

ESTIMATIVA DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE
TOMATEIRO POR MARCADORES RAPD

LEANDRO SIMÕES AZEREDO GONÇALVES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2007

ESTIMATIVA DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE
TOMATEIRO POR MARCADORES RAPD

LEANDRO SIMÕES AZEREDO GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

Orientadora: Profa. Rosana Rodrigues

CAMPOS DO GOYTACAZES – RJ
ABRIL - 2007

ESTIMATIVA DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE
TOMATEIRO POR MARCADORES RAPD

LEANDRO SIMÕES AZEREDO GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

Aprovada em 02 de abril de 2007

Comissão Examinadora:

Prof. Antônio Carlos de Souza Abboud (Ph. D., Biologia) – UFRRJ

Prof. Rogério Figueiredo Daher (Doutor, Produção Vegetal/Melhoramento de Plantas) - UENF

Profa. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., Melhoramento de Plantas) - UENF

Profa. Rosana Rodrigues (Doutora, Produção Vegetal/ Melhoramento de Plantas)-
UENF
Orientadora

A Deus.

Aos meus pais, Roêmio e Rosalina.

Aos meus irmãos, Rafael e Janaina.

A minha namorada, Renata R. Robaina.

E a todos os meus amigos.

Dedico.

“O mestre na arte da vida faz pouca distinção entre seu trabalho e lazer, sua mente e seu corpo, sua educação e sua recreação, seu amor e sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo o que faz, deixando aos outros a decisão se ele está trabalhando ou se divertindo. Ele está sempre fazendo ambos simultaneamente.”

(Texto Zen-Budista)

AGRADECIMENTO

A Deus.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade concedida para realização deste curso.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela bolsa concedida.

À professora Rosana Rodrigues, pela orientação, confiança e amizade.

Ao professor Rogério Figueiredo Daher, pelos ensinamentos e amizade.

Ao professor Messias Gonzaga Pereira, pelas valiosas sugestões.

À professora Telma Nair Santana Pereira, pelos ensinamentos e valiosas sugestões.

À pesquisadora Maria Luíza de Araújo e ao professor Antonio Carlos de Souza Abboud, pela doação de sementes.

Aos demais professores do curso, pela oportunidade de aprendizado, incentivo e confiança.

À técnica Vitória, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

À amiga incondicional Claudia Pombo Sudré, pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos e amigas do Laboratório, Marlon, Cíntia, Monique, Kenea, Sarah, Rebeca, Mariana e Gildeide.

Aos amigos de UENF, Marcos, Marcelo, Vicente, Maria, Elaine, Francisco, Gustavo, Karina e àqueles que compartilharam esta conquista.

Aos amigos de república, Rafael, Carlos, Igor, Anderson, Guilherme, Luiz Fernando e Bruno.

Aos técnicos e todos os funcionários do LMGV e do CCTA, pelo apoio na consecução deste objetivo.

A todos, mesmo que não estejam citados, que, direta ou indiretamente, estiveram presentes durante este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Origem e classificação botânica.....	4
2.2. Importância econômica e nutricional.....	6
2.3. Cultivares.....	8
2.4. Conservação, caracterização e avaliação de germoplasma	10
2.5. Marcadores moleculares.....	13
2.5.1. Marcadores moleculares – RAPD.....	14
2.6. Diversidade genética.....	17
2.6.1. Agrupamento.....	19
2.6.2. <i>Bootstrap</i>	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Germoplasma.....	22
3.2. Condições de cultivo.....	27
3.3. Análise molecular.....	27
3.3.1. Preparo das amostras.....	27
3.3.2. Extração do DNA.....	27
3.3.3. Quantificação do DNA.....	28
3.3.4. Condições de amplificação.....	29

3.3.5. Seleção de iniciadores.....	29
3.4. Análise dos dados.....	29
3.4.1. Análise dos fragmentos amplificados.....	29
3.4.2. Dissimilaridade genética.....	30
3.4.3. Validação dos nós (Análise de “bootstrap”).....	31
3.4.4. Concordância entre dissimilaridades genéticas geradas por características morfoagronômicas e marcadores RAPD.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Triagem dos iniciadores e amplificação do DNA.....	33
4.2. Diversidade genética.....	37
4.2.1. Método hierárquico das medidas de dissimilaridade ponderada (UPGMA).....	41
4.2.2. Método de Agrupamento Tocher.....	45
4.3. Consistência das ramificações formadas por UPGMA.....	47
4.4. Concordância entre dissimilaridades genéticas geradas por características morfoagronômicas e marcadores RAPD.....	48
4.5. Considerações finais.....	51
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos 78 acessos de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) com seus respectivos nomes comuns e características da planta e do fruto, com base em cinco descritores qualitativos (hábito de crescimento, tipo de folha, número de lóculos, cor do fruto e formato do fruto). Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	23
Tabela 2. Relação dos iniciadores utilizados, suas seqüências de bases, número de fragmentos polimórficos e monomórficos amplificados e número total de fragmentos. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	34
Tabela 3. Agrupamento de 78 acessos de <i>Lycopersicon esculentum</i> , baseado na dissimilaridade genética, obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, e no agrupamento pelo método UPGMA. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	39
Tabela 4. Agrupamento pelo método de Tocher dos acessos de <i>Lycopersicon esculentum</i> estudados, com base na dissimilaridade genética expressa pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	40
Tabela 5. Agrupamento pelo método de Tocher dos 58 acessos de <i>Lycopersicon esculentum</i> estudados, com base na dissimilaridade genética expressa pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, por meio dos dados morfológicos e moleculares. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Polimorfismo dos 78 acessos de *Lycopersicum esculentum* obtido com o iniciador OPE-16; “B” representa o branco de DNA. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007..... 36
- Figura 2 – Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir dos coeficientes de dissimilaridade genética, expressa pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, entre 78 acessos de *Lycopersicon esculentum*, com base em 74 fragmentos polimórficos e 58 monomórficos... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato
CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio.
DNA – Ácido desoxirribonucléico.
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.
MB – Pares de mega base.
 μL – Microlitro.
KCl – Cloreto de potássio.
 MgCl_2 – Cloreto de magnésio.
NaCl – Cloreto de sódio.
(p/v) – Peso por volume.
PCR – Reação de polimerase em cadeia.
PVP – Polivinilpirrolidona.
RNAse – Ribonuclease.
Taq – DNA polimerase.
UV – Ultravioleta.

RESUMO

GONÇALVES, Leandro Simões Azeredo; M.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril, 2007; Estimativa da divergência genética entre acessos de tomateiro por marcadores RAPD. Orientadora: Rosana Rodrigues; Conselheiros: Rogério Figueiredo Daher e Telma Nair Santana Pereira.

A caracterização da variabilidade genética existente em um banco de germoplasma não está no interesse somente das organizações de conservação de recursos genéticos, mas também para aplicações práticas no melhoramento de plantas, dentre as quais a indicação de cruzamentos que envolvam genitores geneticamente divergentes com o objetivo de produzir híbridos com maior efeito heterótico. Entretanto, os bancos de germoplasma são pouco utilizados devido principalmente à falta de documentação, descrição adequada e avaliação das coleções e, conseqüentemente, ausência de informação relevante para os melhoristas. O presente trabalho objetivou estudar a divergência genética entre 78 acessos da coleção de germoplasma de *Lycopersicon esculentum*, do CCTA/UENF (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), com base na caracterização por marcadores RAPD e correlacionar os dados morfoagronômicos com os dados de caracterização molecular. Foram utilizados os métodos de agrupamento hierárquico (UPGMA) e de otimização (Tocher) para analisar os dados. No dendrograma formado pelo método de UPGMA, um corte a 18% possibilitou a formação de 13 grupos. Esses grupos formados foram correlacionados com cinco descritores (hábito de crescimento, tipo de folha, cor do fruto, número de lóculos e

formato do fruto), e alguns deles apresentam algumas peculiaridades, como o grupo IV, que reúne acessos que apresentam frutos no formato de pêra e o grupo IX, que apresenta folha do tipo batata. Comparando os resultados obtidos pelo UPGMA com o método Tocher, observou-se concordância parcial entre os grupos formados, sendo que o grupo I do UPGMA foi subdividido em 13 grupos pelo método de Tocher. Contudo, a análise por *bootstrap* revelou poucos agrupamentos consistentes. Posteriormente, com a finalidade de comparar os dados morfoagronômicos com os dados moleculares, foi necessária a transformação dos dados qualitativos em binários dos 58 acessos correlacionados com os acessos estudados neste trabalho. Os resultados obtidos mostram uma correlação positiva e altamente significativa entre as matrizes geradas pelos dados qualitativos e pelos marcadores RAPD ($t = 14,02$), entretanto, pela correlação de Mantel, obteve-se um valor de correlação baixo (r) de 0,39. Este resultado pode-se dever ao fato de as marcas obtidas pelos marcadores RAPD não serem correlatas com as características fenotípicas estudadas. Com base nos resultados obtidos, recomendam-se os cruzamentos: UENF 155 x UENF 175, UENF 175 x UENF 1667, UENF 175 x UENF 1701 (visando à obtenção de plantas produtoras de fruto do tipo cereja e resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); UENF 224 x UENF 175 (visando às plantas produtoras de fruto grande e resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); UENF 155 x UENF 1662 ou UENF 1663 (para obtenção de plantas produtoras de fruto tipo cereja e resistentes à *Ralstonia solanacearum*); UENF 1662 ou UENF 1663 com UENF 185 ou UENF 196 (para obtenção de plantas produtoras de frutos grandes e resistentes à *Ralstonia solanacearum*) e UENF 175 com UENF 1662 ou UENF 1663 (visando à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e à *Ralstonia solanacearum*).

ABSTRACT

GONÇALVES, Leandro Simões Azeredo; M.S.; University Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April 2007; Genetic divergence in tomato accessions estimated by RAPD markers. Advisor: Rosana Rodrigues; Committee members: Rogério Figueiredo Daher and Telma Nair Santana Pereira.

The characterization of genetic variability in a genebank is not only of interest for organizations of genetic resources conservation, but also for practical applications in plant breeding. One such example is the indication of crosses with genetically divergent parents for the establishment of hybrids with greater heterotic effect. The genebanks are however not frequently used, due mainly to a lack of evaluation, adequate description and documentation of the collections and consequently, absence of relevant information for breeders. This study aimed to investigate the genetic divergence in 78 accessions of the *Lycopersicon esculentum* genebank of the CCTA/UENF (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias/University Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), based on the RAPD marker characterization secondly, the morpho-agronomic data were correlated with those of molecular characterization. The methods of hierarchical grouping (UPGMA) and optimization (Tocher) were used to analyze the data. In the dendrogram based on the UPGMA method, a cut at 18% resulted in the formation of 13 groups. These groups were correlated with five descriptors (growth habit, leaf type, fruit color, number of locules and fruit shape). Some presented peculiarities, as for example group IV, which contains accessions with pear-shaped fruits or group IX, with plants with potato-like leaves. The groups formed

by the UPGMA were partly consistent with the groups of the Tocher method. Group I by UPGMA was subdivided in 13 groups by the Tocher method. The bootstrap analysis revealed few consistent groupings. Thereafter, for a comparison of the morpho-agronomic with the molecular data, the qualitative had to be transformed into binary data of the 58 accessions correlated with the accessions studied here. Our results show a positive and highly significant correlation between the matrices generated by the qualitative data and by the RAPD markers ($t = 14.02$). By the correlation of Mantel, however, a low correlation value (r) of 0.39 was found. This may be due to the fact that markers obtained by RAPD are not correlated with the phenotypic traits under study. The results allow the recommendation of the following crosses: UENF 155 x UENF 175, UENF 175 x UENF 1667, UENF 175 x UENF 1701 (for plants with cherry-like fruits and resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); UENF 224 x UENF 175 (for plants with large fruits and resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); UENF 155 x UENF 1662 or UENF 1663 (for plants with cherry-like fruits and resistance to *Ralstonia solanacearum*); UENF 1662 or UENF 1663 with UENF 185 or UENF 196 (for plants with large fruits and resistance to *Ralstonia solanacearum*) and UENF 175 with UENF 1662 or UENF 1663 (for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and à *Ralstonia solanacearum*).

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) está entre as hortaliças mais consumidas no mundo, nas diferentes formas processadas ou “in natura”. São cultivados no mundo cerca de 3,18 milhões de hectares de tomateiro, com uma produção estimada em 89,2 milhões de toneladas. O Brasil produz cerca de 3% da produção mundial ocupando a oitava colocação, sendo a China o maior produtor (Reis et al., 2005). Em 2005, o Brasil obteve uma produção em torno de 3,7 milhões de toneladas, sendo que 60% destinaram-se ao chamado segmento de mesa, numa área plantada de 63 mil hectares e com rendimento médio de 58 t.ha⁻¹, atingindo um valor na ordem de R\$ 1,48 bilhão (IBGE, 2005).

O tomate é uma das entre muitas espécies autógamas cultivadas, que tiveram sua diversidade genética reduzida drasticamente; primeiro, devido a sua domesticação fora do centro de origem e, segundo, pelo melhoramento de plantas, que foi sendo feito ao longo dos anos com base em um número limitado de genótipos, cujas sementes foram coletadas pelos descobridores da América e levadas ao continente Europeu. Além disso, muitos genótipos foram perdidos ao longo do tempo, em conseqüência da substituição ou do desaparecimento de espécies silvestres, cultivares obsoletas e de variedades locais (Saavedra et al., 2001). Conseqüentemente, observa-se um alto grau de uniformidade nas variedades, tornando a cultura altamente vulnerável a pragas e doenças (Carelli, 2003).

Em estudos de diversidade genética em tomate utilizando marcadores moleculares, observou-se que grande parte dos trabalhos aponta para a estreita base genética das cultivares modernas (Saavedra e Spoor, 2002).

Por isso, bancos de germoplasmas são de suma importância, pois colocam à disposição dos pesquisadores ampla fonte de recursos genéticos, que podem fornecer genes que conferem adaptação a diferentes estresses abióticos e resistência a inúmeras pragas e doenças (Gepts, 2006).

No mundo existem vários bancos de germoplasma com objetivo de conservação de *Lycopersicon*, quais sejam: o *Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC)*, o *Tomato Genetics Resource Center (TGRC)* e o *Germoplasm Resources Information Network (GRIN)*. No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) mantêm bancos ativos de germoplasma de tomateiro.

A caracterização e avaliação dos acessos do banco de germoplasma são de fundamental importância, pois contribuem para maior conhecimento dos acessos, viabilizando a detecção de possíveis acessos a serem utilizados em programas de melhoramento de plantas e a de possíveis duplicatas nos bancos de germoplasma (Valls, 1988). A presença de acessos duplicados em coleções de germoplasma aumenta o trabalho do curador, reduz o espaço disponível para conservação de outras amostras e não contribui para o enriquecimento da variabilidade genética (Van Hintum e Vissen, 1995).

Para complementar as informações e aumentar a base de conhecimento genético sobre os acessos de um banco de germoplasma, os marcadores moleculares têm sido um instrumento de auxílio na caracterização dos bancos de germoplasma, pois revelam diferenças genéticas com maior precisão e sem os efeitos causados pela influência ambiental, oferecendo vantagens em termos de discriminação, confiabilidade e rapidez (Binneck et al., 2002).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) mantém uma coleção de germoplasma de *Lycopersicon spp.*, parte desse germoplasma já foi caracterizada morfoagronomicamente (Karasawa, 2005). Este trabalho teve como objetivos dar continuidade às atividades de caracterização do banco de germoplasma de tomateiro, utilizando marcadores RAPD para quantificar a divergência genética entre acessos, identificar possíveis acessos

duplicados na coleção e correlacionar os dados morfoagronômicos com os dados de caracterização molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e classificação botânica

O tomate tem como seu centro de origem a região Andina, na América do Sul, compreendendo um estreito território, limitado ao sul pelo norte do Chile com latitude de 30°, ao norte pelo Equador e sul da Colômbia, ao leste pela Cordilheira dos Andes e a oeste pelo Oceano Pacífico, incluindo o Arquipélago das Ilhas Galápagos (Rick, 1982). Entretanto, há controvérsias sobre a sua domesticação, e a hipótese mais aceita é que o tomate-cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) foi levado pelos povos Incas até a região do sul do México, onde habitavam os Astecas, que tornaram o país o centro de domesticação do tomate cultivado, em especial, na região de Puebla e Vera Cruz (Jenkins, 1948). No México, a espécie teria sido domesticada e levada para a Europa pelos colonizadores nos séculos XVI e XVII.

Entretanto, Rick e Holle (1990), anos mais tarde, formularam uma segunda hipótese de domesticação, em que centros independentes de domesticação podem ter ocorrido ao mesmo tempo, no México e na região Andina. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que *L. esculentum* var. *cerasiforme* cresce espontaneamente em muitos locais da América do Sul, estando amplamente disseminada em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Rick, 1991).

Entre os primeiros tomates cultivados na Europa, mais precisamente na Itália, estava uma espécie com frutos amarelos, conhecidos popularmente como “pomi d’oro”. No século XVIII, já era largamente consumido em vários países da

Europa (Hille et al., 1989). Entretanto, durante um longo período, o tomate foi cultivado como planta ornamental por ser considerado venenoso, a exemplo de outras solanáceas venenosas (Melo, 1989; Plantar, 1991).

As primeiras populações melhoradas na Europa deram origem às chamadas “landraces” ou variedades “crioulas” de tomate, que podem ainda conter muitos genes silvestres, o que as torna interessantes para estudos com finalidade de ampliação da base genética e de resgate da variabilidade perdida no processo de melhoramento dessa espécie de importância econômica e ecológica em âmbito mundial (Saavedra et al., 2001).

O tomate silvestre é uma planta herbácea e perene, contudo, o tomateiro é cultivado como planta anual, de hábito de crescimento indeterminado (crescimento contínuo, apresentando os cachos florais de três em três internódios, separados por três folhas) ou crescimento determinado (apresenta menos de três folhas entre os cachos florais, e o ponteiro pode terminar em um cacho). A inflorescência é uma cimeira simples, bifurcada ou ramificada. As flores do gênero *Lycopersicon* são hermafroditas e os estiletes ficam normalmente protegidos por um cone de cinco ou seis anteras. A espécie *Lycopersicon esculentum* apresenta seis anteras e as demais apenas cinco anteras (Silva e Giordano, 2000). O fruto é uma baga de tamanho e formato variáveis. Internamente, os frutos podem ser bi, tri, tetra ou plurilocular. O fruto maduro pode ser vermelho, rosado ou amarelo.

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) pertence a uma família botânica extremamente diversa e grande, que é a Solanácea, a qual inclui outras espécies de importância agrônômica, como a berinjela, o pimentão, a petúnia, o fumo e a batata (Minami e Haag, 1980). O gênero *Lycopersicon* possui uma grande variabilidade, possibilitando o desenvolvimento de cultivares para atender as mais diversas demandas do mercado de tomate para processamento e para consumo “in natura” (Silva e Giordano, 2000). Este gênero reúne nove espécies, todas são diplóides ($2n = 2x = 24$ cromossomos); é dividido em dois complexos gênicos, e estudos filogenéticos, baseados na capacidade de cruzamento e em características morfológicas, separam essas espécies em dois grupos distintos denominados:

1- complexo “*esculentum*”, formado por *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmanii*, *L. hirsutum*, *L. pennellii*, *L. chmielewskii* e *L. parviflorum*. Neste

grupo, *L. esculentum* e *L. pimpinellifolium* cruzam-se facilmente, independente de quem seja o genitor feminino. Por outro lado, observa-se incompatibilidade unilateral entre os cruzamentos de *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, *L. chmielewskii* quando estes são utilizados como genitores femininos e o *L. esculentum* como genitor masculino (Rick et al., 1990).

2- complexo “*peruvianum*”, formado por *L. peruvianum* e *L. chilense*. Nestas duas espécies, ocorrem barreiras nos cruzamentos interespecíficos com as outras espécies do gênero *Lycopersicon*, sendo observado abortamento de embriões quando *L. esculentum* é usado como genitor feminino. Porém, quando *L. esculentum* é utilizado como genitor masculino, ocorre incompatibilidade unilateral (Silva e Giordano, 2000).

Estudos de dados moleculares de DNA constataram que a similaridade genômica tanto nuclear quanto mitocondrial e cloroplastidial é superior a 90% entre as diferentes espécies de tomate e outras espécies representantes do gênero *Solanum* (Silva, 2006). Conseqüentemente, alguns taxonomistas estão adotando uma nova classificação para o tomateiro, como pertencente ao gênero *Solanum*. Dessa forma, *Lycopersicon esculentum* passa a ser conhecido como *Solanum lycopersicon*, *L. pimpinellifolium* como *S. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae* com *S. galapagense*, *L. hirsutum* como *S. habrochaites*, *L. pennellii* como *S. pennellii*, *L. chmielewskii* como *S. chmielewskii*, *L. parviflorum* como *S. neorickii*, *L. peruvianum* como *S. peruvianum* e *L. chilense* como *S. chilense* (Peralta et al., 2005).

O genoma do tomateiro quase sempre apresenta cópia única em um único loco ou número baixo de cópias com pouco DNA repetitivo, e que está disperso ao longo do genoma (Bernatzkey & Tanksley, 1986; Zamir & Tanksley, 1988). Compreende aproximadamente 950 MB, sendo a maior parte, 75% correspondem à heterocromatina (Shibata, 2005).

2.2 Importância econômica e nutricional

A produção do tomateiro é crescente, superando a casa das 80 milhões de toneladas nos últimos anos (FAO, 2006). O Brasil ocupa a oitava colocação entre os principais produtores de tomate no mundo e a primeira colocação entre os produtores da América Latina, respondendo por cerca de 3% do mercado mundial, mas apresenta uma tendência de crescimento, evoluindo em média anual à taxa de 3,08%. Os maiores volumes de produção ocorrem na China,

Estados Unidos, Turquia e Índia. Dentre os maiores produtores, os Estados Unidos foram o único país a apresentar taxa de crescimento negativo para a produção ao longo do período estudado (Reis et al, 2005).

O mercado agrícola do tomateiro está em expansão (3,11% de crescimento ao ano), sendo a China o país que mais prosperou (9,14%), seguida do Estados Unidos (4,38%) e da Turquia (4,17%). O crescimento da produção turca de tomateiro já compete com a posição americana, de segunda maior produção (FAO, 2006).

Em relação à análise econômica do mercado mundial em 2003, sua abrangência foi da ordem de US\$ 4,2 bilhões. Dos cinco maiores produtores, a Espanha é o único país na lista dos maiores exportadores (US\$ 875 milhões). A Holanda e a Bélgica, com mercado triangular, foram responsáveis por 30% do mercado mundial. Destaque ainda para o México, com exportação de US\$ 868 milhões. O Brasil é um mercado marginal com exportação de US\$ 668 mil, representando apenas 0,01% do mercado mundial. Os Estados Unidos, com US\$ 1,1 bilhão, foram o país que mais comprou tomate no mundo em 2003. A importação total movimentou US\$ 4,2 bilhões. Outros grandes importadores, Alemanha, Inglaterra e França, juntos, movimentaram quase 40% do mercado mundial (Reis et al., 2005).

No Brasil, o tomate para mesa ocupa mais de 40 mil hectares, distribuídos, principalmente, nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco, Santa Catarina e Espírito Santo. A produção de tomate para processamento industrial concentra-se, principalmente nos Estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, onde são cultivados em torno de 14 mil hectares. No Estado de Goiás, cultivam-se aproximadamente 60% da área nacional de tomate para processamento e produzem 65% da safra nacional (IBGE, 2005).

O Estado do Rio de Janeiro, em 2005, obteve uma produção em torno de 204 mil toneladas, com uma área plantada de aproximadamente três mil hectares e com rendimento médio de 67 t.ha^{-1} , acima da média nacional (IBGE, 2005). Os principais municípios produtores de tomate do Estado do Rio de Janeiro encontram-se na região serrana, em Pati do Alferes, São José de Ubá e Miguel Pereira (Ceasa, 2007).

Contudo, a cultura do tomateiro é considerada de alto risco devido às flutuações de preço e também de produtividade, geralmente provocadas por fatores como alterações climáticas e ocorrência de doenças e pragas.

Em relação a características nutricionais, o tomate tanto *in natura* quanto processado é uma importante fonte de vitaminas, sendo um fruto de grande valor nutricional (Canene-Adams et al., 2005). Os tomates têm sido apontados como uma importante fonte de antioxidantes, tais como licopeno, compostos fenólicos e vitamina C, na dieta humana (Takeota et al., 2001).

O licopeno é um dos antioxidantes mais eficientes, podendo doar elétrons para neutralizar as moléculas de oxigênio singlete e outras moléculas oxidantes antes que elas prejudiquem as células (Rao e Agawal, 2000). Estudos médicos têm confirmado a redução do risco de desenvolvimento de câncer de próstata e ovário, bem como uma menor incidência de doenças degenerativas crônicas e cardiovasculares a partir da utilização de dietas ricas em licopeno (Rao, 2002).

De acordo com George et al. (2004), o consumo de tomate e seus derivados, tais como sucos, sopas e molhos, tem sido considerado como indicador nutricional de bons hábitos alimentares e estilo de vida saudável.

2.3 Cultivares

Os pesquisadores têm desenvolvido cultivares com resistência genética a uma gama de doenças e anomalias, além da incorporação da característica "longa vida", introduzindo genes que retardam por mais de 15 dias o apodrecimento dos frutos depois de colhidos. Podem-se também salientar as exigências cada vez maiores dos consumidores por tomates diferenciados, em termos de tamanho, cor, vida de prateleira, formato, sabor e qualidade do produto, associados a uma menor quantidade de agroquímicos utilizados em seu cultivo. Há uma crescente pressão em favor do rastreamento dos produtos por parte das grandes redes de varejo, de modo a garantir maior segurança aos consumidores (Borguini, 2002).

As dezenas de cultivares comerciais de tomate são identificadas conforme as características do fruto, número de lóculos e peso médio. No entanto, para escolher a cultivar dentro do grupo, levam-se em consideração as características das plantas em relação à adaptação a condições do cultivo, produtividade, clima,

solo e manejo (Embrapa, 2003). As cultivares plantadas podem ser classificadas em cinco grupos.

O grupo Santa Cruz original foi o produto de cruzamento natural entre as variedades Rei Humberto, de formato comprido, e Chacareiro (Redondo japonês), em Suzano-SP. Tal fato, memorável para a tomaticultura nacional, ocorreu num tomatal plantado pelo Sr. Hanashiro, entre os anos de 1935 e 1940. As plantas desse grupo são de hábito de crescimento indeterminado, conduzido e tutorado e têm uma maturação tardia. Possuem frutos de formato arredondado, alongado ou oval, com peso médio variando de 70 a 110 g. Entretanto, esse tomate apresenta sabor inferior se comparado aos dos outros grupos. Um exemplo de cultivar característica desse grupo é a 'Santa Clara'. Ao longo da década de 90, houve a introdução de híbridos com a característica 'longa vida', como 'Débora Max', 'Débora Plus', 'Santa Clara VF2000', 'Bruna VF', 'Ataque', 'Avansus', 'Densus', 'Bônus', além de outros (Filgueira, 2000).

Um outro grupo é conhecido como tomate tipo Caqui, Maçã ou Salada. As plantas possuem hábito de crescimento indeterminado, apropriadas para tutoramento, contudo, há cultivares de hábito determinado, com altura mediana. Os frutos possuem um formato arredondado ou achatado, com peso médio de 200 a 250 g, são delicados e saborosos, o que os torna muito apreciados para consumo *in natura*. Neste tipo de grupo, são mais comuns anomalias fisiológicas graves, como lóculo aberto e as rachaduras. Os híbridos atuais possuem maior resistência a tais anomalias bem como a algumas doenças fúngicas. Como exemplo, há as cultivares Híbrido Carmen, EF-50, Híbrido Diana, Híbrido Monalisa, Híbrido Grandeur e Híbrido Ogata Fukuju (Plantar, 1991; Filgueira, 2000).

O grupo cereja é caracterizado por plantas de hábito crescimento indeterminado, conduzido e tutorado. Os frutos possuem tamanho reduzido, pesam de 15 a 25 g e têm uma coloração vermelha brilhante ou amarela ouro. Seu aspecto lembra uma cereja e são bastante empregados na ornamentação de saladas. Dentre as cultivares plantadas, apresentam-se 'cereja rubi' (Embrapa, 1993), 'Cocktail Red Vine', 'Alongado Red Sugar', 'Renata DRC', 'Sindy DRC' (Sakama, 2007).

O grupo italiano é o mais recente entre as cultivares para mesa. São de hábito de crescimento indeterminado, os frutos são tipicamente alongados, com

comprimento de 1,5 a 2,0 vezes o seu diâmetro, com coloração vermelha, a qual é bastante apreciada no preparo de molhos bem como na ornamentação de iguarias. Como exemplo, temos os híbridos 'Heinz 9780', 'katia' e 'Andrea' (Filgueira, 2000).

O grupo agroindustrial consiste de tomates rasteiros, com haste principal e inflorescência terminal e ramificado, de porte pequeno e compacto. Apresenta hábito de crescimento determinado, não exigindo tutoramento e tratos culturais trabalhosos. A planta apresenta os frutos com algumas características, como coloração vermelha intensa, alto teor de sólido solúvel total, alto teor adequado de ácido cítrico e a maior parte dos frutos deve amadurecer simultaneamente. As cultivares desse grupo podem apresentar dois formatos básicos: o piriforme, que é o das cultivares mais antigas, como 'Roma VF', e formato similar ao do grupo Santa Cruz, como a das cultivares IPA-5, IPA-6, Saladinha Plus e Híbrido Saladinha (Filgueira, 2000).

Outras cultivares de tomate que estão ganhando espaço na preferência de consumidores são os híbridos laranja e amarela. Os frutos pesam em média 75 g (SAKAMA, 2007; FILGUEIRA, 2003) e podem ser de forma arredondada, oblonga ou periforme (EMBRAPA, 1993). São representados pelas cultivares híbrido Laranja 'Debie', Amarelo 'Gold Bross' e Penca 'Red Taste' (Sakama, 2007)

2.4 Conservação, caracterização e avaliação de germoplasma

Bueno et al. (2001) definem como germoplasma o conjunto de genes representados por todos os alelos de uma espécie e, em melhoramento de plantas, consideram também os genes das espécies afins. Em termos gerais, a caracterização pode ser morfológica, reprodutiva, agronômica, bioquímica, citogenética e molecular (Valois et al., 2001).

Uma coleção de germoplasma tem como princípio adquirir, conservar, caracterizar e avaliar germoplasma, permitindo intercâmbio e, principalmente, um uso mais dinâmico dos acessos da coleção (Sudré, 2003). A identificação botânica, a elaboração dos cadastros de acessos por espécie, as caracterizações e avaliações contribuem para maior conhecimento dos acessos, viabilizando a detecção de possíveis acessos a serem utilizados em programas de melhoramento de plantas e de possíveis duplicadas nos bancos de germoplasma (Valls, 1988). A presença de acessos duplicados em coleções de germoplasma

tem sido apontada como um dos principais problemas para a conservação de bancos de germoplasma (Van Hintum e Vissen, 1995).

Segundo Valois et al. (2001), existem no Brasil cerca de 180 bancos de germoplasma, totalizando mais de 200 mil acessos de diferentes espécies vegetais, como grãos, frutíferas, florestais, hortaliças, entre outras. A grande parte desses bancos de germoplasma vegetal está integrada ao principal programa de conservação do país, conhecido como “Conservação e Uso de Recursos Genéticos”, coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Entretanto, os acessos de germoplasma conservados são pouco utilizados devido a uma série de dificuldades e deficiências, como por exemplo, falta de documentação, descrição adequada e avaliação das coleções, e conseqüentemente, ausência de informações relevantes para os melhoristas, o que dificulta a identificação de genes potencialmente úteis (Gepts, 2006). Neste contexto, surgem os programas de pré-melhoramento que referem-se às atividades realizadas visando a conhecer o material genético antes de introduzi-lo em um programa de melhoramento (Pereira e Pereira, 2006).

A caracterização morfoagronômica utilizando genes associados a caracteres morfológicos é a ferramenta mais utilizada na identificação de plantas por ser simples e prática. Esse tipo de caracterização baseia-se em dados botânicos de alta herdabilidade, facilmente detectáveis ou mensuráveis, e que sofrem pouca influência ambiental. Nesse caso, os aspectos morfológicos e fenológicos são observados de forma sistemática nos acessos utilizando-se lista de descritores (Valls, 1988).

Os descritores são características utilizadas para descrever um acesso. A organização *Bioversity International* (antigo *International Plant Genetic Resources Institute* -IPGRI) é responsável pela coordenação da padronização do sistema de caracterização, o qual propõe descritores de passaporte, de manejo, de local e meio ambiente, de caracterização e de avaliação. Para estudos do tomateiro, existe uma lista de descritores estabelecida destacando os de caracterização, que fornecem informações quantitativas e qualitativas que auxiliam em uma melhor discriminação entre os acessos (IPGRI, 1996). Para o tomate, existe uma lista de descritores elaboradas pela Bioversity International (Descriptors for Tomato -

Lycopersicon spp.) com 203 descritores, que exclui os de suscetibilidade a estresse biótico.

Sudré et al. (2006) tiveram como objetivo avaliar a diversidade genética entre 59 acessos de *Capsicum* spp. e verificar a eficiência da utilização de medidas de dissimilaridade e da discriminação de genótipos em espécies, baseando-se em 13 variáveis multicategóricas. Os descritores utilizados conforme os critérios do IPGRI foram: cor do caule, da antera e da corola; número de flores por axila; posição da flor; hábito de crescimento; cor do fruto imaturo e maduro; forma e epiderme do fruto; cor da semente e da folha cotiledonar; número de lóculos e constrição anular do cálice e do fruto. As análises de agrupamento feitas seguiram os métodos de Tocher e Hierárquico do Vizinho Mais Próximo; Projeção das Distâncias no Plano e Análise Discriminante de Anderson, as quais, foram concordantes e eficazes em agrupar os acessos. O método de Tocher diferenciou as espécies de *C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. chinense* e *C. pubescens*, confirmando que os descritores qualitativos são essenciais para a caracterização de *Capsicum* spp.

Karasawa (2005) caracterizou 76 acessos de *L. esculentum*, que compõem o banco de germoplasma da UENF em dois ambientes (2003 e 2004) e identificou possíveis fontes de resistência à mancha bacteriana. No ano de 2003, a autora utilizou 29 descritores propostos pelo IPGRI (1996), sendo 17 qualitativos e 12 quantitativos e, no ano de 2004, utilizou 30 descritores, sendo 19 qualitativos e 11 quantitativos. Com base nos dados obtidos, foi possível medir a divergência genética por meio dos métodos multivariados, mostrando que os acessos possuem variabilidade genética. Quanto à avaliação da resistência, dois acessos de tomateiro (acessos UENF 175 e UENF 222) apresentaram reação de hipersensibilidade, mostrando-se resistentes à doença.

Joshi e Kohli (2003) caracterizaram 73 acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) usando descritores quantitativos e qualitativos por meio da análise da distância euclidiana. O valor máximo do coeficiente de variação (53,20%) foi registrado para vida de prateleira do fruto e o mínimo (9,20%), por dias até a primeira colheita. Os genótipos foram agrupados em 15 grupos, indicando diversidade entre eles.

Marim et al. (2002), estudando a divergência genética a partir de características vegetativas e de produção, em 34 acessos de tomateiro, pelo

método de agrupamento de Tocher, verificaram a formação de 12 grupos, com uma taxa de erro de 2,94% obtida pela análise discriminante de Anderson, ou seja, das 34 classificações, apenas uma estava incorreta.

Contudo, os caracteres morfológicos constituem-se em uma base limitada, por representarem uma medida indireta da composição genética do material. Para complementar as informações e aumentar a base de conhecimento genético sobre os acessos de um banco, os marcadores moleculares têm sido um instrumento de auxílio na caracterização dos bancos de germoplasma, pois revelam diferenças genéticas com maior precisão e sem o obscurecimento causado pelo efeito ambiental, oferecendo vantagens em termos de discriminação, confiabilidade e rapidez (Binneck et al., 2002). No entanto, a caracterização morfológica não pode ser substituída por nenhuma das técnicas moleculares. Os resultados de caracterização molecular e bioquímica devem ser considerados como complementares a caracterização morfológica (Freitas e Bered, 2003).

2.5 Marcadores moleculares

Segundo Milach (1998), os marcadores são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Já Ferreira e Grattapaglia (1998) definem como marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como por exemplo a isoenzima, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

Diversas técnicas de marcadores moleculares estão disponíveis atualmente para detecção de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcas moleculares, cobrindo praticamente todo o genoma da espécie em estudo.

Os estudos com marcadores moleculares trazem contribuições significativas para compreensão da diversidade genética (Spooner et al., 2005). O benefício principal de usar marcadores moleculares é que estes são bons indicadores da distância genética entre acessos por causa da sua neutralidade seletiva. Assim, os marcadores moleculares são usados para identificar centros de domesticação como, por exemplo, em milho (Matsuoka et al., 2002), feijão comum (Gepts, 1988) e trigo (Heun et al., 1997). Os marcadores moleculares

também são usados para identificar raças ecogeográficas dentro dos complexos gênicos domésticos ou silvestres das espécies cultivadas (Liviero et al., 2002; Yu et al., 2003). Além disso, os marcadores moleculares estão sendo usados para auxiliar o curador nas atividades de manutenção, caracterização e avaliação de germoplasma (Rao e Riley, 1994).

A perspectiva de uso de marcadores genéticos em larga escala surgiu no cenário científico nas décadas de 60 e 70 com o desenvolvimento de marcadores tais como isoenzimas, proteínas totais e proteínas específicas, que são de certa forma, indicadores diretos da variação existente dentro do DNA. Com o surgimento das novas técnicas moleculares, aumentaram os diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). As novas técnicas podem ser separadas em duas grandes categorias: a) métodos baseados em análises de restrição. b) métodos baseados na amplificação do DNA.

Na primeira categoria, inclui-se a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA ("Restriction Fragment Length Polymorphism" - RFLP). Esta técnica requer grandes quantidades de DNA, e as análises são, em geral, demoradas e trabalhosas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A outra categoria de análises utiliza a reação de polimerização em cadeia (PCR) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987). Esta categoria revolucionou os métodos tradicionais de obtenção de marcadores moleculares em nível de DNA. Esta técnica consiste na amplificação *in vitro* de fragmento de DNA, utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores, que são complementares às extremidades do segmento a ser amplificado. Cada reação envolve três etapas: desnaturação do DNA molde através de aquecimento; hibridização dos iniciadores no DNA molde, e síntese do DNA pela ação da DNA polimerase. Este ciclo é repetido várias vezes, havendo amplificação do DNA alvo em progressão geométrica. Exemplos destas técnicas são o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), o SSR (microssatélite ou Simple Sequence Repeat), e o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

2.5.1 Marcadores moleculares – RAPD

O grande impulso na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu na década de 90 ao serem utilizados iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a região de amplificação, eliminando assim a

necessidade do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada. A técnica RAPD originou uma grande expansão da análise de polimorfismo molecular ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os idealizadores da técnica batizaram-na com o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990), que é a denominação mais utilizada, e AP-PCR (Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction) (Welsh e McClelland, 1990; Caixeta et al. 2006).

Segundo Caixeta et al. (2006), as vantagens dos marcadores RAPD são simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo baixo comparado com outras técnicas moleculares e aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. Requerem pequenas quantidades de DNA comparados com outras técnicas e não utilizam marcação radioativa, podem ser utilizados para a identificação rápida e eficiente de muitos polimorfismos e, como tais, apresentam enorme potencial na identificação de cultivares.

Contudo, os marcadores moleculares RAPD ainda são criticados pela baixa reprodutibilidade entre os laboratórios e até mesmo dentro do mesmo laboratório (Freitas e Bered, 2003). Sendo assim, a técnica requer certa experiência do pesquisador com procedimentos moleculares, como, por exemplo, cuidados no preparo de soluções estoques e componentes da reação, na manipulação de micropipetas, reagentes e enzimas, e programação de termocicladores (Caixeta et al. 2006). Portanto, em virtude da técnica de RAPD ser sensível a pequenas modificações na concentração dos componentes de reação e na programação do termociclador, é recomendável a otimização cuidadosa das condições experimentais para que os resultados sejam mais confiáveis e reproduzíveis (Caixeta et al. 2006).

Mota et al. (2004) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a diversidade genética entre doze cultivares de alho por meio de marcadores moleculares RAPD. Dos doze genótipos avaliados, seis eram cultivares nobres e seis cultivares seminobres. Oitenta iniciadores de RAPD foram utilizados e estes amplificaram 279 fragmentos de DNA. Os resultados das análises mostraram a formação de dois grupos, sendo o primeiro grupo constituído pelas cultivares nobres e o segundo, pelas cultivares seminobres. As cultivares nobres e seminobres apresentaram 57,1% e 54,2% de similaridade, respectivamente.

Neste trabalho, os resultados gerados foram suficientes para concluir que o marcador molecular RAPD foi eficiente em separar dois grupos de cultivares de *Allium sativum*.

Costa et al. (2006) estimaram a diversidade genética existente entre 75 acessos de *Capsicum* por meio de marcadores RAPD. Os resultados mostraram que existe diversidade genética entre e dentro das espécies e que os marcadores RAPD foram efetivos em quantificá-la, possibilitando o agrupamento dos acessos em nível de espécie, concordante com a classificação botânica.

Tanaka et al. (2007) estudaram a caracterização molecular de melões (*Cucumis melo* L.) provenientes do Sul e Leste da Ásia e a origem dos grupos *Conomon* var. *makuwa* e var. *conomon* através de marcadores RAPD. Foram analisadas 122 plantas provenientes de 69 acessos provenientes da Índia, Myanmar, China, Coreia e Japão. Estes pesquisadores obtiveram a formação de 2 grupos. O grupo 1 foi formado por 12 subgrupos de acessos provenientes da Índia e Myanmar e o grupo 2 por 5 subgrupos de acessos do grupo *Conomon* var. *makuwa* e var. *conomon* provenientes do Leste da Ásia. O grupo 1 pôde também ser subdividido em 2 subgrupos, sendo formados por acessos que possuem sementes do tipo pequena (< 9.0mm) e acessos que possuem sementes do tipo grande (≥ 9.0mm).

Diversos trabalhos têm sido relatados para caracterização de tomate via marcador RAPD. Villand et al. (1998) tiveram como objetivo estudar e comparar a magnitude e estrutura da variação genética entre 96 acessos de tomate de regiões do Velho e Novo Mundo colecionados no banco de germoplasma do “Asian Vegetable Research and Development Center” (AVRDC), utilizando marcadores do tipo RAPD. Foram obtidas 98 marcas polimórficas e, posteriormente, calculadas as distâncias genéticas entre os acessos. Os resultados indicaram que estes acessos apresentam certa singularidade. Além disso, os acessos provenientes do Equador, Peru e Chile tiveram uma magnitude maior de diversidade. Comparando o *Lycopersicon esculentum* com o *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*, observou-se que eles são distintos, mas possuem níveis semelhantes de diversidade.

Carelli et al. (2006) utilizaram marcadores RAPD para estimar a variabilidade genética em 35 acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Com uso de 20 iniciadores, foi obtido um total de 257 bandas, sendo 78,6%

bandas polimórficas. A distância genética entre os acessos foi calculada e um dendrograma foi construído, mostrando o relacionamento genético. Apesar da baixa variabilidade encontrada (67,8% de média de distância genética), foram identificados sete grupos. A porcentagem de distribuição dos marcadores RAPD mostrou que muitos destes marcadores são amplificados com uma frequência maior ou menor, e a frequência de alelos raros é similar nos dois grupos, acessos crioulos e acessos comerciais. A maioria dos acessos crioulos (78%) encontra-se em um mesmo grupo, enquanto que os acessos comerciais foram distribuídos dentro de todos os grupos. A análise discriminante permitiu separar cultivares comerciais das cultivares crioulas, bem como diferenciar os mesmos pela morfologia do fruto.

2.6 Diversidade genética

A diversidade genética expressa a diferença entre as frequências alélicas das populações (Falconer, 1987). Pode também ser definida como a distância entre as populações, indivíduos ou organismos, com base em uma série de características de aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999).

A maioria das espécies exploradas agronomicamente teve sua diversidade genética reduzida dramaticamente em consequência da domesticação e dos processos de seleção e melhoramento de plantas. A diversidade genética é considerada mais baixa em cultivares modernas de espécies autógamas devido ao seu sistema de fecundação e também da sua domesticação fora do centro de origem, onde um número limitado de sementes (ou acessos) foram levadas pelos exploradores, que hoje servem como a base genética das cultivares modernas de hoje (Saavedra e Spoor, 2002).

Além disso, muitos genótipos foram perdidos pela substituição por novas cultivares ocasionando, muitas vezes, o desaparecimento de variedades locais. Em geral, essas novas cultivares apresentam base genética muito estreita, isto é, são muito aparentadas entre si, e a predominância de um restrito número de genótipos ocupando grandes áreas de plantio tem sido considerada um risco para a agricultura, podendo ocasionar uma erosão genética (Borém e Miranda, 2005). Uma excessiva dependência destas novas variedades, contudo, poderá causar uma catástrofe futura, se o clima mudar, se ocorrer escassez de energia e de

substâncias químicas necessárias para a manutenção destas variedades, ou se novas doenças e pragas forem atacar uma variedade vulnerável (Odum, 1988).

O banco de germoplasma é de fundamental importância para manutenção da diversidade genética. As espécies silvestres, as variedades locais e as cultivares obsoletas fornecem genes que conferem adaptação a estresses ambientais, além de possuírem genes que conferem resistência a inúmeras doenças e pragas (Freitas e Bered, 2003). A busca de resistência ou tolerância genética aos estresses bióticos e abióticos pode diminuir o uso dos muitos produtos de contaminação e de poluição usados na agricultura moderna (Gepts, 2006).

Segundo Tanksley e McCouth (1997) o banco de germoplasma não pode ser visto apenas como fonte de genótipos, mas também como fonte de genes, uma vez que grande parte dos genes de interesse agrônômico já se encontra nas cultivares modernas. Entretanto, genes relacionados a características como resistência a pragas e doenças, adaptação a estresses abióticos e características nutricionais podem estar contidos em coleções de germoplasma.

Em programas de melhoramento, a importância do conhecimento da diversidade genética está no fato de que cruzamentos que envolvam genitores geneticamente divergentes são os mais eficientes em produzir híbridos com maior efeito heterótico na progênie e maior variabilidade genética nas gerações segregantes (Falconer, 1987).

Essa diversidade pode ser avaliada a partir de uma série de marcadores, que podem ser morfológicos, fisiológicos, citológicos, protéicos, bioquímicos e moleculares (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999). As informações múltiplas de cada acesso ou cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade em relação ao conjunto de acessos (Cruz e Carneiro, 2003).

Diversos coeficientes de dissimilaridade têm sido propostos para expressar a distância entre genótipos (Cruz e Regazzi, 2001). Alguns desses coeficientes baseiam-se nas frequências alélicas estimadas, enquanto outros utilizam variáveis binárias, sendo ausência (0) ou presença (1) da marca. As distâncias genéticas são determinadas pelos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade e são apresentadas na forma de matriz de dissimilaridade.

O procedimento de avaliação da diversidade genética entre acessos a partir de dados binários permite que sejam utilizados diversos coeficientes de similaridade, entre eles os mais utilizados são os coeficientes de coincidência simples, Nei e Li e Jaccard (Cruz e Carneiro, 2003). O quadrado da distância euclidiana média, embora idêntico ao coeficiente de coincidência, apresenta a desvantagem de considerar o fator de similaridade de coincidência do tipo (0-0), categoria ausente nos dois indivíduos. Em contrapartida, nos índices de Jaccard, Nei e Li, é excluído este tipo de coincidência e considerada apenas a coincidência do tipo (1-1), presença da categoria em ambos os indivíduos.

2.6.1 Agrupamento

Quando o número de genótipos é relativamente alto, torna-se praticamente inviável o reconhecimento dos grupos que apresentam semelhanças, a partir da matriz de dissimilaridade. Contudo, com uso de técnicas de agrupamento, podem-se classificar os genótipos em vários grupos de forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos, seguindo o critério de similaridade ou de dissimilaridade (Cruz e Carneiro, 2003).

Segundo Cruz e Regazzi (2001), existem vários métodos de agrupamento, porém no melhoramento os mais usuais são classificados em dois tipos: *i*) método hierárquico que tem como objetivo agrupar os genótipos por um processo que se repete em vários níveis até que se estabeleça um dendrograma; e *ii*) métodos de otimização, em que os genótipos são incluídos no mesmo grupo com o objetivo de estabelecer máxima ou mínima participação que otimize alguma medida predefinida.

O método hierárquico das medidas da dissimilaridade ponderada (UPGMA) é o mais utilizado em diversidade, tendo vantagem sobre os demais métodos por considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os genótipos (Cruz e Carneiro, 2003).

Entre os vários métodos de agrupamento de otimização, o mais utilizado no melhoramento genético é o método de Tocher (Rao, 1952). Este método consiste a partir da obtenção da matriz de dissimilaridade, à identificação do par dos indivíduos mais similares, no qual, esses indivíduos formarão o grupo inicial. Posteriormente, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos,

adotando-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que a distância média entre quaisquer grupos (Cruz e Carneiro, 2003). Esse método tem como vantagem principal a fácil interpretação dos grupos formados.

2.6.2 Bootstrap

Essa técnica foi introduzida por Bradley Efron (1979) e, desde então, tem merecido profundo estudo por parte dos estatísticos, não só na parte teórica como também na aplicada. O *bootstrap* tem uso bastante difundido para testar a significância das estatísticas calculadas por meio de dados moleculares, sendo baseado na reamostragem de dados reais para revelar algum padrão neles existente. A principal virtude desse método é produzir tendências e erros padrões de forma automática e fornecer intervalos de confiança para as estatísticas calculadas (Pequeno et al., 2003).

Felsenstein (1985) utilizou o método de *bootstrap* para estimar os limites de confiança das ramificações internas das árvores filogenéticas. Segundo este autor, a estatística de interesse é a presença ou a ausência de um nó no dendrograma, baseado na reamostragem, e as observações são os vetores de frequência alélicas das diferentes espécies.

Segundo Russo et al. (2001) a análise estatística de bootstrap tem sido bastante utilizada para estimar a confiança de dendrogramas de árvores e também para testar a significância de outras análises estatísticas (erro padrão, coeficiente de variação e estimativas de parâmetros genéticos populacionais).

Essa técnica inicia-se com reamostragem dos dados, sendo que, em cada reamostragem, o número total de dados amostrados mantém-se constante e uma árvore réplica é construída. Ao final do procedimento, o teste compara a árvore original com as árvores réplicas formadas. O resultado obtido é dado em porcentagem, que consiste na porcentagem de vezes que o mesmo agrupamento original foi recuperado nas árvores réplicas (Russo et al. 2001).

Diversos trabalhos com marcadores RAPD tiveram esse método como princípio, ente os quais pode-se salientar o de Oliveira et al. (2002), que tiveram como objetivo estudar a diversidade genética de uma população de 94 híbridos de tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) com laranja 'Pêra' (*C. sinensis* (L.) Osbeck), obtidos por polinização controlada. Na análise de *bootstrap* obtiveram

baixa consistência dos agrupamentos. Segundo estes autores, essa informação demonstra que a constituição genética dos híbridos foi originada pela segregação independente das marcas RAPD, e foi quebrado o efeito de ligação em função do tamanho amostral em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Germoplasma

O banco de germoplasma da UENF possui cerca de 200 acessos de *Lycopersicon esculentum* Mill., sendo que 78 acessos desse banco foram utilizados neste trabalho (Tabela 1). Sessenta e quatro acessos daquele total foram caracterizados com base em 20 descritores morfoagronômicos e avaliados quanto à resistência à mancha bacteriana por Karasawa (2005).

Todos os acessos foram gentilmente doados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro – Rio), Estação Experimental de Seropédica. Esses acessos são, em maioria, variedades tradicionais cultivadas amplamente em diversas regiões do mundo e que foram progressivamente sendo substituídas por cultivares modernas, como é o caso das variedades Tanzimech e Heinz 14451 VF.

Para correlacionar os dados moleculares obtidos neste trabalho com os morfoagronômicos obtidos por Bento et al. (2007) foram selecionados cinco descritores qualitativos de importância agrônômica considerável: hábito de crescimento da planta, tipo de folha, número de lóculos por fruto, cor e forma do fruto.

Tabela 1 – Lista dos 78 acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) com seus respectivos nomes comuns e características da planta e do fruto, com base em cinco descritores qualitativos (hábito de crescimento, tipo de folha, número de lóculos, cor do fruto e formato do fruto). Campos dos Goytacazes – RJ, 2007

Acesso	N ^o UENF	Nome comum	Característica da planta		Característica do fruto		
			Hábito de crescimento*	Tipo de folha**	N ^o lóculos	Cor	Forma
1	104		I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
2	140	S.C. YOKOTA	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
3	154	Clinton	I	1	3	Vermelho	Globular
4	155	Indiana - 73	I	1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
5	156	Nuova super roma	I	1	2	Vermelho	Redondo
6	157	Tanzimech	II	1	4	Vermelho	Globular
7	158	Todo royo	I	1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
8	159	UC-105J	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
9	160	OSU-460-1	III	1	2	Vermelho	Redondo
10	161	VR sugar	I	1	2	Vermelho	Redondo
11	162	Early chabham	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
12	163	Pearson	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
13	165	VR red cloud	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
14	166	Starfine	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
15	167	Sweft	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
16	168	WV-334-1-2-1	I	1	2	Vermelho	Redondo
17	169	PI-280597	I	1	2	Vermelho	Globular
18	170	Hand warf	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
19	171	C-52	I	1	2	Vermelho	Redondo
20	172	WV-252-1-1-1	I	1	2	Vermelho	Globular
21	173	Hoytlille	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
22	174	Hotset	I	1	3	Vermelho	Globular
23	175	1260-1-1	I	1	2	Vermelho	Globular

Tabela 1, Cont.;

Acesso	Nº UENF	Nome comum	Característica da planta		Característica do fruto		
			Hábito de crescimento*	Tipo de folha**	Nº lóculos	Cor	Forma
24	176	PI-280060	I	1	2	Vermelho	Globular
25	177	Bould mountain	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
26	178	Early pak	I	1	4	Amarelo	Globular
27	179	Red Jacket	I	1	2	Vermelho	Globular
28	180	VR superior	I	1	2	Vermelho	Redondo
29	182	ES-58	I	1	5	Vermelho	Levemente achatado
30	183	Paul Bynuan	I	1	3	Vermelho	Redondo
31	185	WV-139-1-2-1-1-1	I	1	3	Vermelho	Levemente achatado
32	186	VR Wisconsin	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
33	187	PI-95588 CGS	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
34	188	Heinz 14451 VF	I	1	2	Vermelho	Formato de coração
35	189	VF-14	I	1	2	Vermelho	Globular
36	190	PI-262910 CGS	I	1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
37	193	Heinz 2439	I	1	3	Vermelho	Levemente achatado
38	194	Acano	I	1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
39	195	Valians	I	1	3	Vermelho	Levemente achatado
40	196	Bongned	I	1	5	Vermelho	Levemente achatado
41	197	Sundwarf 4	I	1	4	Vermelho	Globular
42	199	Utah 4	I	1	2	Vermelho	Levemente achatado
43	200	Improved Garden	I	1	3	Vermelho	Levemente achatado
44	201	-	I	1	2	Vermelho	Formato de pêra
45	202	KC 46j2j2	I	1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
46	204	Cornell 61-56	II	1	3	Vermelho	Levemente achatado
47	205	Porte	I	1	3	Vermelho	Redondo
48	206	PI-255829 CGS	I	1	2	Vermelho	Redondo

Tabela 1, Cont.;

Acesso	Nº UENF	Nome comum	Característica da planta		Característica do fruto		
			Hábito de crescimento*	Tipo de folha**	Nº lóculos	Cor	Forma
49	208	V 641		1	5	Vermelho	Levemente achatado
50	209	Short Stem Boone		2	2	Vermelho	Levemente achatado
51	210	C-49-59		1	2	Vermelho	Globular
52	210B	C-49-59		1	2	Vermelho	Formato de Pêra
53	211	Cornell 54-17		1	2	Vermelho	Globular
54	212	Roma		1	4	Vermelho	Levemente achatado
55	213	Persimmon type		1	2	Vermelho	Redondo
56	215	PI-255839		1	2	Vermelho	Levemente achatado
57	217	WV-289-1-4-1		1	4	Vermelho	Globular
58	218	Manelee		1	2	Vermelho	Levemente achatado
59	219	Red top		1	2	Vermelho	Levemente achatado
60	221	WV rutgers		1	2	Vermelho	Levemente achatado
61	222	ACC pigment line		2	2	Vermelho	Globular
62	223	PI-105342		1	3	Vermelho	Levemente achatado
63	224	Manzaha		2	3	Vermelho	Levemente achatado
64	225	Vr pitnic hard		1	3	Vermelho	Levemente achatado
65	216	Terusend		1	2	Vermelho	Formado de coração
66	1662	C 38 D Novo		1	4	Vermelho	Globular
67	1663	Santa Barbara		1	4	Vermelho	Cilíndrico alongado
68	1664	Seco		1	5	Vermelho	Globular
69	1665	Duradouro Vermelho		1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
70	1666	Roqueso		1	5	Vermelho	Globular
71	1667	Cereja FM		1	2	Vermelho	Redondo
72	1668	Comprido Vermelho		1	2	Vermelho	Cilíndrico Alongado
73	1669	Pêra		1	2	Amarelo	Formato de pêra

Tabela 1, Cont.;

Acesso	Nº UENF	Nome comum	Característica da planta		Característica do fruto		
			Hábito de crescimento*	Tipo de folha**	Nº lóculos	Cor	Forma
74	1700	Dedo de Dama	I	1	2	Vermelho	Cilíndrico alongado
75	1701	Cereja	I	1	2	Vermelho	Redondo
76	1702	Gauchinho	I	1	4	Amarelo	Globular
77	1703	Comprido Amarelo	I	1	4	Amarelo	Cilíndrico alongado
78	1704	Pomodoro	I	1	4	Amarelo	Globular

* I – indeterminado, II – semi-determinado, III - indeterminado ** (1) folha do tipo normal; (2) folha do tipo batata.

3.2 Condições de cultivo

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), uma área experimental do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Foram plantadas cerca de 30 sementes de cada acesso em bandejas de isopor de 128 células, contendo substrato Plantimax[®].

Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para potes plásticos com capacidade para 0,5 L, contendo substrato tratado. Aos 35 dias, amostras de 3,0 g de folhas jovens foram coletadas por acesso para a análise molecular.

3.3 Análise molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF, conforme as etapas descritas a seguir.

3.3.1. Preparo das amostras

Folhas jovens dos diversos acessos foram colhidas em amostras compostas, compreendendo cerca de 10 plantas/acesso. As folhas correspondentes a cada acesso foram rapidamente reunidas, enroladas em papel alumínio, identificadas e imediatamente mergulhadas em N₂ líquido para que não ocorresse a degradação do DNA. Uma vez no laboratório, este material foi acondicionado em ultrafreezer a uma temperatura de -86 °C. Posteriormente, essas folhas foram maceradas em N₂ líquido e acondicionadas em tubos de 15 ml com tampa, devidamente identificados, em ultrafreezer.

3.3.2. Extração do DNA

Cerca de 300 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de 2,0 ml e imersos em N₂ líquido para a extração de DNA de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com as modificações descritas a seguir.

Foi adicionado a cada tubo 1 ml do tampão de extração pré-aquecido contendo 2% CTAB, 1,4 mol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 1% PVP e 0,2% β- mercaptoetanol. Este material foi incubado a 65 °C por 45 minutos e agitado suavemente a cada 10 minutos. Em seguida, foi

realizada uma centrifugação a 13200 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante (cerca de 800 μl) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado ao qual foi adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) para se efetuar a desproteínização. Este material sofreu suaves inversões durante aproximadamente 10 minutos até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 13200 rpm, por cinco minutos.

O sobrenadante foi recolhido e desproteínizado mais uma vez com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo os ácidos nucléicos precipitados pela adição de dois terços do volume de isopropanol gelado e incubados por 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 13200 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 300 μl etanol a 70%, para retirada de sal presente, e uma vez com 300 μl etanol a 95% (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 13200 rpm durante 10 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, posteriormente o material foi ressuscitado em 300 μl de solução TE (Tris-EDTA – 10 mmol L^{-1} Tris-HCl, 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 8,0) com RNase numa concentração final de 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e incubado em banho-maria a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida adicionaram-se 30 μl de NaCl 5 mol L^{-1} e 220 μl de isopropanol gelado para precipitar o DNA novamente, incubando-se os tubos por 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Logo após, o DNA foi sedimentado por centrifugação, a 13200 rpm, por 10 minutos, e lavado duas vezes com etanol a 70% e uma vez com etanol a 95%. Após seco, o precipitado final foi suspenso em 150 μl de água.

3.3.3. Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada em géis de agarose 0,8% (p/v) submetidos à eletroforese. Alíquotas de DNA de cada amostra foram aplicadas nos poços do gel, com um marcador com concentração conhecida (λ). A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas do DNA (λ). Os géis foram visualizados no equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene) após a coloração com 10 μl de brometo de etídeo (10 mg/ml) diluídos em 100 ml de tampão TEB 1X. Posteriormente, o DNA foi diluído (10 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$) para as reações de RAPD.

3.3.4 Condições de amplificação

Após a quantificação do DNA, as reações de amplificação foram feitas em termociclador modelo *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*), num volume de 20 μL contendo: 10 mmol L^{-1} Tris HCl, pH 8,3; 50 mmol L^{-1} KCl; 2,4 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 100 μM dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,4 μM de iniciador; 20 ng de DNA genômico e 0,75 unidade de Taq DNA polimerase. Foram utilizados microtubos nos quais foram colocados 2 μL de DNA, e, paralelamente, preparado um *mix* contendo todos os demais reagentes nas concentrações mencionados, cada *mix* com um iniciador diferente. Desta solução, foram retirados 18 μL e adicionados aos microtubos, totalizando os 20 μL da reação.

As reações foram submetidas a 45 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 95 °C por 1 min. Cada ciclo consistiu de 1 min a 94 °C, 1 min a 36 °C e 2 min a 72 °C. Ao final de 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (100 V por 90 minutos) em géis de agarose 1,4% (p/v), utilizando o tampão de corrida TAB 1 X. Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV (*Eagle Eye II - Stratagene*).

3.3.5 Seleção de iniciadores

Para evitar o desperdício de tempo, de reagentes e de DNA, foi efetuada uma triagem de iniciadores que fossem capazes de detectar polimorfismo. Para essa verificação, foram selecionados quatro acessos divergentes com base nos dados morfoagronômicos (UENF 155, UENF 166, UENF 196 e UENF 197).

Foram testados 358 iniciadores dos respectivos Kits OPA, OPAA, OPAB, OPAC, OPAD, OPAH, OPB, OPC, OPD, OPE, OPG, OPI, OPK, OPN, OPO, OPT, OPW, OPV e OPX da *Operon Technologies*.

3.4 Análise dos Dados

3.4.1 Análise dos fragmentos amplificados

Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas mais evidentes e consistentes nos 78 indivíduos avaliados. Foi elaborada uma matriz de dados binários em que o número 1 correspondeu à presença da banda, o zero, à

ausência da banda, e, quando não era possível determinar se a banda estava presente ou não em função da não amplificação de um dado acesso para aquele iniciador, foi computado como 2.

Todos os dados foram analisados pelo programa GENES (Cruz, 2006), com exceção do dendrograma, obtido pelo método UPGMA, gerado com auxílio do programa STATISTICA (1995).

3.4.2 Dissimilaridade genética

Após a exclusão das marcas monomórficas da tabela, estimou-se a dissimilaridade genética entre os acessos. Para formação da matriz de dissimilaridade, foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard. Esse coeficiente consiste na comparação do número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas. Meyer (2002). Tal coeficiente é definido pela expressão:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

Onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

a = é o número de bandas presentes nos acessos i, j ;

b = é o número de bandas presentes no acesso i e ausentes no acesso j ;

c = é o número de bandas presentes no acesso j e ausentes no acesso i .

A partir dos dados desta matriz, foram feitas as análises de agrupamento. Para estas análises, foram utilizados os métodos hierárquico de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) e otimização de Tocher.

No método UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto desse método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo e um grupo formado pelos indivíduos i e j são calculados por:

$$d_{(ij)k} = \text{média} \{ d_{ik} + d_{jk} \} = \frac{(d_{ik} + d_{jk})}{2}$$

$d_{(ij)k}$ = distância média entre o grupo ij e o indivíduo k;

d_{ik} = distância entre os indivíduos i e k;

d_{jk} = distância entre os indivíduos j e k.

O método de Tocher segue o critério de inclusão dos indivíduos no mesmo grupo, quando a distância média intragrupo não excede a distância média intergrupo (Cruz, 2006). O valor máximo da distância dentro do grupo (\blacktriangle) pode ser estabelecido arbitrariamente. A inclusão de um indivíduo é aceito quando:

$$\frac{d_{(ij)k}}{n} < \blacktriangle$$

Onde:

$$d_{(ij)k} = d_{ik} + d_{jk}$$

$d_{(ij)k}$ = distância entre o grupo ij e o indivíduo k;

d_{ik} = distância entre os indivíduos i e k;

d_{jk} = distância entre os indivíduos j e k;

n = número de indivíduos que constituem o grupo original.

3.4.3 Validação dos nós (Análise de “bootstrap”)

Foi realizada a validação dos nós apresentado no dendrograma através da análise de “bootstrap” (Efron, 1979), em que números (valores de confiança, dados em porcentagem) são atribuídos a cada ramo presente no dendrograma, indicando sua confiabilidade.

3.4.4 Concordância entre dissimilaridades genéticas geradas por características morfoagronômicas e marcadores RAPD

Dos 78 acessos de tomateiro que foram caracterizados via marcadores RAPD, 58 foram caracterizados morfoagronomicamente com base em caracteres qualitativos, conforme Bento et al., (2007). Para tal caracterização, foram utilizados 27 descritores, quais sejam: cor do hipocótilo; pubescência do hipocótilo; hábito de crescimento; densidade da pubescência do caule; comprimento do internódio do caule; densidade da folhagem; tipo de folha; tipo de inflorescência; número de inflorescência; número de flores por inflorescência; cor da corola; cor do fruto imaturo; frutos por inflorescência; pubescência do fruto; forma do fruto; presença de ombro verde no fruto; cor do fruto maduro; intensidade da cor externa do fruto; cor da pele do fruto; cor do pericarpo; presença de fruto oco; número de locos; forma do corte transversal do fruto; forma da cicatriz do pistilo no fruto; forma do ápice do fruto; rachadura radial no fruto e rachadura concêntrica. Esses descritores foram utilizados na caracterização de 67 acessos de tomateiro do banco de germoplasma da UENF, dos quais, 58 foram utilizados neste trabalho de caracterização molecular via marcador RAPD.

Com finalidade de comparar os dados morfoagronômicos com os dados moleculares, foi necessária a transformação dos dados qualitativos em binários (0,1), para a realização da análise de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do índice de Jaccard. Obtidas as matrizes de dissimilaridade morfoagronômica e moleculares, ambas foram comparadas pelo agrupamento de Tocher, teste de correlação de Mantel (Mantel, 1967) e pelo teste t. Foram realizados os cálculos usando o programa Genes (2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem dos iniciadores e amplificação do DNA

Cada iniciador gerou bandas de intensidades variáveis, facilmente detectadas, e bandas inespecíficas que foram descartadas. Os 27 iniciadores utilizados produziram um total de 132 bandas, resultando, em média, 4,89 bandas por iniciador (Tabela 2). Das 132 bandas obtidas, 74 foram polimórficas e 58 monomórficas, ou seja, em média, cada iniciador gerou 2,74 bandas polimórficas e 2,28 bandas monomórficas. O número total de bandas polimórficas por iniciador variou de 1 a 6 e, no geral, 56,06% das bandas foram polimórficas.

Villand et al. (1998) analisaram 96 acessos de tomateiro com 41 iniciadores RAPD e encontraram 98 marcas polimórficas, gerando em média 2,27 bandas polimórficas por iniciador. O número de marcas polimórficas por iniciador variou de 1 a 6, concordante com os dados obtidos neste trabalho. Entretanto, Carelli et al. (2006), analisando 35 acessos de tomateiro com 20 iniciadores RAPD, encontraram 257 marcas polimórficas, ou seja, em média, cada iniciador gerou 12,85 bandas polimórficas, sendo 78,6% de todas as bandas encontradas.

Os acessos estudados por Villand et al. (1998) constituíram-se de sub-espécies diferentes, enquanto que, no trabalho de Carelli et al. (2006), a análise foi feita com base em variedades “crioulas” e cultivares modernas. Por outro lado, o presente estudo foi desenvolvido com acessos de tomateiro unicamente da espécie *L. esculentum*, que representam variedades antigas, linhagens obtidas a partir de diversos programas de melhoramento e novas cultivares introduzidas

visando especialmente a atender um mercado que tem preferência por frutos diferenciados, com cores e formatos diferenciados.

Tabela 2 – Relação dos iniciadores utilizados, suas seqüências de bases, número de fragmentos polimórficos e monomórficos amplificados e número total de fragmentos. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007

Iniciadores	Seqüência de Bases 5' – 3'	Nº de Bandas		Total
		polimórficas	monomórficas	
OPAA 03	TTAGCGCCCC	3	3	6
OPAA 04	AGGACTGCTC	1	3	4
OPAA 18	TGGTCCAGCC	1	2	3
OPAB 05	CCCGAAGCGA	3	2	5
OPAB 07	GTAAACCGCC	2	2	4
OPAB 09	GGGCGACTAC	4	0	4
OPAB 14	AAGTGCGACC	3	2	5
OPAC 06	CCAGAACGGA	2	3	5
OPAH 01	TCCGCAACCA	3	1	4
OPC 08	TGGACCGGTG	2	2	4
OPC 09	CTCACCGTCC	1	2	3
OPC 11	AAAGCTGCGG	1	3	4
OPC 15	GACGGATCAG	3	2	5
OPE 6	AAGACCCCTC	2	4	6
OPE 7	AGATGCAGCC	5	3	8
OPE 18	GGA CTGCAGA	6	1	7
OPG 16	AGCGTCCTCC	6	1	7
OPI 12	AGAGGGCACA	4	0	4
OPI 20	AAAGTGCGGG	2	3	5
OPK 16	GAGCGTCGAA	2	5	7
OPN 06	GAGACGCACA	2	4	6
OPN 08	ACCTCAGCTC	4	0	4
OPO 10	TCAGAGCGCC	3	1	4
OPT 16	GGTGAACGCT	4	2	6
OPW 06	AGGCCCGATG	2	1	3
OPW 13	CACAGCGACA	1	3	4
OPV 12	ACCCCCACT	2	3	5
Total de bandas observadas		74	58	132

Com base nestes resultados, pode-se observar variações no número de marcas RAPD para cultura do tomateiro. Deve-se considerar que, independente das diferenças entre os acessos testados, a falta de repetibilidade, sobretudo entre laboratórios, é uma característica e uma das desvantagens do RAPD (Binneck et al., 2002). Essas variações são comuns, pois o marcador RAPD tem

sua repetibilidade influenciada por pequenas variações nas condições de reação (Caixeta et al., 2006). É importante registrar que outros trabalhos realizados com diversas espécies no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, com a técnica RAPD, mostram em média o mesmo padrão de números de bandas polimórficas por iniciador, o qual foi observado no presente estudo. Viana et al. (2003), trabalhando com acessos de maracujá, obtiveram em média 4,4 bandas polimórficas por iniciador; Tardin et al. (2003), estudando a divergência genética de 20 acessos de alface, obtiveram em média 2,20 bandas polimórficas por iniciador; e Silva (2006), trabalhando com a cultura do mamoeiro, obteve em média 2,10 bandas polimórficas por iniciador.

A triagem de iniciadores com base em poucos acessos que possuem diferenças morfológicas e agronômicas marcantes foi válida e deve ser recomendada, pois economiza tempo, mão-de-obra e reagentes. Este procedimento foi também recomendado por Costa (2004), que selecionou quatro acessos de pimenta, sendo 1 *C. annuum* var *annuum*, 1 *C. annuum* var *glabriusculum*, 1 *C. baccatum* var *pendulum* e *C. baccatum* var *baccatum*, para os quais foram testados 192 iniciadores e, destes, 20 foram selecionados. A seleção de iniciadores deverá ser ainda mais eficiente se alguma informação sobre a origem genética dos acessos estiver disponível para ser utilizada na escolha daqueles a serem analisados previamente. A Figura 1 ilustra um dos iniciadores utilizados, o OPE 16, indicando a presença de seis marcas polimórficas e uma marca monomórfica, entre os acessos.

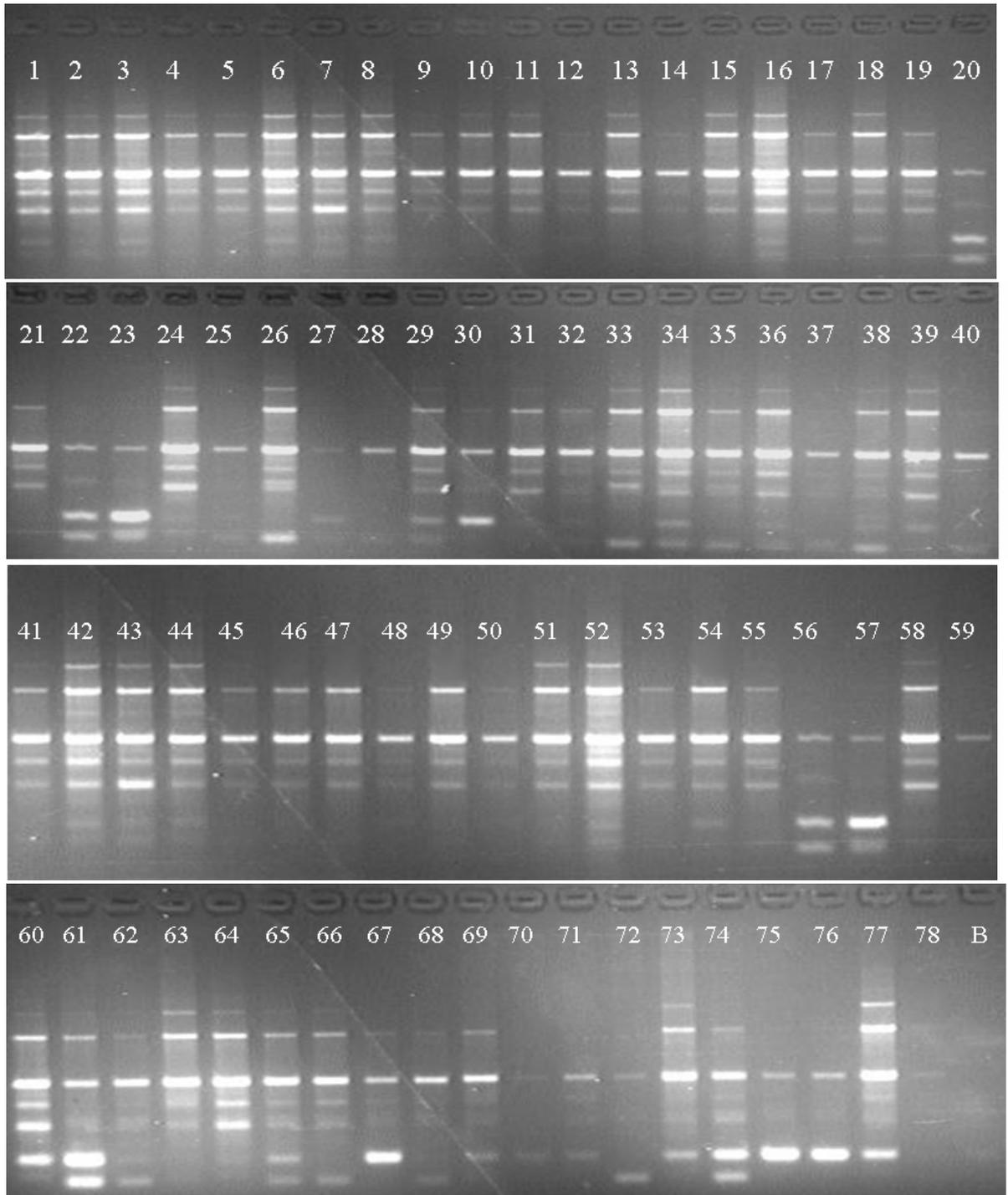


Figura 1 - Polimorfismo dos 78 acessos de *Lycopersicum esculentum* obtido com o iniciador OPE-16; "B" representa o branco de DNA. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007

4.2 Diversidade genética

Foi possível detectar diversidade genética entre os acessos de tomateiro estudados com base na técnica do RAPD, conforme já descrita em outros trabalhos com tomateiro (Williams e St. Clair, 1993; Rojas et al., 1994; Villand et al., 1998; Noli et al., 1999; Kochieva et al., 2002; Rajput et al., 2005; Carelli et al., 2006) e também com outras espécies como alho (Mota et al., 2003), aipo (Yang e Quiros, 1993), batata (Ford e Taylor, 1997), brócolis (Hu e Quiros, 1991), morangueiro (Conti et al., 2002) e melão (Tanaka et al., 2007).

Foi observado na matriz de dissimilaridade, gerada pelo índice de Jaccard, que os acessos mais distantes foram o 45 (UENF 202) e o 66 (UENF 1662), cuja distância foi de 0,3396, enquanto que os acessos 71 (UENF 1667) e 75 (UENF 1701) foram os mais similares, apresentando uma distância de 0,0118. A distância média observada entre os acessos foi de 0,1908 ($\pm 0,0440$). Carelli et al. (2006) obtiveram uma distância que variou de 0,432 – 0,819, com uma média de 0,654 ($\pm 0,087$). Entretanto, Villand et al. (1998) obtiveram uma distância que variou de 0,011 – 0,500, com uma média de 0,164 ($\pm 0,084$). Essa diferença entre as distâncias genéticas em relação aos trabalhos pode ser devido principalmente à origem dos acessos estudados, sendo que Carelli et al. (2006) trabalharam com cultivares melhoradas e acessos “crioulos” e Villand et al. (1998) trabalharam com tomate de diferentes regiões do mundo.

A diversidade pôde ser constatada pela formação de grupos contendo acessos similares nas análises de agrupamento hierárquico UPGMA (Figura 2, Tabela 3) e de Tocher (Tabela 4).

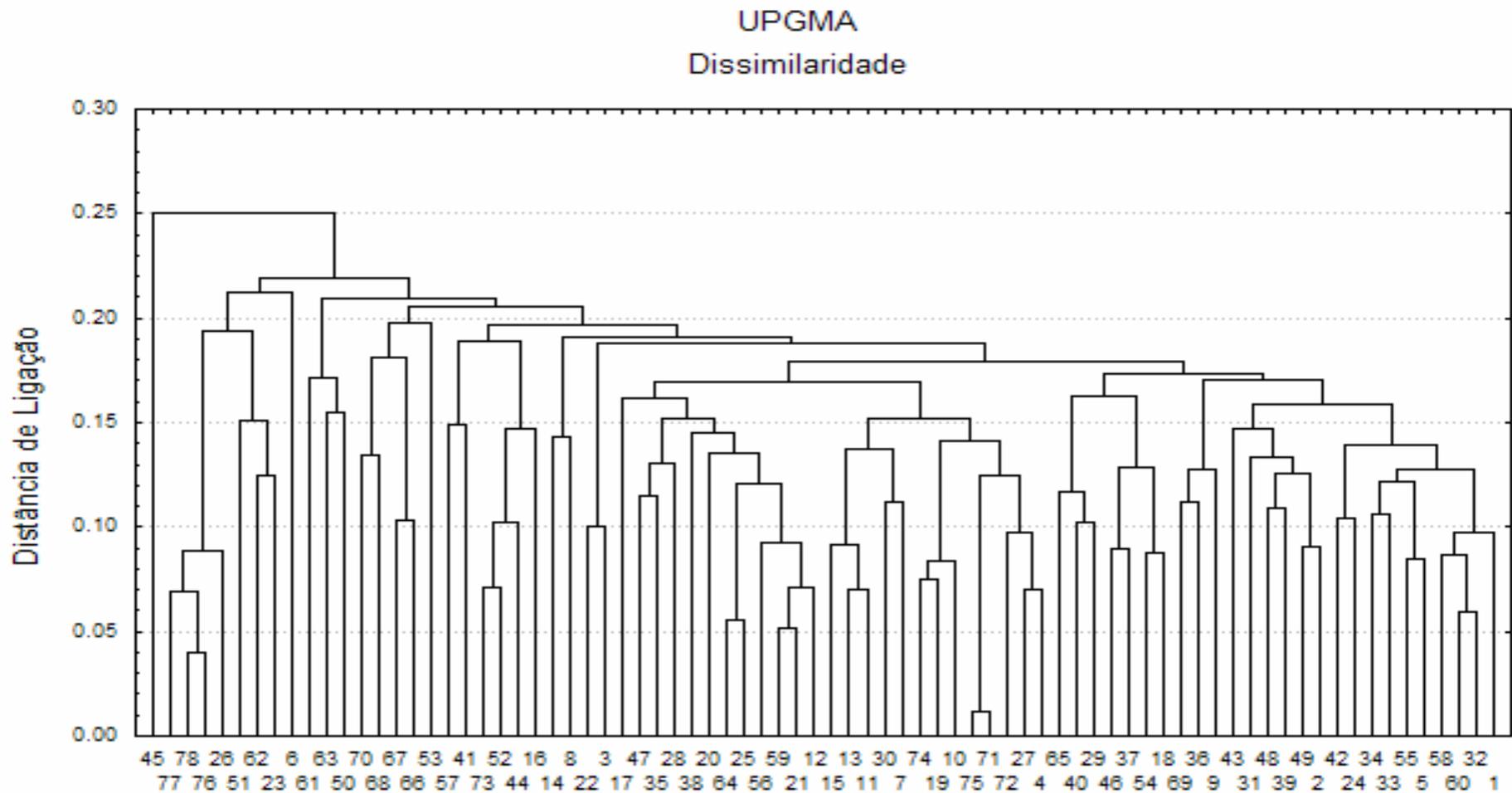


Figura 2 – Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética, expressa entre 78 acessos de *Lycopersicon esculentum*, com base em 74 fragmentos polimórficos e 58 monómorficos, pelo complemento aritmético do índice de Jaccard

Tabela 3 – Agrupamento de 78 acessos de *Lycopersicon esculentum*, baseado na dissimilaridade genética, obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, e no agrupamento pelo método UPGMA. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007

Grupos	Acessos
I	UENF 104, UENF 140, UENF 155, UENF 156, UENF 158, UENF 160, UENF 161, UENF 162, UENF 163, UENF 165, UENF 167, UENF 169, UENF 170, UENF 171, UENF 172, UENF 173, UENF 176, UENF 177, UENF 179, UENF 180, UENF 182, UENF 183, UENF 185, UENF 186, UENF 187, UENF 188, UENF 189, UENF 190, UENF 193, UENF 194, UENF 195, UENF 196, UENF 199, UENF 200, UENF 204, UENF 205, UENF 206, UENF 208, UENF 212, UENF 213, UENF 215, UENF 218, UENF 219, UENF 221, UENF 225, UENF 216, UENF 1665, UENF 1667, UENF 1668, UENF 1700, UENF 1701
II	UENF 154, UENF 174
III	UENF 159, UENF 166
IV	UENF 168, UENF 201, UENF 210B, UENF 1669
V	UENF 197, UENF 217
VI	UENF 211
VII	UENF 1662, UENF 1663
VIII	UENF 1664, UENF 1666
IX	UENF 209, UENF 222, UENF 224
X	UENF 157
XI	UENF 175, UENF 210, UENF 223
XII	UENF 178, UENF 1702, UENF 1703, UENF 1704
XIII	UENF 202

Tabela 4 – Agrupamento pelo método de Tocher dos acessos de *Lycopersicon esculentum* estudados, com base na dissimilaridade genética expressa pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007

Grupos	Acessos
1	UENF 104, UENF 155, UENF 156, UENF 161, UENF 162, UENF 163, UENF 165, UENF 167, UENF 170, UENF 171, UENF 179, UENF 180, UENF 219, UENF 221, UENF 1667, UENF 1668, UENF 1700 e UENF 1701
2	UENF 172, UENF 173, UENF 177, UENF 189, UENF 194 e UENF 225
3	UENF 168, UENF 176, UENF 186, UENF 187, UENF 199, UENF 201, UENF 210B, UENF 213, UENF 218 e UENF 1669.
4	UENF 188, UENF 193, UENF 204 e UENF 205
5	UENF 140, UENF 182, UENF 185, UENF 195, UENF 196 e UENF 208
6	UENF 1662 e UENF 1663
7	UENF 158 e UENF 183
8	UENF 178, UENF 1702, UENF 1703 e UENF 1704
9	UENF 160 e UENF 190
10	UENF 175 e UENF 223
11	UENF 154 e UENF 174
12	UENF 1664 e UENF 1666
13	UENF 159 e UENF 166
14	UENF 209 e UENF 222
15	UENF 216
16	UENF 212
17	UENF 224

Tabela 4, cont.;

Grupos	Acessos
18	UENF 200
19	UENF 169
20	UENF 197
21	UENF 217
22	UENF 215
23	UENF 211
24	UENF 202
25	UENF 157
26	UENF 210

4.2.1 Método hierárquico das medidas de dissimilaridade ponderada (UPGMA)

No dendrograma formado pelo método UPGMA (Figura 2), estão representados, no eixo X, os diversos acessos, e, no eixo Y, as porcentagens das distâncias entre eles. Um corte a 18% possibilitou a formação de 13 grupos discriminados na Tabela 3.

Com a formação do dendrograma obtido pela análise de agrupamento UPGMA a partir de dados moleculares, foi realizada uma comparação com cinco descritores (hábito de crescimento, tipo de folha, número de lóculos, cor do fruto maduro e forma do fruto) que foram importantes na discriminação dos acessos na etapa de caracterização morfoagronômica.

O grupo I proporcionou a formação do maior conjunto de genótipos, totalizando 51 acessos, ou seja, 65% dos acessos estudados. Para os acessos desse grupo, 25 dos 27 iniciadores foram polimórficos, totalizando 50 marcas polimórficas.

Comparando os dados obtidos pelo marcador molecular RAPD com os dados morfoagronômicos obtidos por Bento et al. (2007), pôde-se observar que o grupo I foi formado por plantas de hábito de crescimento indeterminado, exceto o

acesso UENF 160, que possui hábito de crescimento determinado e o acesso UENF 204, que possui hábito de crescimento semi-determinado. Todos os acessos desse grupo possuem folhas do tipo padrão. Em relação às características morfológicas do fruto, ocorreu variação no número de lóculos, tamanho e formato do fruto.

Observou-se que 76% dos acessos desse grupo tinham frutos biloculares, 20%, triloculares e apenas 3%, multiloculares. Em relação à característica do formato do fruto, constatou-se que 53% dos acessos produziram frutos no formato levemente achatado, 23% na forma globular, 11% no formato redondo, 11% no formato cilíndrico alongado e 2% na forma de coração.

O grupo II foi composto por apenas dois acessos, UENF 154 e UENF 174, que foram polimórficos para nove iniciadores (OPAB 09, OPAB 14, OPAH 01, OPE 07, OPE 16, OPG 16, OPK 16, OPT 16 e OPW 06), totalizando 14 bandas polimórficas. Esses acessos possuem plantas com hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo padrão e frutos vermelhos, triloculares e de formato globular.

O grupo III foi formado pelos acessos UENF 159 e UENF 166, polimórficos para 12 iniciadores (OPAB 07, OPAB 14, OPAC 06, OPC 08, OPC 15, OPE 07, OPE 16, OPI 20, OPN 06, OPN 08, OPT 16 e OPW 06), totalizando 21 bandas polimórficas. Esse grupo possui plantas com hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos, biloculares e de formato levemente achatado.

O grupo IV reuniu quatro acessos, UENF 168, UENF 201, UENF 210B e UENF 1669, que foram polimórficos para 19 iniciadores estudados, e totalizaram 23 bandas polimórficas. Esse grupo possui plantas com hábito de crescimento indeterminado e folhas do tipo normal. Esses acessos produzem frutos vermelhos, biloculares e em formato de pêra, exceto o acesso UENF 168, que tem fruto de formato redondo, e o acesso UENF 1669, que possui frutos de coloração amarela.

O grupo V, formado pelos acessos UENF 197 e UENF 217, teve polimorfismo para 10 iniciadores (OPAB 09, OPAB 14, OPAC 06, OPAH 01, OPC 08, OPC 09, OPC 15, OPE 16, OPT 16 e OPW 06), totalizando 17 bandas polimórficas. Esse grupo consiste de plantas de hábito de crescimento

indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos, multiloculares e de formato globular.

O grupo VI, representado pelo acesso UENF 211, caracteriza-se por ter plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal e frutos vermelhos, biloculares, de formato globular.

O grupo VII foi composto pelos acessos UENF 1662 e UENF 1663, provenientes de um programa de melhoramento que visa à resistência à *Ralstonia solanacearum* (murcha bacteriana), conduzido na Amazônia (Cheng e Chu, 2002). Esse grupo foi polimórfico para oito iniciadores (OPAB 09, OPAB 14, OPC 08, OPE 07, OPE 18, OPE 16, OPW 06 e OPV 12), totalizando 13 bandas polimórficas. O grupo possui plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal e frutos vermelhos e multiloculares. Em relação ao formato do fruto, o UENF 1662 apresenta frutos no formato globular e o UENF 1663 apresenta frutos no formato cilíndrico alongado.

O grupo VIII, formado pelos acessos UENF 1664 e UENF 1666, foi polimórfico para nove iniciadores (OPAB 05, OPAB 09, OPAB 14, OPAC 06, OPC 08, OPI 20, OPN 06, OPT 16 e OPW 06), totalizando 15 bandas polimórficas. Esse grupo possui plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal e, em relação à característica dos frutos, apresenta frutos vermelhos, multiloculares e de formato globular.

O grupo IX formou-se por três acessos, UENF 209, UENF 222 e UENF 224. Esse grupo foi polimórfico para 19 iniciadores, totalizando 29 bandas polimórficas. O grupo caracteriza-se por possuir plantas de hábito de crescimento indeterminado e folhas do tipo batata, sendo esta característica que determina a variedade *grandifolium*. Em relação às características morfológicas do fruto, os acessos têm frutos biloculares (UENF 209 e UENF 222) e triloculares (UENF 224). Quanto ao formato, os acessos UENF 209 e UENF 224 são do tipo levemente achatado, e o acesso UENF 222 produz frutos de formato globular.

O grupo X, formado pelo acesso UENF 157, caracteriza-se por apresentar plantas de hábito de crescimento semi-determinado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos, multiloculares e de formato globular.

O grupo XI reuniu três acessos, UENF 175, UENF 210 e UENF 223. Esse grupo foi polimórfico para 18 iniciadores, totalizando 30 bandas polimórficas. O grupo é representado por plantas de hábito de crescimento indeterminado e

folhas do tipo normal. Os acessos UENF 175 e UENF 210 produzem frutos vermelhos, biloculares e de formato globular. O acesso UENF 223, por sua vez, tem frutos vermelhos, triloculares e de formato levemente achatado.

O grupo XII foi formado por quatro acessos, UENF 178, UENF 1702, UENF 1703 e UENF 1704. Esse grupo foi polimórfico para 11 iniciadores (OPAB 05, OPAB 07, OPAB 09, OPAB 14, OPC 08, OPC 09, OPE 18, OPE 16, OPO 10, OPW 06 e OPV 12), totalizando 12 bandas polimórficas. Os acessos desse grupo possuem plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal e frutos amarelos, multiloculares e de formato globular, exceto o acesso UENF 1703, que tem frutos no formato cilíndrico alongado.

O grupo XIII, representado apenas pelo acesso UENF 202, possui plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos, biloculares e de formato cilíndrico alongado.

Na etapa de caracterização morfoagronômica, grande parte dos acessos utilizados foi também utilizadas no estudo de Karasawa (2005), que registrou a ocorrência de sete grupos formados com base no método hierárquico do vizinho mais próximo e 11 grupos pelo agrupamento de Tocher. Os acessos (UENF 104, UENF 140, UENF 155, UENF 156, UENF 158, UENF 160, UENF 161, UENF 163, UENF 165, UENF 167, UENF 169, UENF 170, UENF 171, UENF 172, UENF 173, UENF 176, UENF 177, UENF 179, UENF 180, UENF 182, UENF 183, UENF 186, UENF 187, UENF 188, UENF 189, UENF 190, UENF 193, UENF 194, UENF 195, UENF 199, UENF 200, UENF 204, UENF 205, UENF 206, UENF 212, UENF 213, UENF 215, UENF 218, UENF 219, UENF 221, UENF 225, UENF216) que ficaram nos mesmos grupos no trabalho de Karasawa (2005) também foram reunidos em um mesmo grupo neste estudo, de acordo com os marcadores RAPD e o método UPGMA.

Noli et al. (1999), utilizando-se de marcadores RAPD, não conseguiram diferenciar cultivares com características fenotípicas distintas. No presente estudo, foi possível identificar grupos contendo acessos com características fenotípicas idênticas entre si e diferentes dos demais acessos de outros grupos. Por exemplo, têm-se os grupos VII e XII, que agruparam respectivamente os acessos resistentes à *Ralstonia solanacearum* e os acessos que têm frutos amarelos. Por outro lado, o único acesso de hábito determinado (UENF 160) não

pôde ser distinguido de outros de hábito indeterminado, com base nos marcadores RAPD.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficiência da técnica molecular RAPD para identificação de cultivares. Trabalhos realizados com *Lycopersicon* (Williams e St. Clair, 1993; Rus-Kortekaas et al., 1994; Villand et al., 1998; Noli et al., 1999; Carelli et al., 2006) também confirmam a eficiência dos marcadores RAPD para identificação de cultivares. Pode-se dizer que esses marcadores também possuem outras características atrativas, como a possibilidade de obter um grande número de marcadores sem qualquer informação prévia sobre seqüências de nucleotídeos do genoma da espécie, baixo custo, rapidez, simplicidade e velocidade na aquisição dos dados (Binneck et al., 2002).

Os acessos UENF 210 e UENF 210B estão registrados com o mesmo nome comum (C-49-59) no Livro de Registro de Germoplasma da UENF. Entretanto, os resultados obtidos pelos marcadores RAPD indicam que os dois acessos são mesmo distintos, corroborando os resultados previamente obtidos pelos dados morfoagronômicos. No presente trabalho, foi observada uma distância de 0,2198 entre os acessos com base na matriz de similaridade do índice aritmético de Jaccard. Provavelmente, houve erro no momento do registro da amostra ou, ainda, o acesso realmente foi enviado com erro de identificação. Esforços deverão ser feitos na tentativa de esclarecer o ocorrido e de se resgatar a identificação correta do acesso.

4.2.2 Método de agrupamento de Tocher

Esse método possibilitou a formação de 26 grupos. Comparando-se o resultado obtido pelo método UPGMA com o método de otimização de Tocher, observa-se concordância parcial entre os grupos formados: uma parte dos acessos do grupo I do UPGMA dividiu-se em diferentes subgrupos no de Tocher (Tabela 4).

O grupo I, formado por 51 acessos pela técnica de agrupamento UPGMA, foi desmembrado em 12 grupos pelo método de otimização de Tocher, representado pelos grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 15, 16, 18, 19, 22 e 26. Assim sendo, serão apresentados, neste item, apenas esses grupos que foram subdivididos

pelo método de Tocher, visto que os demais são os mesmos já descritos para a análise de UPGMA.

O grupo 1 foi formado por 18 acessos, caracterizados por plantas de hábito de crescimento indeterminado e folhas do tipo normal, frutos vermelhos e biloculares, exceto o acesso UENF 221, que possui frutos triloculares.

O grupo 2, representado por seis acessos (UENF 172, UENF 173, UENF 177, UENF 189, UENF 194 e UENF 225), foi formado por plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos e biloculares, exceto o acesso UENF 225, que possui frutos triloculares. Os acessos UENF 172, UENF 173 e UENF 189 possuem frutos de formato globular; os acessos UENF 177 e UENF 225 possuem frutos levemente achatados, e o acesso UENF 194 possui frutos de formato cilíndrico alongado.

O grupo 3 foi formado por 11 acessos, em que sete acessos (UENF 176, UENF 186, UENF 187, UENF 199, UENF 206, UENF 213 e UENF 218) pertencem ao grupo I e os outros quatro acessos (UENF 168, UENF 201, UENF 210B e UENF 1669) pertencem ao grupo IV, pelo UPGMA. Esses acessos apresentam hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos e biloculares, exceto o acesso UENF 1669, que possui frutos de coloração amarela. Em relação ao formato do fruto, esse grupo possui frutos levemente alongados (UENF 186, UENF 187, UENF 199 e UENF 218), redondos (UENF 168 e UENF 213), globulares (UENF 176 e UENF 206) e tipo pêra (UENF 201, UENF 210B e UENF 1669).

O grupo 4, constituído de quatro acessos, é formado por plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos, biloculares (UENF 188 e UENF 205) e triloculares (UENF 193 e UENF 204). Quanto ao formato dos frutos, apenas o acesso UENF 188 não teve formato levemente achatado.

O grupo 5, formado por seis acessos, apresenta plantas de hábito de crescimento indeterminado, folhas do tipo normal, frutos vermelhos, triloculares (UENF 140, UENF 185 e UENF 195) e multiloculares (UENF 182, UENF 196 e UENF 208). Todos os acessos desse grupo têm frutos no formato levemente achatado.

O grupo 7, formado pelos acessos UENF 158 e UENF 183, possui plantas de hábito de crescimento indeterminado, folha do tipo normal, frutos vermelhos, biloculares e de formato cilíndrico alongado.

O grupo 9 foi formado por dois acessos: o acesso UENF 160, que tem hábito de crescimento determinado, e o acesso UENF 190, que apresenta hábito de crescimento indeterminado; ambos têm folhas do tipo normal, frutos vermelhos e biloculares. Quanto ao formato do fruto, o acesso UENF 160 apresenta-se redondo, enquanto o acesso UENF 190, constitui-se de frutos no formato globular.

Os grupos 15, 16, 18, 19 e 22 caracterizaram-se por se constituírem de um único acesso cada um, respectivamente UENF 216, UENF 212, UENF 200, UENF 169 e UENF 215. Todos eles têm plantas de hábito indeterminado, folhas do tipo normal e frutos vermelhos, mas diferenciam-se entre si pelo número de lóculos e formato dos frutos: UENF 216 é multilocular e em formato de coração; UENF 212 é multilocular, porém levemente achatado; UENF 200 é trilocular e achatado; UENF 169 é bilocular e globular e UENF 215 é bilocular e achatado.

Pôde ser constatado que aparentemente a característica que contribuiu para a separação do grupo I em muitos subgrupos, em dois tipos de análise diferentes, foi o formato do fruto, já que todos os demais caracteres foram bastante semelhantes.

Arriel et al. (2006) tiveram como objetivo comparar diferentes técnicas multivariadas na caracterização de 35 genótipos de gergelim mediante 769 marcadores RAPD, e concluíram que os métodos de hierarquização UPGMA e otimização de Tocher devem ser empregados em conjunto, com o objetivo de complementar os resultados. Costa (2004), utilizando a análise de agrupamento hierárquico UPGMA e o método de otimização de Tocher, observou grande concordância entre os grupos formados.

4.3 Consistência das ramificações formadas por UPGMA

Comparando-se o resultado obtido pelo método UPGMA com o método de otimização de Tocher, verifica-se certa concordância no estudo da divergência entre acessos. Contudo, as análises por *bootstrap* revelaram poucos agrupamentos consistentes.

Referindo-se a consistências dos ramos, Ramos (2003) considera-os consistentes, para a variação entre locos, aqueles com valores de *bootstrap*

superiores a 60%. Assim, os agrupamentos referentes aos acessos UENF 1667 e UENF 1701 (99,4%), UENF 1702 e UENF 1704 (64,5%), UENF 177 e UENF 225 (67,9%), UENF 155 e UENF 179 (62,7%), UENF 1702 e UENF 178 (82,6%), UENF 1662 e UENF 1663 (61,8%), UENF 104 e UENF 140 (100%), UENF 104 e UENF 155 (80,1%) e UENF 104 e UENF 157 (78%) podem ser considerados consistentes.

Em relação aos outros ramos formados, devem ser considerados pouco consistentes devido à variação existente na informação produzida pelos locos, ou seja, mudando-se os locos, esses grupos podem não ser reproduzidos.

No estudo de diversidade genética em uma população de 148 híbridos de tangor 'Murcott' e laranja 'Pêra', por meio da utilização de marcadores fAFLP e RAPD, Bastianel et al. (2006) também verificaram pouca consistência estatística pela análise de *bootstrap* entre os grupos formados.

Creste et al. (2005) tiveram como objetivo investigar a similaridade genética entre 15 acessos originários do Brasil de *Arachis* e *Heterantheae*, usando marcadores RAPD. A análise de *bootstrap* permitiu dividir os acessos em dois grupos consistentes. O primeiro grupo conteve todos os acessos *Arachis* e o segundo grupo, todos os acessos de *Heterantheae*. Entretanto, deve-se ressaltar que esse resultado foi obtido com acessos de duas espécies diferentes, enquanto que no presente estudo os acessos estudados são de uma única espécie.

Ferriol et al. (2003), ao estudar a diversidade da coleção de germoplasma de *Curcubita pepo* usando marcadores SRAP e AFLP, constataram a formação de dois grandes grupos, e, por meio da análise de *bootstrap*, mostraram a consistência de 15 subgrupos formados pela análise de UPGMA.

4.4. Concordância entre dissimilaridades genéticas geradas por características morfoagronômicas e marcadores RAPD

Os resultados do estudo da diversidade genética demonstram padrões de dissimilaridade distintos entre as matrizes geradas por características morfoagronômicas qualitativas e matrizes geradas por marcadores RAPD. Na característica morfológica, os acessos mais divergentes foram UENF 160 e UENF 224, apresentando uma distância de 0,6571, enquanto os acessos UENF 199 e UENF 219 foram os mais similares, com uma distância de 0,04. Em média, a distância observada foi de 0,3700 ($\pm 0,0941$). Em contrapartida, na matriz gerada

a partir de dados moleculares, observou-se que os acessos mais divergentes foram UENF 160 e UENF 178 com uma distância de 0,3200, enquanto os acessos UENF 169 e UENF 219 foram os mais similares. Em média, a distância observada foi de 0,1927 ($\pm 0,0424$) para dados moleculares.

Por meio do agrupamento de otimização de Tocher, foi observada uma distribuição diferente na formação e no número de grupos entre os caracteres morfológicos e moleculares. Para os caracteres morfológicos, ocorreu a formação de um grupo com 53 indivíduos e cinco outros grupos com apenas um indivíduo. Em contrapartida, para o caráter molecular, ocorreu a formação de 21 grupos (Tabela 5). Esse resultado sugere que os marcadores moleculares foram mais eficientes em distinguir os acessos do banco de germoplasma em relação aos marcadores morfológicos, por meio do método de agrupamento de Tocher. Nas características morfoagronômicas, os grupos 2, 3, 4 e 5 formados pelos acessos UENF 197, UENF 157, UENF 178 e UENF 160, respectivamente, também formaram grupos isolados em relação aos grupos obtidos pelos marcadores RAPD.

Quanto à correlação entre a matriz formada pelo marcador RAPD e a matriz formada pelas características morfológicas, houve correlação positiva e altamente significativa entre as matrizes ($t = 14,02$). Em se tratando da correlação de Mantel, obteve-se um valor de correlação (r) de 0,39. Esta correlação baixa pode-se dever ao fato de o marcador RAPD cobrir uma proporção maior do genoma, incluindo regiões codificadas ou não e suas marcas não serem correlatas com as características fenotípicas estudadas.

Garcia et al. (1998), trabalhando com 32 linhas melhoradas de melão, correlacionaram duas matrizes, em que uma foi formada por 115 bandas polimórficas obtidas por meio da técnica de RAPD e a outra matriz por 24 características agrônômicas. Os autores obtiveram uma correlação pelo teste de Mantel de 79% entre as duas matrizes estudadas.

Tabela 5 – Agrupamento pelo método de Tocher dos 58 acessos de *Lycopersicon esculentum* estudados, com base na dissimilaridade genética expressa pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, por meio dos dados morfológicos e moleculares. Campos dos Goytacazes – RJ, 2007

Grupos	Acessos	
	Morfológicos	Moleculares
I	1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64	20, 21, 36, 38, 56, 59, 64
II	41	4, 5, 7, 10, 11, 13, 15, 23, 27, 28, 30
III	6	1, 24, 32, 33, 34, 42, 53, 58
IV	26	22, 37, 46, 47
V	9	29, 39, 40, 48, 49
VI	22	16, 44, 52
VII		14, 19
VIII		36, 45
IX		50, 61
X		54, 62
XI		3, 40
XII		41
XIII		43
XIV		17
XV		63
XVI		8
XVII		55
XVIII		51
XIX		26
XX		6
XXI		9

Kamada (2006), trabalhando quatro populações de fáfia (*Pfaffia glomerata*), correlacionou caracteres fenotípicos com marcador RAPD. Como resultado, obteve valores significativos pelo teste-Z ($p < 0,01$), mas valores baixos de correlação (r) 0,28. O autor concluiu que não é recomendável utilizar apenas um tipo de marcador, sendo ele fenotípico ou molecular, para estimar a diversidade no aspecto qualitativo, uma vez que as correlações entre as distâncias genéticas foram baixas.

4.5 Considerações finais

A constatação de que existe variabilidade no banco de germoplasma e que esta pôde ser demonstrada em termos de marcadores RAPD reveste-se de importância para o melhor conhecimento dos acessos e para o manejo do banco. Com base nos resultados obtidos, podem-se recomendar cruzamentos entre os acessos mais divergentes em relação aos marcadores RAPD para exploração da heterose em híbridos de tomateiro. Observando os grupos formados e associando-os aos caracteres morfológicos e agrônômicos já conhecidos, podem ser recomendados os seguintes cruzamentos:

- Visando à obtenção de plantas produtoras de fruto do tipo cereja resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, recomenda-se o cruzamento entre os acessos UENF 155 x UENF 175, UENF 175 x UENF 1667, UENF 175 x UENF 1701, sendo o cruzamento UENF 155 x UENF 175 também recomendado por Karasawa (2005).
- Visando à consecução de plantas produtoras de fruto grande e resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, recomenda-se o cruzamento entre os acessos UENF 224 x UENF 175.
- Para obtenção de plantas produtoras de fruto tipo cereja e resistente à *Ralstonia solanacearum*, recomenda-se o cruzamento entre os acessos UENF 155 x UENF 1662 ou UENF 1663.
- Para obtenção de plantas produtoras de frutos grandes e resistentes à *Ralstonia solanacearum*, recomenda-se o cruzamento entre os acessos UENF 1662 ou UENF 1663 com UENF 185 ou UENF 196.
- Visando à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e à *Ralstonia solanacearum*, recomenda-se o cruzamento entre os acessos UENF 175 com UENF 1662 ou UENF 1663.

Um outro resultado importante diz respeito ao fato de não se verificar a ocorrência de duplicatas na coleção. Isso somado ao fato de que vários dos acessos conservados nessa coleção são considerados raros.

Em diversos países, existem associações de produtores de sementes de tomateiro que “protegem” as chamadas “landraces” ou as “heirloom seeds”, sementes mantidas por produtores tradicionais e passadas de geração em geração. Por causa do aspecto de preservação da diversidade e pelo fato de esses produtores estarem ligados a um tipo de agricultura familiar e sustentável, existe todo um interesse do mercado na conservação dessas sementes. Na coleção de germoplasma de tomateiro da UENF, alguns acessos se encaixam nessa categoria, como os acessos UENF 175, UENF 215 e UENF 223. Outros acessos também são mantidos por grandes institutos internacionais de pesquisa, como é o caso dos acessos UENF 140 (‘S.C. Yokota’), UENF 157 (‘Tanzimech’) e UENF 212 (‘Roma’), mantidos pelo AVRDC – “Asian Vegetable Research and Development Center”. O conhecimento dessas informações só foi possível porque, essas instituições e organizações não-governamentais disponibilizaram as informações de seus respectivos bancos em páginas eletrônicas na internet. Isto favorece o conhecimento e o intercâmbio de informações entre os acessos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Uma coleção de germoplasma tem por fim a conservação de recursos genéticos e também disponibilizar genótipos que apresentam características desejadas pelo melhorista. Este trabalho teve como objetivo estudar a divergência genética entre 78 acessos da coleção de germoplasma de *Lycopersicon esculentum* do CCTA/UENF (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), com base na caracterização por meio de marcadores RAPD, e correlacionar os dados morfoagronômicos com os dados de caracterização molecular.

Em função dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1. A análise molecular RAPD foi efetiva em estimar a diversidade genética entre os acessos, mostrando que os acessos possuem variabilidade genética.
2. A triagem de iniciadores com base em poucos acessos que possuem diferenças morfológicas e agronômicas marcantes foi válida e deve ser recomendada, pois economiza tempo, mão-de-obra e reagentes.
3. Com um corte a 18% no dendrograma obtido pelo método UPGMA, observou a formação de 13 grupos distintos.
4. Comparando-se os resultados obtidos pelo UPGMA com o de Tocher, observou concordância parcial entre os grupos formados, sendo que o grupo I do UPGMA foi subdividido em 13 grupos pelo método de Tocher.
5. Não foi verificada a ocorrência de duplicatas na coleção.
6. As análises por *bootstrap* revelaram poucos agrupamentos consistentes.

7. Houve uma correlação positiva e altamente significativa entre as matrizes geradas pelos dados qualitativos e pelos marcadores RAPD ($t = 14,02$). Contudo, observa-se uma correlação de Mantel baixa (r), de 0,39, que pode-se dever às marcas obtidas pelos marcadores RAPD, as quais não foram correlatas com as características fenotípicas estudadas.

8. Com base nos resultados obtidos, recomendam-se os cruzamentos: UENF 155 x UENF 175, UENF 175 x UENF 1667, UENF 175 x UENF 1701 (visando à obtenção de plantas produtoras de fruto do tipo cereja resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); UENF 224 x UENF 175 (visando a plantas produtoras de fruto grande e resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); UENF 155 x UENF 1662 ou UENF 1663 (para obtenção de plantas produtoras de fruto tipo cereja e resistente à *Ralstonia solanacearum*); UENF 1662 ou UENF 1663 com UENF 185 ou UENF 196 (para obtenção de plantas produtoras de frutos grandes e resistentes à *Ralstonia solanacearum*) e UENF 175 com UENF 1662 ou UENF 1663 (visando à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e à *Ralstonia solanacearum*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral Júnior, A.T., Thiébaud, J.T.L. (1999) *Análise multivariada na avaliação da diversidade genética em recursos genéticos vegetais*. Apostila: CCTA – UENF, 55p.

Arriel, N.H.C., Di Mauro, A.O., Di Mauro, S.M.Z., Bakke, O.A., Unêda-Trevisoli, S.H., Costa, M.M., Capeloto, A., Corrado, A.R. (2006) Técnica multivariada na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41 (5):801-809.

Bastianel, M., Oliveira, A.C., Cristofani, M., Machado, M.C. (2006) Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por AFLP e RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41 (5):779-784.

Bento, C.S., Rodrigues, R., Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Moulin, M.M. (2007) Descritores morfoagronômicos na caracterização de acessos de tomateiro. *Resumo do 12º Encontro de Iniciação Científica. 7º Mostra de Pós-Graduação. 5º Mostra de Extensão. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ*, 188p.

Bernatzkey, B., Tanksley, S.D. (1986) Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* 203:8-14.

Binneck, E., Nedel, J.L., Dellagostin, O.A. (2002) Análise de RAPD na identificação de cultivares: Uma metodologia útil? *Revista Brasileira de Sementes*. 24 (1):183–196.

Borém, A., Miranda, G.V. (2005) *Melhoramento de plantas*. 4. ed. Viçosa: UFV, 552p.

Borguini, R.G. (2002) *Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) orgânico: o conteúdo nutricional e a opinião do consumidor*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, 110p.

Bueno, L.C.S., Mendes, A.N.G., Carvalho, S.P. (2001) *Melhoramento genético de plantas: Princípios e procedimentos*. Lavras: UFLA, 282p.

Caixeta, E.T., Oliveira, A.C.B., Brito, G.G., Sakiyama, N.S. (2006) Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, p. 9-78.

Canene-Adams, K., Campbell, J.K., Zaripheh, S., Jefferey, E.H., Erdman Junior, J.W. (2005) The tomato as a functional food. *Journal Nutrition*, 135:1226–1230.

Carelli, B.P. (2003) *Estimativa de variabilidade genética em acessos crioulos e cultivares comerciais de tomates (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Tese (Doutorado em Ecologia e recursos Naturais) - São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 100p.

Carelli, B.P., Gerald, L.T.S., Grazziotin, F.G., Echeverrigaray, S. (2006) Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53:395-400.

Ceasa (2007) Centrais de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro; <http://www.ceasa.rj.gov.br> em 03/01/2007.

Cheng, S.S., Chu, E.Y. (2002) ‘Pará Belo’ um clone do tomateiro adaptado à Amazônia Oriental. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (3):516-519.

Conti, J.H., Minami, K., Gomes, L.H., Tavares, F.C.A. (2002) Estimativa da similaridade genética e identificação de morangueiro por análise de RAPD. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (2):145-152.

Costa, F.R. (2004) *Diversidade genética entre acessos de Capsicum spp. com base em marcadores RAPD*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 62p.

Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Vitoria, A.P., Campos, K.P., Rodrigues, R., Silva, D.H., Pereira, M.G. (2006) Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6:18-23.

Creste, S., Tsai, S.M., Valls, J.F.M., Gimenes, M.A., Lopes, C.R. (2005) Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from sections *Arachis* and *Heteranthae* using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52:1079-1086.

Cruz, C.D. (2006) *Programa Genes: análise multivariada e simulação*. Viçosa: Ed. UFV, 175p.

Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, v.2, 585p.

Cruz, C.D., Regazzi, A.J. (2001) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 2. ed. rev. 390p.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.

Efron, B. (1979). Bootstrap methods: another look at jakknife. *Annals of Statistics*, 7 (1):1-26.

EMBRAPA (1993) *A cultura do tomateiro (para a mesa)*. Brasília: Embrapa - SPI, 92p.

Falconer, D.S. (1987) Introdução à genética quantitativa. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos da Silva. Viçosa: UFV, 279p.

FAO (2006) Food and Agriculture Organization of The United Nations; <http://www.faostat.fao.org> em 16/06/2006.

Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p.

Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F. (2003) Genetic diversity of a germoplasm collection of *Curcubita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics*, 107:271-282.

Filgueira, F.A.R. (2000) *Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na reprodução e comercialização de hortaliças*. Viçosa: UFV, 402p.

Filgueira, F.A.R. (2003) *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 2. ed. Viçosa: UFV, 412p.

Ford, R., Taylor, P.W.J. (1997) The application of RAPD markers for potato cultivar identification. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood Victoria, 48 (8):1213-1217.

Freitas, L.B., Bered, F. (2003) *Genética e Evolução vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 463p.

Garcia, E., Jamilena, M., Alvarez, J.I., Arnedo, T., Oliver, J.L., Lozano, R. (1998) Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.* 96:878-885.

George, B., kaur, C., Khurdiya, D.S., Kapoor, H.C. (2004) Antioxidants in tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of genotype. *Food Chem.* 84:45-51.

Gepts, P. (1988) Phaseolin as an evolutionary marker. In: Gepts, P. (org.) *Genetic resources of Phaseolus beans*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, p. 215-241.

Gepts, P. (2006) Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Science*, 46:2278-2292.

Heun, M., Schafer-Pregl, R., Klawn, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997) Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278:1312-1314.

Hille, J., Koornneef, M., Ramanna, M.S., Zabel, P. (1989) Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytic*, 42:1-23.

Hu, J., Quiros, C.F. (1991) Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports*, Berlin, 10 (10):505-511.

IBGE (2005) Centro Agropecuário/96. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA; <http://www.sidra.ibge.gov.br> em 03/02/2007, página mantida pelo IBGE.

IPGRI (1996) *Descriptors for Tomato (Lycopersicon spp.)*. Italy, 44p.

Jenkins, J.A. (1948) The origin of the cultivar tomato. *Econ. Bot.* 2:379-392.

Joshi, A., Kohli, J.K. (2003) Genetic divergence for quantitative and qualitative traits in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 73:110-113.

Kamada, T. (2006) *Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de beta-ecdisona*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 106p.

Karasawa, M. (2005) *Divergência genética com base em caracterização morfoagronômica e avaliação para resistência à mancha bacteriana em tomateiro*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 123p.

Karasawa, M., Rodrigues, R., Sudré, C.P., Silva, M.P., Riva, E.M., Amaral Júnior, A.T. (2005) Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da

divergência genética entre acessos de tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 23 (4):1000-1005.

Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Khrupalova, I.A., Pukhalskyi, V.A. (2002) Using RAPD for estimating genetic polymorphism in and phylogenetic relationships among species of the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. *Russian Journal of Genetics*, 38 (9):1104-1108.

Liviero, L., Maestri, E., Gulli, M., Nevo, E., Marmioli, N. (2002) Ecogeographic adaptation and genetic variation in wild barley: Application of molecular markers targeted to environmentally regulated genes. *Genet. Resour. Crop Evol.* 49:133-144.

Mantel, N.A (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Can. Res.* 27:209-220.

Marim, B.G., Abreu, F.B., Guimarães, M.A., Belfort, G., Sampaio Júnior, J.D., Silva, D.J.H. (2002) Divergência genética entre 30 acessos de tomateiro do banco de germoplasma de hortaliças da UFV. *Resumo do Congresso Brasileiro de Olericultura*, 42, Uberlândia: SOB, Horticultura Brasileira, p. 394-394.

Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez, G.J., Buckler, E., Doebley, J. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6080-6084.

Melo, P.C.T. (1989) *Melhoramento Genético do Tomateiro*. Campinas, 55p.

Meyer, A.S. (2002) *Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Piracicaba, SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 106p.

Milach, S.C.K. (1998) *Marcadores de DNA em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 141p.

Minami, K., Haag, H.P. (1980) *O tomateiro*. 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, 397p.

Mota, J.H., Souza, R.J., Yuri, J.E., Resende, G.M., Paiva, L.V. (2004) Diversidade genética de cultivares de alho (*Allium sativum* L.) por meio de marcadores moleculares RAPD. *Ciência Agrotec. Lavras*, 28:764-770.

Mullis, K., Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzimol.* 55:335-350.

Noli, E., Conti, S., Maccaferri, M., Sanguineti, M.C. (1999) Molecular characterization of tomato cultivars. *Seed Science and Technology*, Zürich, 27 (1):1-10.

Odum, E.P. (1988) *Ecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 434p.

Pequeno, S.A., Pinheiro, J.B., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Coelho, A.S.G., Trindade, M.G. (2003) Determinação do número de marcadores RAPD para estudo da diversidade genética em soja utilizando o método Bootstrap. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 19 (2):45-48.

Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M. (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30 (2):424-434.

Pereira, M.G., Pereira, T.N.S. (2006) Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, p. 85-106.

Plantar (1991) Guia Rural – A Enciclopédia prática da agricultura Brasileira. 201-209p.

Rajput, S.G., Wable, K.J., Sharma, K.M., Kubde, P.D., Mulay, S.A. (2005) Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. *African Journal of Biotechnology*, 5 (2):108-112.

Ramos, S.R.R. (2003) *Divergência genética baseada em marcadores moleculares AFLP e indicação de coleção nuclear de *Curcubita moschata* para o nordeste do Brasil*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 123p.

Rao, A.V. (2002) Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine*, 227:908-913.

Rao, A.V., Agawal, S. (2000) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19:563-569.

Rao, R.C. (1952) *Advanced statistical methods in biometric research*. New York: John Wiley, 390p.

Rao, V.R., Riley, K.W. (1994) The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97:3-20.

Reis, J.N.P., Soares, E.S., Carvalho, K.F. (2005) Situação da produção de tomate no Brasil e no Mundo entre 1994 e 2003. *Resumo do Congresso Brasileiro de Olericultura*, 45, Fortaleza, SOB, Horticultura Brasileira. V.23. p. 350.

Rick, C.M. (1982) The potencial of exotic germplasm for tomato improvement. *In*: Vasil, I.K., Scowcrot, W.R., Frey, H.J. (eds.) *Plant improvement and somatic cell genetics*. New York: Acad. Press, p. 478-495.

Rick, C.M. (1991) Tomato paste: A concentrated review of genetic highlights from the beginning to the advent of molecular genetics. *Genetics*, 128:1-5.

Rick, C.M., Holle, M. (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. *Econ. Bot.* 44:69-78.

Rick, C.M., Laterrot, H., Philouze, J. (1990) A revised key for the *lycopersicon* species. *TCG Reporter*, 40:31-33.

Roja, R., Corona, B., Rivas, J.D. (1994) RAPD y polimorfismo genético. *Cultivos Tropicales*, 15 (1):82-84.

Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P., Vosman, B. (1994) Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, 37:375-381.

Saavedra, G., Spoor, W., Harrier, L. (2001) Molecular markers and genetic base broadening in *Lycopersicon* spp. *Acta Hort.* 546:503-507.

Saavedra, G., Spoor, W. (2002) Genetic base broadening in autogamous crops: *Lycopersicon esculentum* Mill. as a Model. *Managing Plant Genetic Diversity.* 443:291-299.

Sakama (2007) Sementes sakama. Fornecendo produtos de qualidade: catálogo; <http://www.sementessakama.com.br> em 05/06/2007.

Shibata, D. (2005) Genome sequencing and functional genomics approaches in tomato. *Genetic Plant Pathologic*, Japan, 71:1-7.

Silva, F.F. (2006) *Abordagem clássica e molecular do melhoramento genético do mamoeiro (Carica papaya L.)*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 133p.

Silva, J.B.C., Giordano, L.B. (2000) Produção Mundial e Nacional. *In: Silva, J.B.C., Giordano, L.B. (eds.) Tomate para processamento industrial*. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa Hortaliças, 168p.

Silva, J.H., Mattedi, A.P., Marim, B.G., Moreira, G.R., Abreu, F.B., Yuhaz, A.C.P., Ribeiro, N.B. (2006) Recursos genéticos de tomateiro. *In: Lima, M.C. (org.) Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais*. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 190p.

Spooner, D., Van Treuren, R., Vicente, M.C. (2005) Molecular markers for genebank management. IPGRI. Technical Bulletin, n. 10, International Plant Genetic Resources Institute, Italy; www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/1082.pdf .

Statistica (1995) Programa Statistica for Windows (versão 5.0) StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA.

Sudré, C.P. (2003) *Divergência genética e avaliação da resistência à mancha bacteriana em Capsicum spp.* Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) –

Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 112p.

Sudré, C.P., Cruz, C.D., Rodrigues, R., Riva, E.M., Amaral Júnior, A.T., Silva, D.J.H., Pereira, T.N.S. (2006) Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 24 (1):88-93.

Takeota, G.R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D.M., Jewell, W.T., Huebner, B., Berton, D., Ebeler, S.E. (2001) Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 49:3713-3717.

Tanaka, K., Nishitani, A., Akashi, Y., Sakata, Y., Nishida, H., Yoshino, H., Kato, K. (2007) Molecular characterization of south and east Asian melon, *Cucumis melo* L., and the origin of group Conomon var *makuwa* and var. *conomon* revealed by RAPD analysis. *Euphytica*, 153:233-247.

Tanksley, S.D., McCouth, S.R. (1997) Seed banks molecular maps: unlocking genetic from the wild. *Science*, 227:1063-1066.

Tardin, F.D., Amaral Junior, A.T., Pereira, M.G., Vidigal, M.C.G., Daher, R.F., Scapim, C.A. (2003) Genetic diversity and determination of the optimum number of RAPD markers in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Acta Scientiarum*, Maringá, 25 (1):1-5.

Valois, A.C.C., Nass, L.L., Góes, M. (2001) Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: Nass, L.L., Valois, A.C.C., Melo, I.S., Valadares-Ingliš, M.C. (eds.) *Recursos genéticos e melhoramento – plantas*. Rondonópolis, MT: Fundação MT, p. 123-149.

Van Hintum, J.I.T., Vissen, D.I. (1995) Duplication within and between germplasm collections II. Duplication in four European barley collections. *Genetic resources and crop evolution*, 42:135-145.

Valls, J.F.M. (1988) Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma. *Anais do Encontro sobre Recursos Genéticos*. Jaboticabal: FCAV, p. 106-120.

- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Souza, M.M., Maldonado, J.F.M., Amaral Júnior, A.T. (2003) Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinadas por marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25 (3):489-493.
- Villand, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G., Niemhuis, J. (1998) Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Sci.* 38:1339-1347.
- Zamir, D., Tanksley, S.D. (1988) Tomato genome is comprised largely of fast-evolving, low copy number sequences. *Mol. Gen. Genet.* 213:254-261.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.
- Williams, C.E., St Clair, D.A. (1993) Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 36:619-630.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Yang, X., Quiros, C.F. (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 86 (2/3):205-212.
- Yu, S.B., Xu, W.J., Vijayakumar, C.H.M., Ali, J., Fu, B.Y., Xu, J.L., Jiang, Y.Z., Marghirang, R., Domingo, J., Aquino, C., Virmani, S.S., Li, Z.K. (2003) Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the international rice molecular breeding program. *Theor. Appl. Genet.* 108:131-140.