Silva Lusitana ***10****(1): 53 - 61, 2002*
© EFN, Lisboa. Portugal

Caracterização Molecular de Proveniências de *Pinus pinea* L. por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)[1]

Isabel Evaristo*, Rita Costa Seabra, José Baeta*** e Maria Salomé Pais******

* Assistente de Investigação
Estação Florestal Nacional. Departamento de Silvicultura e Produtos Florestais
Investigador Auxiliar, * Assessor Principal
Estação Florestal Nacional. Departamento de Ecofisiologia e Melhoramento Florestal.
Quinta do Marquês, Av. da República 2780-159 OEIRAS
****Professora Catedrática
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Departamento de Biologia Celular e Biotecnologia Vegetal. Campo Grande, 1749-016 LISBOA

Sumário. Em 1993 a Estação Florestal Nacional estabeleceu, em Sines, um ensaio com 25 proveniências de pinheiro manso. Foram utilizadas sementes oriundas de sete países da Bacia Mediterrânica: Portugal, Espanha, Itália, Grécia, Marrocos, Turquia e Israel. De cada proveniência foram plantadas 25 árvores, repetidas por seis blocos casualisados o que perfaz um total de 3750 árvores numa área de 0,75 ha.

Das 25 proveniências, foram seleccionadas 22, para estudos de caracterização molecular através de análise de RAPD[2]. Os perfis de RAPD obtidos, utilizando quinze primers, revelaram cerca de 51,5% de bandas polimórficas.

A análise estatística revelou que, das 22 proveniências analisadas, 12 são muito próximas, constituindo um grupo central, com provável origem comum, não sujeita à selecção resultante de melhoramento florestal. As restantes 10 proveniências, situam-se em 3 grupos diferentes, sugerindo que tenham sido seleccionadas a partir dos indivíduos do grupo central. O valor mais elevado de diversidade genética foi obtido para as proveniências italianas enquanto que o valor mais baixo foi obtido para as proveniências portuguesas.

Palavras-chave: diversidade genética; distância genética; pinheiro manso; marcadores moleculares

Abstract. In 1993, "Estação Florestal Nacional" set up an experiment at Sines, with 25 stone pine provenances. Seeds from seven countries from the natural Mediterranean basin were used: Portugal, Spain, Italy, Greece, Morocco, Turkey and Israel. A total of 3750 trees were planted, 25 trees from each provenance, in six randomly repetitive blocks in an area of 0.75 ha.

---

1 Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto PIDDAC "Caracterização molecular de genótipos seleccionados de pinheiro manso para o controlo da qualidade de pinhão"

2 Abreviaturas: AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) cpSSR (Chloroplast Single Sequence Repeats); PCR (Polymerase Chain Reaction); RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); uv (ultra violeta)

1º Autor E-mail: isabel.evaristo@efn.com.pt

We selected 22 of the 25 provenances for molecular characterisation by RAPD. The RAPD profiles revealed about 51.5% of polymorphic fragments with 15 different primers. The statistical analyses revealed that twelve of the 22 provenances tested were very close, constituting a central group, probably with a common origin, not subjected to selection resulting from a breeding programme. The other ten provenances fall into three different groups, suggesting that they had been selected from the central group. The highest genetic diversity value was found in the Italian provenances, while the lowest value was found in the Portuguese provenances.
Key words: genetic diversity; genetic distance; stone pine; molecular markers

Résumé. En 1993, la "Estação Florestal Nacional" a implanté, à Sines, un essai avec 25 provenances de pin pinier. Des lots de graines originaires de sept Pays Méditerranéens ont été utilisés: Portugal, Espagne, Italie, Grèce, Maroc, Turquie et Israël. De chaque provenance 25 arbres ont été plantés par bloc, avec six répétitions ce qui représente un total de 3750 arbres en 0.75 ha. Parmi les 25 provenances 22 ont été sélectionnées pour la caractérisation moléculaire par RAPD. Les RAPD obtenus, en utilisant 15 oligonucléotides initiateurs (primers), ont révélé près de 51.5% de polymorphisme.

L'analyse statistique a démontré que des 22 provenances analysées 12 sont très semblables et constituent un groupe central probablement avec une origine commune non soumise à la sélection résultante de l'amélioration génétique forestière. Les dix autres provenances sont distribuées en trois groupes différents, ce qui nous porte à croire qu'elles aient été sélectionnées, dans le groupe central. La teneur la plus élevée en diversité génétique a été signalée pour les provenances italiennes et, la plus basse pour les Portugaises.
Mots clés: diversité génétique; distance génétique; pin pinier; marqueurs moléculaires

Introdução

O pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) é uma espécie particularmente bem adaptada ao clima da zona mediterrânea. A sua área actual circunscreve-se à orla do Mediterrâneo, incluindo Portugal, Crimeia, Sul do Caúcaso e Síria. Julga-se que, inicialmente, a sua área estava circunscrita à Costa do Levante Mediterrâneo (Creta e Anatólia), tendo-se depois expandido por toda a zona ocidental, principalmente na época das colónias mercantis dos fenícios e gregos e, mais tarde, durante o império romano.

As áreas mais importantes de cultivo desta espécie situam-se em Espanha, Portugal, Itália, Grécia e Turquia. Em Portugal ocupa uma área de 78 188 ha dispersa por áreas geográficas distintas, definidas e caracterizadas segundo seis regiões de proveniência (CARNEIRO *et al.*, 1998). O distrito de Setúbal é aquele em que a sua expressão é mais acentuada graças às condições edafo-climáticas.

A sua exploração tem sido tradicionalmente orientada para diversos fins: produção de madeira, resina e, em particular, a produção de fruto que representa, actualmente, a principal fonte de rentabilidade desta espécie.

Nos últimos anos, têm sido utilizadas abordagens moleculares na caracterização da diversidade genética de espécies florestais, nomeadamente em espécies da família Pinaceae, (GONZALEZ-MARTINEZ *et al.*, 1999; ANZIDEI *et al.*, 1999) abrindo novas possibilidades a estudos de caracterização molecular e de diversidade genética. A diferença no modo de transmissão do genoma cloroplastidial é referida como responsável pela maior diversidade genética nas populações de folhosas do que nas de resinosas (VENDRAMIN *et al.*, 1999).

A caracterização de genótipos de

pinheiro manso, foi efectuada utilizando marcadores bioquímicos: isoenzimas (FALLOUR, *et al.*, 1997) e marcadores moleculares: microsatélites de cloroplasto (GÓMEZ *et al.*, 2000; VETTORI *et al.*, 2001). FALLOUR *et al.* (1997), testaram 37 sistemas enzimáticos em 10 populações provenientes do Mediterrâneo Norte, não tendo sido possível agrupar as diferentes populações, em função das frequências dos alelos de ME (enzima málica) e da distribuição geográfica desta espécie.

Segundo GÓMEZ *et al.* (2000) a diferenciação entre 10 populações naturais espanholas é baixa. Estes autores encontraram maior diversidade genética dentro da mesma população, recorrendo ao estudo de microsatélites de cloroplasto cpSSR.

Utilizando nove microsatélites cpSSR, VETTORI *et al.* (2001), não detectaram polimorfismo, na avaliação da diversidade genética intra e inter populacional, em 15 povoamentos de *Pinus pinea.* Este resultado foi atribuído a uma forte influência antrópica (provavelmente derivado de misturas de lotes de sementes provenientes de várias origens).

Este trabalho insere-se num programa de estudo da estrutura genética da espécie *Pinus pinea* a nível regional e nacional, cujos objectivos são: verificar se a variação entre populações estará relacionada com as origens geográficas da espécie; comparar o comportamento das diferentes proveniências, face a diferentes factores com vista à identificação das populações melhor adaptadas a diferentes regiões ecológicas. Os resultados obtidos permitirão uma melhor gestão futura de povoamentos de *Pinus pinea.*

Neste trabalho reportam-se os resultados do estudo molecular por RAPD de 22 proveniências de pinheiro manso, uma vez que a sua simplicidade e rapidez permitem identificar grande número de polimorfismos de DNA, distribuídos ao longo do genoma. LEIBENGUTH e SHOGHI (1998), consideram os RAPDs um método de excelência para análise de populações de coníferas.

Material e métodos

Material vegetal

Foram utilizadas 22 proveniências de pinheiro manso oriundas da Bacia Mediterrânea. Cada proveniência é composta por 25 árvores diferentes: Portugal (PPL, PVFC, PAM, PVM, PASE) Espanha (EAN, ECC), Itália (ICC, IDF, ITCE), Grécia (GST), Marrocos (MCSP, MDA, MKH, MAG), Turquia (TYK, TAK, TSRK, TKML, TYL), e Israel (ISMC1, ISMC2) localizadas numa estação experimental situada no Perímetro Florestal da Área de Sines à latitude de 38º01'N, longitude de 8º42'W e altitude de 228m (Quadro 1). A temperatura anual média é de 18ºC, a precipitação anual média é de 719,4 m. O solo é um Regossolo Psamítico, não húmido, de arenitos Podzolizados (CARNEIRO *et al.*, 2000).

Extracção de DNA

As agulhas jovens e expandidas, de cada proveniência, foram mantidas a -80ºC após colheita até à extracção de DNA.

A extracção do DNA genómico foi efectuada utilizando o protocolo da Plant DNeasy Mini Kit (Quiagen). As concentrações de DNA foram calculadas em gel de agarose a 0,8% com 0,2µg.ml^{-1} de brometo de etídeo por comparação com um marcador de fragmentos de tamanho conhecido (Lambda DNA Gibco BRL).

Quadro 1 - Distribuição geográfica das proveniências de pinheiro manso analisadas neste trabalho

Código	Nº	Proveniência	País	Lat (ºN)	Long. (ºE)	Alt. (m)	Precip. (mm)
EAN	25	Andaluzia	Espanha	36 20′	65′	631	-
ECC	27	Cordilheira Central	Espanha	40 30′	4 20′	1007	-
GST	2	Strophilia	Grécia	38 08′	21 22′	20	748
ICC	4	Cecina	Itália	43 45′	29′	2-4	847
IDF	18	Duna Felicia	Itália	42 02′	12 27′	5	-
ITCE	6	Tomboli di Cecina	Itália	43 09′	11 17′	5	-
ISMC1	13	Monte Carmelo	Israel	32 45′	35′	400	600
ISMC2	8	Monte Carmelo	Israel	32 45′	35′	400	600
MAG	7-	Air Grana	Marrocos	37 46′	27 23′	970	960
MCSP	14	Cap Spartel	Marrocos	35 4′	5 53′	200-1300	887
MDA	20	Dunes D′ Adjir	Marrocos	25 13′	3 54′	10	300
MKH	1	Koudia Hamra	Marrocos	35 16′	5 33′	25	594
PAM	11	Amarante	Portugal	41 18′	8 06′	245	1250
PASE	5	Alc. Sal/Ervideira	Portugal	38 15′	8 30′	100	-
PPL	9	Ponte de Lima	Portugal	41 46′	8 36′	300	-
PVFC	22	Viseu/Fig. Campo	Portugal	40 40′	7 54′	443	-
PVM	10	Vieira do Minho	Portugal	41 41′	8 06′	750 800	-
TAK	16	Aydin-Karine	Turquia	37 46′	27 23′	450	-
TKML	17	Kumluca	Turquia	36 17′	30 20′	5	-
TSRK	19	Serik	Turquia	36 52′05	31 01′	10	-
TYK	12	Yatagan-katranci	Turquia	37 27′	27 55′	100	-
TYL	15	Yalova	Turquia	48 32′	29 22′	500	-

Prepararam-se soluções de DNA de concentração 60 ng.µl^{-1} e conservaram-se a –20ºC, sendo ulteriormente utilizadas nas reacções de amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction).

Protocolo RAPD (Williams *et al.*, 1990)

Foram testados um total de quarenta oligonucleótidos iniciadores (primers) com uma sequência arbitrária de dez bases (Kits A, C e H da Operon Tecnologies).

As soluções de reacção, com um volume total de 25 µl, eram compostas por uma unidade de Taq DNA polimerase, tampão de reacção fornecido pelo fabricante da enzima, 2,5mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc), 0,2 µM de iniciador e 30 ng de DNA genómico.

A amplificação realizou-se num termociclador (Biometra) segundo o protocolo de WILLIAMS *et al.,* (1990), optimizado para a espécie *Pinus pinea* L., com a seguinte programação: 5 min a 95ºC para desnaturação da dupla cadeia de DNA, seguido de 44 ciclos de 1 min a 95ºC (desnaturação), 1min a 35ºC (emparelhamento dos primers) e 1min a 72ºC (extensão do primer), finalizando com 5min a 72ºC, para extensão final de todas as cadeias simples.

Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose 1,5%,(Gibco BRL) com 0,2µg.ml^{-1}

de brometo de etídeo.

Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, a imagem integrada e analisada através do software de análise molecular (BIO-RAD).

Para cada um dos iniciadores seleccionados, a reacção foi repetida, pelo menos três vezes, para garantir a reproducibilidade dos resultados.

Análise de dados

Os dados foram colocados numa matriz com variáveis mudas permitindo, segundo GOWER (1966), a utilização de um algoritmo de análise de componentes principais (ACP). Neste tipo de análise escolheram-se os grupos principais. A classificação pelo método de Ward, através das distância Euclideanas, é a que mais se aproxima da ACP obtida (WARD, 1963).

A avaliação da diversidade genética das diferentes proveniências foi efectuada por aplicação do índice de diversidade de Shannon (JERROLD, 1996).

Resultados

O método de extracção foi adequado para o isolamento de DNA de agulhas jovens de pinheiro manso. A concentração, bem como a qualidade de DNA obtidas, foram suficientes para várias reacções de amplificação por PCR (Figura 1).

Os produtos de amplificação obtidos foram reproductíveis, após diferentes reacções de PCR.

Dos quarenta iniciadores testados foram seleccionados quinze (OPA_{01}, OPA_{02}, OPA_{04}, OPA_{06}, OPA_{07}, OPA_{10}, OPA_{12}, OPA_{15}, OPA_{16}, OPA_{17}, OPA_{20}, OPC_{09}, OPC_{08}, OPC_{16}, OPH_{01}) de acordo com o número máximo de produtos de amplificação obtidos (Figura 2).

A dimensão dos fragmentos amplificados situou-se entre os 250 e 3000 pb.

Pela análise do quadro 2 pode verificar-se que, consoante o primer utilizado, assim se obtém um maior ou menor número de polimorfismos, sendo o primer OPA_{06} aquele que deu origem a um maior número de bandas polimórficas (91%) e o primer OPA_{17} aquele que deu origem a um menor número de bandas polimórficas (7%). De um total de 198 bandas de RAPDs, obtidas por amplificação com os 15 primers, 102 são polimórficas, correspondendo a cerca de 51,5% de polimorfismo.

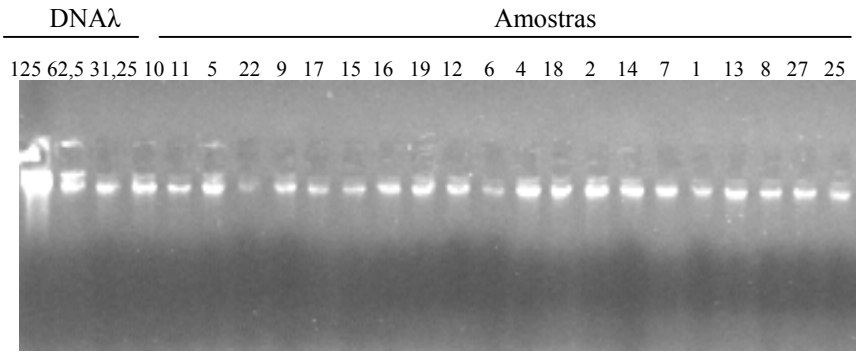

Figura 1 - DNA total obtido após extracção com Plant Dneasy Kit (Quiagen).Comparação com marcador λ de concentração conhecida (125, 62,5, 31,25 ng/µl)

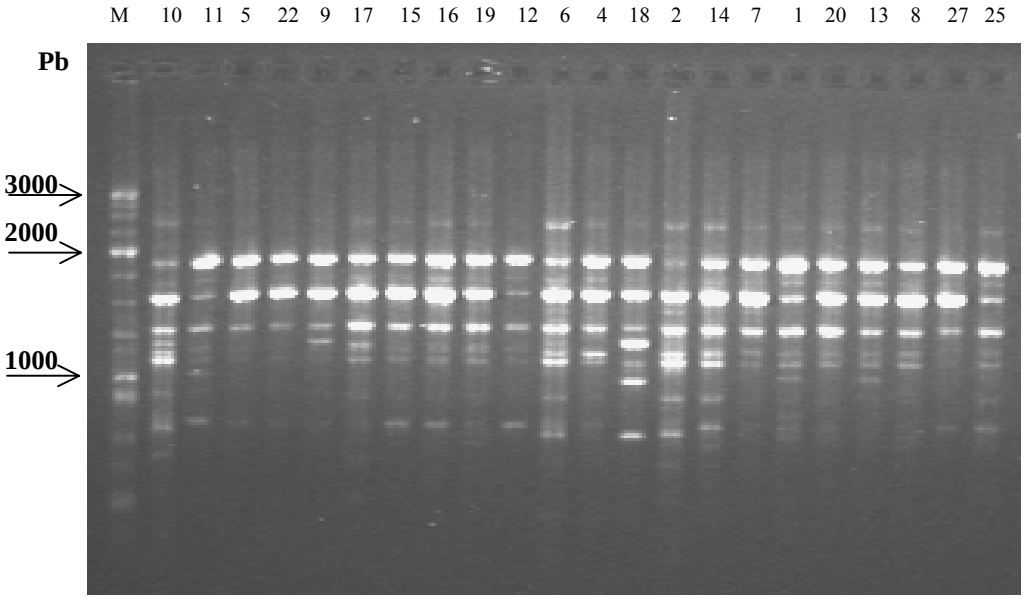

Figura 2- Produtos de amplificação obtidos a partir de DNA genómico de 22 proveniências de *Pinus pinea* utilizando o oligonucleótido iniciador OPH_{01} e M Marcador molecular (250-3000 pares de bases)

Quadro 2 - Sequência e número de bandas obtidas pelos iniciadores seleccionados para amplificação de DNA de proveniências de pinheiro manso

Iniciador	Sequência 5'→3'	N.º RAPDs	N.º polimorfismos
OPA_{01}	CAGGCCCTTC	9	3
OPA_{02}	TGCCGAGCTG	16	13
OPA_{04}	AATCGGGCTG	12	4
OPA_{06}	GGTCCCTGAC	23	21
OPA_{07}	GAAACGGGTG	15	8
OPA_{10}	GTGATCGCAG	9	5
OPA_{12}	TCGGCGATAG	10	4
OPA_{15}	TTCCGAACCC	12	6
OPA_{16}	AGCCAGCGAA	12	6
OPA_{17}	GACCGCTTGT	14	1
OPA_{20}	GTTGCGATCC	11	3
OPC_{08}	TGGACCGGTG	15	7
OPC_{09}	CTCACCGTCC	13	9
OPC_{16}	CACACTCCAG	13	4
OPH_{01}	GGTCGGAGAA	14	8
TOTAL		198	102

A utilização de um algoritmo de análise de componentes principais levou à obtenção de quatro grupos, representados na figura 3, com o índice de dissemelhança de 0,7.

A análise estatística revelou que os grupos mais diferenciados são os três primeiros (Grupos I, II e III), que se individualizam do grupo central (grupo IV) (Figura 3).

Em relação à diversidade genética, o valor mais elevado foi obtido para o grupo das três proveniências italianas (H=0,89) e o mais baixo para o grupo das cinco proveniências portuguesas (H=0,82). Para as restantes proveniências, foram obtidos valores intermédios: H=0,88 para as proveniências de Marrocos, H=0,87 para as proveniências da Turquia e H=0,85 para as proveniências de Espanha e Israel.

A universalidade da maioria dos marcadores cpSSR (microsatélites de cloroplasto) definidos para o *Pinus thunbergii* (VENDRAMIN et *al.*, 1996) foi confirmada em muitas espécies de Pinaceae (LEFORT *et al.*, 1999). Neste sentido, já foram iniciados trabalhos com microsatélites de cloroplasto tendo sido analisado, apenas o par de sequência homóloga *Pt 41093*

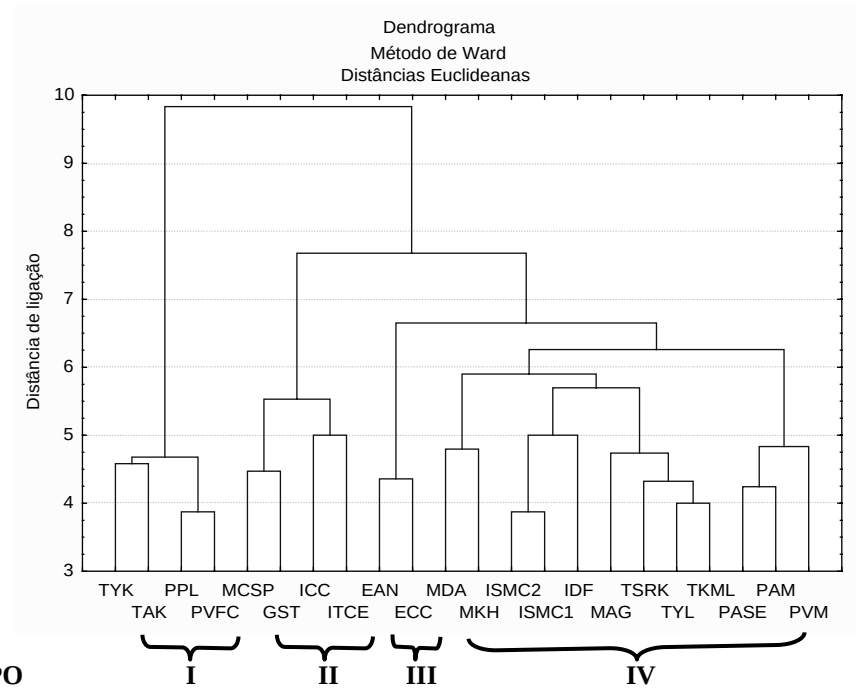

Figura 3 - Dendrograma das 22 proveniências de *Pinus*, obtido para 15 primers, utilizando o método de Ward, através das distância Euclideanas.

Discussão

Não foi encontrada variação apreciável nos perfis de RAPD, obtidos para as 22 proveniências, analisadas com 15 primers, (cerca de 50% de bandas polimórficas). Estes resultados são concordantes com os obtidos para outras espécies do género *Pinus* por diferentes autores (GÓMEZ, *et al.*, 2000; VETTORI, *et al.,* 2001). Porém, para as populações portuguesas de *Pinus pinaster*, foi obtida uma alta variação intra-específica e diferenciação genética, usando diferentes tipos de marcadores (RIBEIRO, 2001).

Através da análise efectuada pelas distâncias euclidianas, verificou-se que os indivíduos do grupo central, constituído pelas proveniências MDA, MKH, ISMC2, ISMC1, IDF, MAG, TSRK, TYL, TKML, PASE, PAM e PVM, são muito próximos, sugerindo uma origem comum e não sujeita à selecção, resultante de melhoramento florestal. O grupo I, com as proveniências TYK, TAK, PPL, PVFC, o grupo II com as proveniências MCSP, GST, ICC e ITCE e o grupo III, com as proveniências EAN e ECC, aparentam ter sido seleccionadas a partir dos indivíduos do grupo central. Confrontando estes dados com os obtidos para as mesmas proveniências, com marcadores fenotípicos (acréscimos em altura e floração) por outros autores (CARNEIRO *et al.*, 2000), não se verifica aparentemente uma correlação. A menor diversidade genética obtida para as proveniências portuguesas, poderá ser explicada pela reduzida área de distribuição da espécie a nível nacional. Apesar de esta espécie se encontrar representada em todo o território nacional, os povoamentos com maior importância, em termos de produção, situam-se na região a sul do Tejo. Desta forma, a actividade humana poderá ter contribuído para acentuar o fluxo genético, diminuindo a diferenciação genética das populações portuguesas. Se bem que aparentemente não exista uma correlação entre os marcadores de RAPD, aqui apresentados, e os marcadores fenotípicos, já disponíveis para as mesmas proveniências, é importante realçar que os marcadores fenotípicos disponíveis foram obtidos em plantas com cinco anos apenas. É a partir desta idade que se começam a manifestar eventuais variações na capacidade de crescimento, das diferentes proveniências, nomeadamente nos acréscimos em altura e na floração (CARNEIRO *et al.*, 2000).

A variação alélica detectada com o locus *Pt 41093,* em quatro proveniências de pinheiro manso (Israel, Espanha, Portugal, Marrocos) foi: 82 pb, 82 pb, 83 pb, 84 pb, confirmando os dados obtidos, para a mesma espécie, por GÓMEZ *et al.*, 2000. Os resultados obtidos neste estudo, deverão ser considerados como uma primeira abordagem à caracterização molecular de 22 proveniências de Pinheiro manso. As diferentes proveniências serão ulteriormente analisadas, recorrendo a outros marcadores moleculares (AFLP e microsatélites de cloroplasto). A variabilidade genética obtida com os diferentes marcadores será comparada.

Bibliografia

ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., SPERISEN, C., ZIEGENHAGEN, B., VENDRAMIN, G.G., 1999. Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of

diversity in conifer species In *Which DNA marker for which purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FWIV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity* Gillet, E.M. (ed). http://webdac.sub.gdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index htm.

CARNEIRO, M.M., d'ALPUIM, M., BAETA, J., ROCHA, M.E., CARVALHO, M.A.V., 2000. Ensaios de proveniência de pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) resultados dos cinco primeiros anos I. Acréscimos em altura In *Actas 1er Simposio del Pino Piñonero*, Valladolid, pp. 129-137.

CARNEIRO, M.M. d'ALPUIM, M., ROCHA, M.E., CARVALHO, M.A.V., 1998. Delimitação e caracterização de regiões de proveniência de *Pinus pinea* L. em Portugal *Silva Lusitana* **6**(2) : 129-263.

FALLOUR, D., FADY, B., LEFEVRE, F., 1997. Study on isozime variation in Pinus pinea L.: evidence for low polymorphism. *Silva Genetica* **46**(4) : 201-207.

GÓMEZ, A, AGUIRIANO, E., BUENO, M.A., ALÍA, R. 2000. Microsatélites del cloroplasto en *Pinus pinea* L. In *Actas 1er Simposio del Pino Piñonero*, Valladolid, pp. 39-46.

GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., AALIA, R., GIL, L., 1999. Genetic differentiation in 19 native populations of *Pinus pinaster* Ait. A comparison of molecular and quantitative traits In: *Proc. of International Congress "Applications of Biotechnology to Forest Genetics,"* Vitoria-Gasteiz, Spain, pp. 115-117.

GOWER, J.C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53** : 325-338.

JERROLD, H.ZAR, 1996. In *Biostatistical Analysis* 3ªed., Prentice-Hall International

LEFORT, F., ECHT, C., STREIFF, R., VENDRAMIN, G.G., 1999. Microsatellite sequence: a new generation of molecular markers for forest genetics. *Forest genetics* **6**(1) : 15-20.

LEIBENGUTH, F., SHOGHI, F., 1998. Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA markers in Three Conifer Species. *Silva Genetica* **47**(2-3) : 120-126.

RIBEIRO, M.M., 2001. *Genetics of* Pinus pinaster *Aiton with Cytoplasmic and Nuclear Markers*. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Umea. pp.103.

VENDRAMIN, G.G., LELLI, L., ROSSI, P., MORGANTE, M., 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae. Molecular Ecology* **5**(4) : 595-598.

VENDRAMIN, G.G., ANZIDEI, M., FINESCHI, S., MADAGHIELE, A., PETIT, R. J., ZIEGENHAGEN, B., 1999. Distribution of the haplotypic diversity in conifer and broadleaved species as revealed by chloroplast microsatellites. In *The Application of Molecular Genetics and Biotechnology in Conservation and with Novel Species.* http:users.ox.ac.uk/~dops0022/conference/conserve.htm

VETTORI, R., PAFFETTI, C., ANZIDEI, M., VENDRAMIN, G., GIANNINI, R., 2001. Analisi e conservazione della biodiversita in alberi forestali. Progetto Strategico Biodiversità. http://biodiversita.ba.cnr.it/gian00-file/gian00.htm

WARD, J.H. .Jr., 1963. Hierarchical grouping to optimise an objective function. *J Amer. Stat. Ass.* **58** : 236-244.

WILLIAMS, J. G., 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**(22) : 6531-6535.

Submetido para publicação em Março de 2002
Aceite para publicação em Maio de 2002