.; MELO, B.; MANCIN, C.A. **A Cultura da figueira**. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br>> . Acesso em: 08 dez. 2007.

SPIEGEL-ROY, P. Economic and agricultural impact of mutation breeding in fruit trees. **Mutation Breeding Review**, n.5, p.26, 1990.

STROMMER, J.; PETERS, J.; ZETHOF, J.; KENKELEIRE, P.; GERATS, T. AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when markers cluster. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 105, p. 1000–1009, 2002.

THANANANTA, T.; PONGTONGKAM, P.; THONGPAN, A.; KAVEETA, L.; PEYACHOKNAGUL, S. Effect of short day photoperiod on DNA methylation and expression of a gene in rice KDML105. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, p. 1375-1382, 2006.

TIGNON, M.; KITTMANN, R.; WATILLON, B. Use for identification of apple cultivars and mutants. **Acta Horticulturae**, v.521, 2001.

TULMANN NETO, A., et al. Aspectos sobre o Melhoramento da Figueira (*Ficus carica* L.). In: CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira do plantio a comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, p. 25-36, 1999.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.4407-4414, 1995.

WICKERT, E.; LEMOS, E.G.M.; PEREIRA, F.M.; MAYER, N.A. Marcadores fAFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, 2007.

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

WILLIAMS, J.G.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzymology**, p.704-740, 1993.

ZABEU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application**, n. 0534858 A1, 1993.

ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; MARCZEWSKI, W.; LEBECKA, R.; FLIS B.; SCHAFER-PREGL, R.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP and resistance-gene-like markers. **Crop Science**, v. 40, p. 1156–1167, 2000.