

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ FELIPE BERNERT

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS VIA ISSR E IDENTIFICAÇÃO
DO SEXO DE “SEEDLINGS” DE LÚPULO

CURITIBA

2018

ANDRÉ FELIPE BERNERT

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS VIA ISSR E IDENTIFICAÇÃO
DO SEXO DE “SEEDLINGS” DE LÚPULO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps

CURITIBA

2018

B525d Bernert, André Felipe
Diversidade genética de acessos via ISSR e identificação do sexo de "seedlings" de lúpulo / André Felipe Bernert. - Curitiba, 2018.
47 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - (Produção Vegetal).
Orientador: Cícero Deschamps

1. Lúpulo. 2. Diversidade genética. 3. Marcador molecular - Similaridade genética. 4. Variabilidade genética. 5. Mudas. I. Deschamps, Cícero. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 633.791



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRE FELIPE BERNERT** intitulada: **DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS VIA ISSR E IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE 'SEEDLINGS' DE LÚPULO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 03 de Abril de 2018.

DICERO MESCHAMPS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARILIA PEREIRA MACHADO
Avaliador Externo (UFPR)

JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO
Avaliador Interno (UFPR)

JULIANA DEGENHARDT-GOLDBACH
Avaliador Externo (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Lenise e Marcos, que me deram todo o carinho e incentivo e não mediram esforços para me ajudar quando precisei, acreditando sempre na minha capacidade.

A minha irmã Danielli e Cunhado Bruno, pelo companheirismo e suporte sempre que precisei.

A minha namorada, Beatriz, que permaneceu sempre ao meus lados nos momentos difíceis e ruins,

Ao meus orientador e professor Cícero Deschamps, por ter me mostrado um novo mundo de conhecimento e pelos seus ensinamentos.

A Dr. Marília Machado pelo convívio, amizade e sugestões que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade da realização do curso de Mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceber a bolsa de mestrado.

Aos Amigos de longa data, Giovanni, Henrique, Caroline, André e primos Fernando e Newton que estavam presentes e acompanharam cada passo e dificuldades durante todo o período de mestrado.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O lúpulo é uma espécie vegetal com importância econômica a nível mundial devido à utilização na indústria cervejeira. A identificação do lúpulo é de grande importância pois permite o diagnóstico antecipado do sexo das plantas de lúpulo, antes mesmo de chegar na fase de florescimento. Tendo uma caracterização do sexo antecipada, irá ajudar tanto no planejamento da produção quanto na melhoria da seleção no processo de melhoramento. Portanto, este trabalho teve como objetivo a seleção de primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e análise da similaridade genética de 17 acessos de lúpulo coletados no Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, além da identificação do sexo de 75 seedlings através de dois marcadores moleculares macho-específicos. As temperaturas de anelamento foram avaliadas em 20 primers para cálculo dos seguintes índices: PIC (índice de conteúdo polimórfico), MI (índice do marcador) e RP (Poder de resolução). A amplificação ocorreu em 13 primers, tendo uma variação de temperatura de anelamento de 47°C (OLIGO 2), 50°C (UBC 848, UBC 880, MAO, OMAR e JOHN), 53°C (BECKY, CHRIS e MANNY) e 56°C (UBC 808, UBC 827, OLIGO 1 e OLIGO 3). Os valores de PIC tiveram variação de 0,0194 a 0,4908, MI de 0,1164 a 4,8994 e RP de 0,6875 a 17,2941. A similaridade genética existente entre os acessos, variou de 30% a 52,83%, o que evidencia alta variabilidade entre os acessos analisados. O agrupamento destes acessos foi realizado pelo método UPGMA calculando-se o coeficiente de Jaccard, formando assim cinco grupos distintos, sendo dois deles compostos somente com um acesso. O resultado da correlação cofenética (CCC) demonstrou associação de 82%, sendo assim, pode-se confirmar que o método de agrupamento foi adequado. Na identificação sexual pela seleção assistida por marcadores moleculares, identificou-se entre os 75 genótipos testados, 46 fêmeas e 29 machos.

Palavras-chave: *Humulus lupulus*. DNA. Repetições entre sequências simples. Variabilidade. Marcadores macho-específicos.

ABSTRACT

Hop is a plant species of economic importance worldwide because of their use in the brewing industry. Identification of hops is of great importance as it allows the early diagnosis of the sex of hop plants, before even reaching the flowering stage. Having an early sex characterization, it will aid both in production planning and in improving selection in the breeding process. Therefore, the objective of this work was the selection of ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) primers and analysis of the genetic similarity of 17 hop accesses collected in Paraná, Rio Grande do Sul and São Paulo, as well as identifying the sex of 75 seedlings through two male-specific molecular markers. The annealing temperatures were evaluated in 20 primers to calculate the following indices: PIC (index of polymorphic content), MI (marker index) and RP (resolution power). The amplification occurred in 13 primers, having annealing temperature variation of 47 °C (OLIGO 2), 50 °C (UBC 848, UBC 880, MAO, OMAR s JOHN), 53 °C (Becky, Chris and Manny) and 56°C (UBC 808, UBC 827, OLIGO 1 and OLIGO 3). PIC values ranged from 0.0194 to 0.4908, MI from 0.1164 to 4.8994 and RP from 0.6875 to 17.2941. The genetic similarity between the accesses ranged from 30% to 52.83%, which shows a high variability among the accesses analyzed. The grouping of these accesses was performed by the UPGMA method, calculating the Jaccard coefficient, forming five distinct groups, two of them composed only with one access. The result of the cofenetic correlation (CCC) showed an association of 82%, so it can be confirmed that the grouping method was adequate. In the sexual identification by selection assisted by molecular markers, it was identified among the 75 genotypes tested, 46 females and 29 males.

Key-words: *Humulus lupulus*. DNA. *Inter simple Sequence Repeats*. Variability. Male-specific markers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Aspectos da morfologia das inflorescências de lúpulo A) Inflorescências femininas maduras (cones), B) Inflorescência feminina imatura e C) Corte longitudinal de uma inflorescência feminina, dando destaque a bráctea e a lupulina..... 4
- Figura 2: Padrão de amplificação de bandas consideradas com bom grau de resolução e amplificação de bandas considerados com baixo grau de resolução. 21
- Figura 3 – Perfil eletroforético dos primers OLIGO1, BECKY, JOHN e OLIGO 2, com suas respectivas temperaturas de anelamento escolhidas, em 4 diferentes acessos (acessos 1, 5, 17 e 21)..... 26
- Figura 3 – Padrão de amplificação do primer ISSR UBC 880 em gel de agarose nos 17 acessos de lúpulo testados. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb e a seta indica o fragmento de 1000 pb 27
- Figura 4 – Dendograma obtido com o método UPGMA, baseado no índice de similaridade de Jaccard, para os acessos de lúpulo. 32
- Figura 5 – padrão de amplificação dos 75 genótipos testados de lúpulo. Genótipos que obtiveram formação de bandas foram caracterizados como machos, assim como no controle positivo indicado pela seta.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção em toneladas e porcentagem de produção dos principais países produtores mundiais de lúpulo.....	6
Tabela 2: Consumo anual de litros por habitante dos principais consumidores de cerveja do mundo.....	8
Tabela 3 – Acessos de lúpulo utilizados com suas respectivas características (cultivar e sexo).....	20
Tabela 4 – Lista de primers testados e as suas respectivas sequências de nucleotídeos.	22
Tabela 5 – Relação dos primers ISSR que obtiveram formação de bandas com as suas sequências de nucleotídeos e as suas respectivas temperaturas de anelamento.....	25
Tabela 6 – Primers ISSR com suas respectivas sequências de nucleotídeos e o número de bandas obtidas. Primers com nomes em negrito representam aqueles que foram selecionados para a análise genética e cálculo dos parâmetros. ...	28
Tabela 7 – Valores de índice de conteúdo polimórfico (PIC), Multiflex Eficaz (EMR), Índice do marcador (MI) e poder de resolução (RP) de cada um dos respectivos primers selecionados..	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	ASPECTOS GERAIS DA CULTURA.....	3
2.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	5
2.3	DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES	8
2.4	MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERGENCIA GENÉTICA DE LÚPULO.....	15
2.5	IDENTIFICAÇÃO DO SEXO VIA MARCADORES MOLECULARES ..	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÕES	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
7	REFERENCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

O *Humulus lupulus L.* é uma espécie dióica que pertence à família Cannabaceae, com importância econômica principalmente pela utilização na indústria cervejeira, sendo cultivadas cultivares europeias e norte americanas (HEALE et al., 1989). O lúpulo, como é popularmente chamado, produz inflorescências femininas denominada de cones, os quais contém α -ácidos, β -ácidos e óleos essenciais responsáveis em dar o aroma e sabor às cervejas. Além dessa grande importância na indústria cervejeira, o lúpulo é altamente explorado como planta medicinal, indicada para tratamentos contra doenças (NATIONAL HOP ASSOCIATION OF ENGLAND, 2001), onde suas folhas e flores são ingredientes para a produção de chás, infusões e banhos (BEER & HEALTH DOSSIERS, 2001).

Mundialmente o lúpulo possui uma área de cultivo que chega a superar os 70 mil hectares, atingindo cerca de 100 mil toneladas por ano em produção (HOPS, THEIR CULTIVATION, COMPOSITION AND USAGE, 2014). No Brasil não há produção de lúpulo significativa, relacionado principalmente por ser uma planta perene e exigente em frio e de fotoperíodo, sendo necessário 15 horas de luz e no mínimo de 120 dias de calor (acima de 30°C) para um adequado florescimento (HILTON, 2002), com isso, existem altos índices de importação, uma vez que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, com produção de cerca de 13 bilhões de litros por ano perdendo somente para os Estados Unidos e China (CERVBRASIL, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2015).

O melhoramento vegetal é importante neste aspecto justamente para desenvolver plantas adaptáveis às nossas condições ambientais. Encontrar genótipos de lúpulo adaptáveis ao nosso clima ajudará a incentivar a produção deste, já que para o Brasil é uma planta com interesse econômico muito grande. Outro aspecto a ser ressaltado, é a falta de conhecimento referente a origem dos genótipos de lúpulo que já existem no Brasil. A falta de comprovação da procedência destes materiais, além da falta de conhecimento da diferença genética destes genótipos, abre um leque de possibilidade a respeito de sua identificação. Existem diversos parâmetros de identificação, porém em alguns

casos podem ter grande interferência ambiental e por aspectos do próprio desenvolvimento da planta. Com esse intuito, métodos baseados em DNA são fundamentais para identificar genótipos que podem ser facilmente afetados pelo ambiente, como é o caso de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), que tem a capacidade de caracterização genotípica de plantas. Sendo um método baseado em microssatélite, este não necessita do conhecimento prévio do genoma (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Para o melhoramento do lúpulo é necessário o conhecimento de seu florescimento, que ocorre somente no segundo ano após o plantio das sementes, conhecimento que serve para um adequado planejamento de sua produção. Em regra, o lúpulo só atinge seu valor máximo de produção após três anos, estágio em que as plantas atingem seu pleno crescimento. (NATIONAL HOP ASSOCIATION OF ENGLAND, 2001). Porém é necessário métodos de identificação de plantas masculinas de maneira mais rápida. O uso de marcadores moleculares é fundamental nesse caso, pois podem ser utilizados em um grande número de plantas promovendo uma rápida e segura identificação de progênies F₁ (POLLEY et al., 1997); PARASNIS et al., 2000).

Programas de melhoramento vêm utilizando técnicas moleculares visando à seleção assistida por marcadores (SAM) (ALZATE-MARIN et al., 2003) uma vez que pode ser realizada nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta, reduzindo significativamente o tempo necessário de seleção de plantas em que os caracteres de interesses se manifestam somente em fases avançadas de desenvolvimento da planta (XU & CROUCH, 2008).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar primers *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) para a determinar a diversidade genética de acessos de *Humulus lupulus* L. e identificar o sexo de *seedlings* pela seleção assistida utilizando-se marcadores moleculares macho-específicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS DA CULTURA

O *Humulus lupulus* L. é uma espécie vegetal que pertence à classe Dicotiledoneae, ordem Urticaceae e à família Cannabaceae, o seu gênero é *Humulus* e a sua espécie é *Humulus lupulus* L. (HEALE et al., 1989). O lúpulo como é vulgarmente conhecido, é uma planta herbácea, perene, normalmente dióica e diplóide ($2n=20$), podendo existir algumas plantas monóicas em uma frequência bem baixa (SKOF et al., 2015). Possui rápido crescimento, hábito indeterminado, e a capacidade de crescer e enrolar seus caules em volta de um suporte. O lúpulo pode chegar a atingir 9 metros de altura, em menos de 5 meses (HEALE et al., 1989).

Por se tratar de uma planta dióica, apresenta a morfologia de suas inflorescências bastante diferenciada. As inflorescências surgem nas axilas das folhas e as inflorescências masculinas são classificadas como panícula multiflora que podem chegar a 10 centímetros de comprimento, enquanto que as femininas se encontram em estróbilos com forma bojuda e arredondada que, dependendo do cultivar, quando completamente desenvolvidos, atingem cerca de 5 a 6 centímetros (CASTROVIEJO et al., 1993). (Figura 1A e 1B). Esses estróbilos apresentam um elevado número de brácteas externas verde-amarelas e bractéolas internas, ligadas a um eixo (BENITEZ et al., 1996).

Cada bractéola protege, em sua base, um fruto chamado de aquênio. Tanto o fruto, quanto as brácteas, estão revestidas com glândulas amarelo-translúcido, contendo substâncias com aspecto de um pó amarelo, denominado de lupulina rico em α e β -ácidos, que são fundamentais para dar valor comercial ao lúpulo (HILLER, et al., 1996) (Figura 1C).

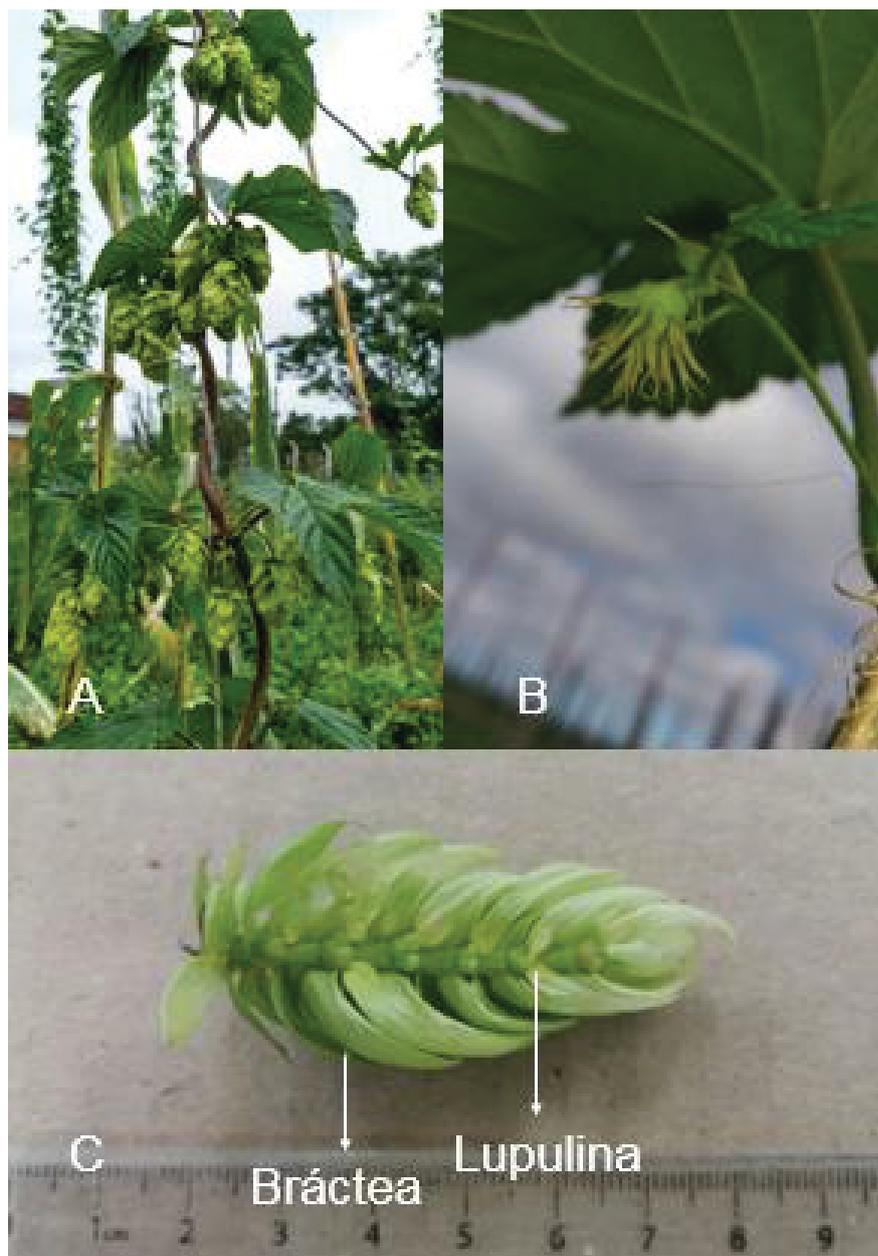


Figura 1: Aspecto geral da morfologia das inflorescências de Lúpulo. A) Inflorescências femininas maduras (cones), B) Inflorescência feminina imatura e C) Corte longitudinal de uma inflorescência feminina, dando destaque a bráctea e a lupulina.

Fonte: BERNERT, A.F (2018).

O lúpulo é uma planta de clima temperado, onde no inverno, fica reduzido a um rizoma, até o início da primavera, apresentando gemas e raízes que podem atingir de 7 a 8 metros de profundidade. No hemisfério norte na primavera e começo do verão, as plantas crescem enrolando-se aos suportes no sentido dextrogiro, se fixando a estes graças aos tricomas que revestem os seus caules. Suas folhas são palminérveas, separadas em três a cinco lobos de coloração verde escuro, com extremidades serradas. No final de junho, o crescimento vertical cessa com resposta a diminuição do fotoperíodo, iniciando assim o desenvolvimento lateral dos meristemas florais (HILLER et al., 1996).

Referentes às características edafoclimáticas essenciais para o seu ideal desenvolvimento podemos citar a profundidade e nível de agregação do solo, pH entre 6 e 7, boa drenagem com ideal distribuição de água, número de horas de sol e altas temperaturas no verão (BEER & HEALTH DOSSIERS, 2001), além de uma adequada utilização de fertilizantes ricos em potássio e fosfato, que são ideais para uma boa produção de lúpulo (CARTER et al., 2000). Com relação ao fotoperíodo, a cultura do lúpulo é exigente, sendo necessárias 15 horas de luz, no mínimo 120 dias de calor e baixas temperaturas (abaixo de 15°C) no inverno para ter um ideal florescimento (HILTON, 2002).

2.2. **IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

O lúpulo é uma espécie vegetal de grande destaque mundialmente, sendo muito utilizado na indústria cervejeira, principalmente por suas características de dar sabor, aroma e amargor às cervejas (HEALE et al., 1989).

Historicamente, o uso do lúpulo começou no Egito antigo, porém, era mais utilizado como erva medicinal, usada principalmente no tratamento de doenças do tubo digestivo e do fígado (NATIONAL HOP ASSOCIATION OF ENGLAND, 2001). Em Portugal existem registros do uso das inflorescências secas e verdes de lúpulo no preparo de infusões para fins diuréticos e para auxílio a digestão (CARVALHO, 2005). Na Roma antiga já era utilizado como planta ornamental e

também no preparo de sopas e consumidos em forma de aspargos, porém já não é mais utilizado nessa forma hortícola (MALTON, 1986).

Referente a utilização na indústria cervejeira, o lúpulo começou a ser usado em meados do século IX A.C., tendo seu primeiro campo estabelecido em 859 A.C., na Baviera (MANSFELD'S DATABASE OF AGRICULTURAL AND HORTICULTURAL CROPS, 2002). Nesta época a cerveja era uma bebida de consumo rápido, onde durante a fermentação só eram adicionados alguns tipos de ervas, mel, folhas de algumas árvores, porém apresentavam problemas de conservação, este que foi resolvido com a utilização do lúpulo, visto que apresentava compostos com ação antibacteriana (DUKE, 1983). A partir deste ponto, a cerveja começou a ser produzida no mundo todo, passando pela Europa primeiramente. Em 1870 começou a ser estendida a 53 países, incluindo os Estados Unidos (Mansfeld's Database of Agricultural and Horticultural Crops, 2002), este que veio a ser o segundo maior produtor de lúpulo do mundo, perdendo somente para a Alemanha (Tabela 1) (FAOSTAT, 2014).

Tabela 1: Produção em toneladas e porcentagem de produção dos principais países produtores mundiais de lúpulo.

Fonte: FAOSTAT (FAO).

País	Produção (ton)	Porcentagem (%)
Alemanha	38 487	38,35
Estados Unidos	32 203	32,09
China	7 656	7,63
República Checa	6 202	6,18
Polónia	2 713	2,70
Coreia do Sul	2 010	2,00
Eslovênia	1 960	1,95
Albânia	1 700	1,69
Espanha	958	0,95
Nova Zelândia	838	0,83
Outros países	5 633	5,61
Total	100 360	100

O Brasil não apresenta uma produção expressiva na produção de lúpulo, porém é um dos maiores produtores de cerveja do mundo com 13,55 bilhões de litros produzidos no ano de 2014, perdendo somente para China com 50 bilhões de litros e Estados Unidos 20 bilhões de litros produzidos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2013). O Brasil apresenta uma produção de lúpulo inexpressiva, relacionada as condições climáticas adequadas para a sua produção, como as condições de luminosidade e duração do dia, resultando assim, que quase todo o lúpulo utilizado para produzir cerveja é importado, gerando maior custo. O Brasil somente no ano de 2014, importou mais de 2 mil toneladas de lúpulo e seus derivados, desde sucos e extratos de lúpulo à cones (ALICEWEB, 2015).

Tabela 2: Consumo anual de litros por habitante dos principais consumidores de cerveja do mundo. Fonte: BATH-HAAS GROUP.

Ranking	País	Consumo anual de litros/habitante
1°	República Tcheca	143
2°	Austria	108
3°	Alemanha	107
4°	Irlanda	94
5°	Polônia	89
6°	Romênia	89
7°	Austrália	82
8°	Bélgica	81
9°	Espanha	78
10°	Reino Unido	77
17°	Brasil	62

2.3. DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES

A estrutura genética é definida como sendo a forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro de uma população. Mutações, migração e seleção são algumas forças evolutivas que atuam em cada espécie influenciando a estrutura genética, causando a sua diversidade, interferindo na distribuição heterogênea dos alelos e genótipos no espaço e tempo (BROWN, 1978; HAMRICK, 1982).

A diversidade genética pode ser afetada pela densidade populacional, natureza das relações entre indivíduos e o ambiente e até mesmo por interações entre indivíduos e populações locais. Geneticamente pode ser caracterizada pela variabilidade morfológica e quantitativa existente entre indivíduos, pelos padrões de fluxo gênico, sistemas reprodutivos e também por estratégias adaptativas aos ambientes locais (MARTINS, 1987).

No cenário agrícola, a avaliação da diversidade genética de plantas é um importante parâmetro para definir programas de manejo, conservação e melhoramento de espécies, principalmente aquelas que sofrem forte pressão antrópica. De modo geral, estudos sobre a diversidade permitem a distinção de indivíduos com características superiores em relação as gerações segregantes, que tenham elevado valor agrônômico, como por exemplo a produção de frutos em qualidade e quantidade, resistência a pragas e doenças, precocidade de produção, etc., características que são visadas em programas de melhoramento (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005; JESUS, 2006).

A diversidade genética existente entre indivíduos pode ser identificada através de marcadores genéticos, que são separados entre duas classes: os morfológicos e os moleculares (KUMMAR, 1999). Os marcadores morfológicos apresentam problemas relacionados pela influência de fatores ambientais ou até mesmo pela própria biologia individual da planta. Além disso, muitas plantas quando jovens, são impossíveis de identificar, pois apresentam morfologia e características bem divergentes comparadas às plantas adultas, como é o caso da videira, além do fato de algumas cultivares serem morfológicamente similares e difíceis de se obter uma diferenciação por análise morfológica (ARADHYA et al., 2003).

Por outro lado, o desenvolvimento de marcadores moleculares ganhou espaço fornecendo ferramentas únicas, com capacidade de detectar polimorfismo ao nível de sequências de DNA, suficientes para discriminar a diversidade genética existente entre indivíduos ou populações e caracterização de cultivares, sendo possível dessa maneira obter o “DNA *fingerprint*” molecular do material, superando a maioria das limitações dos marcadores morfológicos. O *fingerprint* molecular, é nada mais que a impressão digital de um determinado

genótipo, podendo assim obter a diferenciação inequívoca de outro genótipo (FERREIRA; GATTAPAGLIA, 1998; BLANK et al., 2004).

Os marcadores moleculares no melhoramento vegetal possibilitam um avanço na identificação de híbridos em várias espécies de plantas cultivadas, pelo fato de acessarem diretamente o genótipo da planta, evitando assim a influência do ambiente sobre este. Além disso, a sua análise é facilitada pois podem ser analisados a partir de amostras de tecidos de qualquer parte da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento, acelerando o processo de obtenção de novas cultivares, reduzindo o custo e mão de obra do pesquisador (CORDEIRO et al., 2006).

Marcadores moleculares também são utilizados no processo de caracterização e seleção precoce de genótipos, com estratégias utilizadas para localizar marcadores ligados a genes de importância econômica e posterior utilização destes em programas de melhoramento. Dentre essas estratégias, destacam-se a construção de mapas genéticos, detecção de locos de características quantitativas (QTLs) e a seleção assistida por marcadores (SAM) (DEKKERS HOSPITAL, 2002).

Com a busca de conhecimento a respeito de técnicas genéticas e de biologia molecular, surgiram diversos tipos de marcadores moleculares, que podem ser classificados em diferentes grupos com base em seu modo de ação genética (dominantes e codominantes) e pelo método de análise baseado em hibridação ou baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SEMAGN; BJORNSTAD; NDJIONDJOP, 2006).

Dentre os marcadores identificados por hibridação são destacados: RFLPs (*Restriction Fragment Length Polimorphism*), são marcadores codominantes, que são fragmentos de DNA obtidos de enzimas de restrição, separados por eletroforese, e visualizados por meio de hibridação com sondas de sequências homólogas marcadas por radioatividade ou fluorescência. Os marcadores RFLP podem ser obtidos por diferentes genes ou regiões genômicas, tanto de DNA ribossomal, mitocondrial e do cloroplasto (AVISE, 1993). A desvantagem desse marcador está associada à exigência de grande

quantidade e qualidade do DNA a ser analisado, necessita-se de sondas específicas para a hibridação e por ser uma técnica trabalhosa e cara (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998); e os marcadores Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) que são unidades de 10 a 100 pb repetidas em *tandem*, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição (JEFFREYS et al., 1985; DALLAS, 1998). Como vantagens destaca-se a alta reprodutibilidade de marcas e a geração de muitas bandas informativas por reação, porém, com a desvantagem relacionada à dominância dos marcadores e por ser uma técnica demorada e cara assim como os marcadores RFLP (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Já aqueles marcadores baseados em amplificação por PCR, estão incluídos principalmente: RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), que são fragmentos de DNA amplificados em PCR, onde é utilizado um único primer curto de sequência aleatória. Esta característica elimina a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados e tem a vantagem de ser uma técnica fácil e rápida para a obtenção dos marcadores com necessidade mínima de quantidades de DNA, entretanto, apresenta baixa reprodutibilidade das informações e baixo conteúdo informativo por loco. A característica de ser um marcador dominante impede que seja possível distinguir homocigotos de heterocigotos (KEPHART, 1990; MAY, 1992; ALFENAS, 1998; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions* – Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências) e o STS (*Site Tagged Sequence*) são marcadores moleculares amplificados com primers específicos, desenvolvidos com base em sequências já mapeadas ou caracterizadas. Muitos desses marcadores são obtidos a partir da conversão de marcadores RAPD e RFLP, em SCAR e STS, respectivamente. De modo geral, essa conversão acaba por diminuir o nível de polimorfismo obtido por SCAR e STS, podendo ser amenizado com a digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados e sequenciamento de bandas monomórficas. A diferença entre essas duas técnicas está relacionada à amplificação de regiões de DNA. Enquanto a técnica de SCAR amplifica regiões de DNA que contêm sequências repetidas a STS

amplifica regiões de DNA de cópias simples (PARAN & MICHELMORE, 1993; CORRÊA et al., 2000).

Os AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), são fragmentos de DNA obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, onde a análise é baseada na amplificação seletiva via PCR de um subconjunto de fragmentos genômicos. Como vantagem desta tecnologia destaca-se a geração de grande número de polimorfismo por reação, aumentando o poder de detecção de variabilidade genética e o fato de não haver necessidade do conhecimento prévio de dados da sequência de DNA para a construção dos primers utilizados, porém, é uma técnica de custo elevado e necessita de várias etapas e reagentes necessários para a obtenção dos marcadores, além do fato de ser um marcador dominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Único) que constituem os marcadores moleculares mais recentes na análise genética, são marcadores do DNA utilizados para identificar mutações e polimorfismo baseados na posição de um único nucleotídeo (CHO et al., 1999). Este marcador é utilizado para estudos filogenéticos de evoluções dentro da espécie (WOLTERS et al., 2000), mapeamento genético e principalmente na diferenciação de alelos do mesmo gene (MELLOTO & KELLY, 2001).

Os Microssatélites, também denominados SSRs (Simple Sequence Repeats – Repetições de Sequência Simples), são unidades muito curtas (2 a 5 pb), que se repetem lado a lado na fita de DNA no genoma de eucariotos. As principais vantagens deste marcador é a sua codominância, o alto nível de polimorfismo, que pode ser detectado e podem ser representados pelo tamanho de seus alelos em pares de bases (pb), tornando-os um marcador, cujos dados podem ser comparados entre laboratórios e formatados em bases de dados, além da possibilidade de detecção de vários microssatélites no mesmo gel facilitando a operação e análises, principalmente quando é analisado uma grande quantidade de acessos. As desvantagens desses marcadores são o alto custo inicial, que envolve o desenvolvimento de pares de iniciadores específicos e a ocorrência de alelos nulos. Como consequência, não há a formação de banda

e heterozigotos podem ser equivocadamente interpretados como homozigotos (MORGANTE & OLIVIERI, 1993; QUELLER et al., 1993; FALEIRO et al., 2004; LEÃO, 2008).

Os primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR. Diferente do método microssatélite (SSR), que são baseados na amplificação da região repetida usando dois primers loco-específicos, nesses marcadores é utilizado um único primer composto por uma sequência do microssatélite, entre 16-25pb, o qual é utilizado para amplificar as regiões inter-SSR. Estes primers podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 pares de bases degeneradas. Como vantagens deste marcador destaca-se a geração de grande número de bandas informativas por reação, o fato de não haver a necessidade do conhecimento prévio do genoma e capacidade de analisar loci múltiplos em apenas uma única reação, porém é um marcador dominante (ZIETKIEWICZ et al., 1994; GODWIN et al., 1997; GOULÃO & OLIVEIRA, 2001).

Marcadores ISSR são considerados úteis na identificação de cultivares, tendo vantagens devido à alta reprodutibilidade, comparado a outros métodos empregados baseados em PCR, como RAPD e AFLP (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001). A técnica de ISSR de modo geral, vem sendo empregada para a rápida diferenciação genotípica entre indivíduos aparentados, devido ao seu elevado grau de polimorfismo e reprodutibilidade (BORBA et al., 2005). Os marcadores ISSR também tem sido aplicados com grande frequência em estudos genéticos, em culturas de maior importância econômica em relação à variabilidade genética de acessos e espécies nativas, resultados que favorecem e auxiliam programas de melhoramento (ALMEIDA, 2006). Este método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera grande taxa de polimorfismo em muitos sistemas. A maioria das aplicações têm usado eletroforese no gel de agarose com detecção por brometo de etídio, gel de poli(acrilamida) e GelRed TM® (LIU & WENDEL, 2001).

Já nos diferentes programas de melhoramento de plantas, o processo de seleção de indivíduos que apresentam caracteres agronomicamente desejáveis, é realizado em sua maioria com base nas informações fenotípicas. De modo geral, este processo muitas vezes pode apresentar dificuldades, principalmente

em características de baixa herdabilidade, uma vez que, a maioria dos caracteres de importância econômica são de natureza quantitativa e são altamente afetados pelas interações ambientais na expressão do fenótipo (TOPPA et al., 2013).

Os marcadores de DNA surgiram com capacidade de detectar variação genética e trouxeram novos avanços para o melhoramento genético de plantas, tendo êxito em diversas culturas de interesse agrônomo. Como principais vantagens que estas técnicas trouxeram, destaca-se a análise intrínseca de um indivíduo sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica, ou seja, sem a ação do ambiente, caracterização de cultivares, alta capacidade de distinguir indivíduos morfologicamente similares e geneticamente aparentados. No melhoramento em si, trouxeram ainda a capacidade de procura de alelos desejáveis indiretamente por meio de uso de marcadores ligados, como é o caso da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (TOPPA et al., 2013).

Em programas de melhoramento, os genótipos são avaliados por meio dos marcadores e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas, e as não-comuns, como diferenças genéticas. Os resultados são interpretados de forma a gerar uma matriz de similaridade (ou dissimilaridade), que pode ser interpretada por gráficos, por meio de análise de agrupamento ou multivariada (LANZA et al., 2000). Para o sucesso de um programa de melhoramento, tanto a escolha dos genitores quanto o planejamento dos cruzamentos, são etapas fundamentais e de grande importância (BORÉM, 1997). Estas etapas auxiliadas por meio de marcadores moleculares fornecem aos melhoristas informações genéticas e detalhadas dos genótipos, aumentando a probabilidade de seleção de cultivares superiores, aspecto importante quanto trabalhada em espécies onde a obtenção de uma cultivar melhorada é bastante longa, como espécies frutíferas e florestais (LANZA et al., 2000).

A técnica de ISSR pode ser empregada para a diferenciação rápida de indivíduos aparentados, devido a sua alta capacidade de detectar polimorfismo entre indivíduos e também por conter baixo custo (BORBA et al., 2005). Porém, o uso de marcadores moleculares para registro de novas cultivares ainda

apresenta certo grau de limitação, até mesmo em países onde a proteção de cultivares já é praticada a bastante tempo, voltada principalmente ao custo e possibilidade de utilização de outros descritores em culturas que ainda podem apresentar uma ampla base genética (MILACH, 1998).

MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE LÚPULO.

Um grande número de marcadores moleculares vem sendo utilizados para a obtenção de informações em estudos de diversidade genética, tais como os AFLP, RFLP, RAPD, SSR e ISSR (VIDOR et al., 2002; DUARTE, 2011; AGUIAR, 2012), que já foram descritos anteriormente.

Dentre os primeiros trabalhos com a utilização destes marcadores moleculares na análise da diversidade genética de lúpulo, destaca-se o de MURAKAMI, (1998), que utilizou 25 diferentes marcadores RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), na classificação de 51 variedades de lúpulo, provenientes tanto da Europa, Ásia, Oceania e América do Norte, que são cultivadas e comercializadas em todo o mundo. Como resultado, os autores encontrou através de um dendograma de similaridade genética, a formação de 6 diferentes clusters (grupos), demonstrando que apesar das variedades serem de regiões completamente distintas, existe um ancestral comum, o que explica a taxa de similaridade média existente entre os clusters formados ser de aproximadamente 70%.

Além do marcador molecular RAPD, outros marcadores foram utilizados com finalidade de avaliar a diversidade genética entre genótipos de lúpulo, como marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (PATZAK, 2001).

Trabalhos que concluíram que os marcadores STS utilizados foram capazes de obter mais informações e capacidade de distinguir os genótipos quando comparado ao método por RAPD, porém teve semelhante capacidade de diferenciação aos métodos AFLP e ISSR (PATZAK, 2002).

Já DANILOVA et al. (2006) avaliaram a taxa de polimorfismo utilizando marcadores ISSR em 26 cultivares russas e europeias de lúpulo utilizando 21 primers. Obtiveram à amplificação de 183 fragmentos de DNA, sendo que 19 dos primers obtiveram fragmentos de amplificação polimórficos, resultando assim que a taxa de polimorfismo utilizando primers ISSR foi maior comparado com outros marcadores, como AFLP e RAPD. Além disso, concluíram que com estes primers foi possível encontrar diferenças significativas entre as cultivares utilizadas e mostraram a adequação do uso deste método em programas de melhoramento.

2.5. IDENTIFICAÇÃO DO SEXO VIA MARCADORES MOLECULARES

Com o avanço da tecnologia, os marcadores moleculares surgiram com a possibilidade de virar uma ferramenta de auxílio para a seleção de genótipos de interesse. A incorporação de informações dos marcadores moleculares na seleção é conhecida como seleção assistida por marcadores molecular (SAM), que diferente da seleção fenotípica, tem como vantagem a realização de piramidação de genes, onde se busca concentrar em um único genótipo, diferentes características de interesse, reduzindo em muito o tempo para obter esse genótipo. A SAM é muito importante quando o caractere de interesse só se manifesta em fases avançadas de desenvolvimento da planta, podendo ser usando nos estágios iniciais, reduzindo o tempo necessário para a seleção (FERREIRA et al., 1998),

Dentre os primers que são utilizados para a identificação do sexo de plantas, o RAPD é um dos mais utilizados. STILES et al. (1993), utilizaram a técnica RAPD para analisar a relação genética existente entre dez cultivares de mamoeiro, e após a construção de um dendograma, concluíram que a tecnologia RAPD é rápida, precisa e sensível para a análise genômica e sexual de mamoeiro. CHAVES-BEDOYA e NUÑEZ (2007), fizeram um estudo com plantas jovens de cultivares de mamoeiro e verificaram que o marcador SCAR SDSP pode determinar o sexo em plantas jovens de forma precisa com a metodologia de PCR. Contudo, foi possível, apenas, amplificar fragmentos a partir dos genomas de plantas masculinas e hermafroditas.

Também com trabalho com mamoeiro, MAGDALITA et al. (1997), utilizando 72 primers RAPD, revelaram alto nível de polimorfismo (64%) entre 120 híbridos interespecíficos obtidos do cruzamento de duas espécies de mamoeiro (*C. papaya* X *C. cauliflora*), onde dezessete desses primers produziram padrões de bandas polimórficas com alto grau de confiabilidade, que foram utilizadas para identificar híbridos, onde 1-5 primers RAPD confirmaram com consistência que todas as 120 plantas eram híbridos genéticos, sendo que em todas elas, contendo no mínimo, uma banda do parental masculino. PARASNIS et al. (2000), trabalhando com cultivares de *Carica papaya* e *Carica cauliflora*, observaram que a banda de amplificação de um dos primers RAPD, foi presente somente nas plantas do sexo masculino, com 831 pb.

ALSTROM-RAPAPORT et al. (1998), trabalhando com Salgueiro (*Salix viminalis* L.), utilizou 380 primers decâmeros para gerar produtos RAPD, realizando uma BSA (*Bulked Segregant Analysis*), concluíram que de 1080 bandas de RAPD analisadas, uma única banda estava ligada ao locus de determinação sexual (560 pb) RUAS et al. (1998), identificou fragmento de DNA específico ao macho com 2075 pb, utilizando o primer OPAF-14 em espécies dioicas do gênero *Atriplex* (*Chenopodiaceae*), confirmando que a técnica RAPD também é eficaz na identificação de plantas hermafroditas.

MULCAHY et al. (1992), trabalhando em *Silene latifolia*, conseguiram identificar quatro primers associados diretamente à identificação do sexo nesta espécie. Já HORMAZA et al. (1994), detectaram uma única marca associada ao sexo feminino, porém ausente no sexo feminino de *Pistacia vera* e SAKAMOTO et al. (1995), relatou uma marca de 730 pb associada à identificação de machos em *Canabis sativa*, utilizando a técnica de RAPD. Assim com o RAPD, o primer denominado SCAR, é também utilizado para identificação sexual de plantas, podendo até ser mais eficaz sobre os marcadores RAPD por detectar apenas um único locus e apresentam menos sensibilidade às condições de reação (WEEDEN, 1994).

JIANG e SINK (1997), utilizaram marcadores BSA, RAPD e SCAR, com objetivo de mapear marcas moleculares para o locus sexual M (macho) em 63 progênies de aspargo. Com um total de 760 primers RAPD testados, um dos

primers produziu duas marcas ligadas ao locus M, a sequência então foi usada para a construção dos primers SCAR, que amplificaram um único fragmento de 980 pb somente em indivíduos masculinos, do mesmo tamanho do fragmento RAPD clonado, sendo assim eficientes para identificar machos e fêmeas da progênie da população mapeada.

Por apresentar um florescimento tardio, podendo ocorrer somente dois anos após o plantio, o lúpulo precisa de métodos que facilitem a sua identificação antes mesmo da fase de florescimento ocorrer, poupando tempo e trabalho por parte do melhorista, pois existe a necessidade de separar plantas macho e fêmea para a seleção (HAUNOLD, 1991).

PATZAK et al. (2002), utilizaram a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) para a identificação de diversas progênies F1 de diversos cruzamentos de Lúpulo durante três anos e fizeram a comparação das análises de PCR com o florescimento a campo, concluindo que o par de primers utilizados para a análise molecular das progênies teve alta capacidade em identificar o sexo das plantas.

POLLEY et al. (1997) ainda compararam um conjunto de plantas masculinas e femininas derivadas de um cruzamento de lúpulo com objetivo de identificar marcas moleculares associadas ao cromossomo Y, obtendo como resultado após teste de 900 primers, que 32 desses revelaram fragmentos específicos para plantas masculinas e desses 32 primers, 3 específicos para o cromossomo Y, sendo que um deles (Primer OPJ9), foi de baixa cópia em experimentos de hibridização e predominantemente presentes em plantas masculinas.

Portanto, este trabalho teve como objetivo a seleção de primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e análise da similaridade genética de 17 acessos de lúpulo coletados no Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, além da identificação do sexo de 75 seedlings através de dois marcadores moleculares macho-específicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.5. ACESSOS DE LÚPULOS

Foram analisados 17 acessos de lúpulo, provenientes de diversas regiões do Brasil com disponibilidade na coleção da Estação Experimental Fazenda Canguiri, localizada no município de Pinhais – PR, coordenadas 25°23'12.3"S 49°07'33.2"W (Tabela 3).

Tabela 3: Acessos de lúpulo utilizados com suas respectivas características (procedências e sexo)

Disponibilidade	Acesso	Procedência	Sexo
FAZENDA CANGUIRI	1	PR	Feminino
	2	PR	Feminino
	3	PR	Feminino
	4	RS	Feminino
	5	PR	Feminino
	6	RS	Feminino
	7	RS	Feminino
	8	PR	Feminino
	9	PR	Feminino
	10	PR	Feminino
	11	PR	Feminino
	12	RS	Feminino
	13	PR	Feminino
	14	PR	Masculino
	15	SP	Feminino
	16	PR	Feminino
	17	PR	Feminino

3.6. ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares foram efetuadas no Laboratório de Sistemática e Ecologia Molecular de Plantas do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.6.1. Extração e quantificação do DNA

A extração de do DNA utilizado foi o proposto por Doyle & Doyle (1987) e a qualidade do DNA visualizada e gel de agarose. A quantificação das amostras de DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™. Após a quantificação todas as amostras de DNA foram padronizadas em concentração de 50 ng/μL.

3.6.2. Reações de PCR.

As reações de PCR foram preparadas em volume final de 20 μL, contendo os seguintes constituintes: 1 μL de DNA, 2 μL de tampão, 1,2 μL de MgCl₂ (950 mM), 2 μL de dNTPs (2mM), 0,4 μL de primer (20mM), 0,1 μL de taq polimerase (5U/μL) e 13,3 μL de H₂O ultrapura (q.s.p). As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems).

3.6.2.1. Ensaios de temperatura

Nesta etapa foram efetuados ensaios de temperatura para cada um dos primers testados, sendo utilizados 4 acessos diferentes (acesso 1, 4, 11 e 17), onde as condições de amplificação foram: Desnaturação inicial a 94°C por 1,5 minutos, 37 ciclos a 94°C para a desnaturação por 40 s, gradiente de temperatura de 47°C, 50°C, 53°C e 56°C para a fase de anelamento, e 1,5 minutos a 72°C para extensão das fitas de DNA. Ao final dos 37 ciclos, foi realizada uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

Os produtos amplificados, contendo corante GelRed TM® (3 μL) + Corante TAE 6x (2 μL), foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o tampão TAE 0,5x para a corrida. Para auxílio na análise e determinação do tamanho dos fragmentos foi utilizado marcador de peso molecular (“DNA ladder”) da marca Ludwig Biotec® de 100 pares de base. As

condições eletroforéticas foram 140V durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida os fragmentos foram visualizados em sistema de fotodocumentação digital.

3.6.2.2. Seleção de primers

Foram testados 20 primers ISSR (tabela 7), sendo 14 desenvolvidos pela Ohio State University e mais 6 sintetizados (OLIGO 1, OLIGO 2, OLIGO 3, OLIGO 4, OLIGO 5 e OLIGO 6) de acordo com PATZAK et al., (2002), que trabalhou com caracterização genética de cultivares de lúpulos tchecos.

Tabela 4: Lista de primers testados e as suas respectivas sequências de nucleotídeos.

<i>Primers</i> ISSR	Sequência de nucleotídios	<i>Primers</i> ISSR	Sequência de nucleotídios
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	MAO	(CTC)4-RC
UBC 827	(AC)8G	OMAR	(GAG)4-RC
UBC 848	(CA)8RG	TERRY	(GTG)4-RC
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	DAT	(GA)7-RG
UBC 901	(GT)6-YR	OLIGO 1	(GACA)4G
JOHN	(AG)7-YC	OLIGO 2	(TGTC)4T
BECKY	(CA)7-YC	OLIGO 3	(AGC)5A
CHRIS	(CA)7-YG	OLIGO 4	(GCT)5G
MANNY	(CAC)4-RC	OLIGO 5	(TCG)GT
GOOFY	(GT)7-YG	OLIGO 6	(CGT)5C

3.7. ANÁLISE DE DADOS

A partir de uma leitura dos padrões eletroforéticos das bandas dos 20 primers utilizados para a amplificação, só foram levados em consideração os que apresentaram produtos de amplificação com bom grau de resolução (Figura 2). Os géis então foram avaliados formando uma matriz de presença e ausência de bandas para cada um dos 17 acessos analisados, atribuindo valor 1 para a presença de banda e 0 para a ausência. A taxa de polimorfismo de cada primer ISSR foi calculado dividindo o número de bandas polimórficas pelo total de bandas amplificadas.



Figura 2: Padrão de amplificação de bandas consideradas com bom grau de resolução e amplificação de bandas considerados com baixo grau de resolução.

A capacidade de discriminação dos marcadores utilizados foi avaliada a partir de três diferentes parâmetros: PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica), MI (Índice do Marcador) e RP (Poder de Resolução). A formação do dendograma teve como princípio o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA).

Conteúdo de informação polimórfica (PIC): Corresponde ao poder do marcador em detectar o polimorfismo existente na população, sendo calculado por:

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

Onde: PIC_i é o conteúdo de informação polimórfica do primer i ; f_i é a sequência dos locos amplificados, ou seja, presença ou ausência de bandas; e $1 - f_i$ é a frequência dos alelos nulos (ROLDAN-RUIZ et al., 2000)

Índice do Marcador (MI):

$$MI = PIC \times EMR$$

Onde: EMR é o produto do número total de locos por primer (n) e a fração de loco polimórfico (β), ou seja: $EMR = n \cdot \beta$ (VARSHNEY et al., 2007)

O Poder de resolução (RP):

$$RP = \sum lb$$

Onde: lb representa os locos polimórficos. O valor de lb pode ser transformado em uma escala de 0-1 usando a equação: $lb = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ onde, p é a proporção dos genótipos que contém o loco (PREVOST; WILKINSON, 1999).

Os parâmetros avaliados foram calculados no programa Office Excel 2013.

3.8. IDENTIFICAÇÃO SEXUAL

A extração do DNA para análise sexual de lúpulo foi efetuada pelo protocolo de Doyle & Doyle (1997), porém nesse caso foram extraídos o DNA de 75 genótipos que foram obtidos através de sementes. Para a quebra de dormência as sementes foram acondicionadas em geladeira a baixas temperaturas ($>5^\circ\text{C}$) por cerca de 30 dias e semeadas em bandejas com suas células de dimensões 2,1 cm de comprimento x 2,1cm de largura por 4,3 cm de altura contendo vermiculita.

A reações de PCR foram preparadas em volume de 20 μL contendo os seguintes constituintes: 1 μL de DNA, 2 μL de tampão, 1,2 μL de MgCl_2

(950mM), 2 μ L de DNTPs (2mM), 30 ng/ μ L de cada um dos primers (STSF: 5' ACAGAGTACAACCTCAGAAACAAACC 3', STSR: 5' AAGGTCGCACAATGACCG 3'), 0,1 μ L de taq polimerase (5U/u/L) e 13,3 μ L de H₂O ultrapura. Os primers utilizados tiveram como base o trabalho de PATZAK (2002).

Já as condições de amplificação foram: Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C para a desnaturação por 30 s, para a fase de anelamento 60 s à 54°C, e 1,5 minutos a 72°C para extensão das fitas de DNA. Ao final dos 35 ciclos, foi realizada uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR então foram corados com corante GelRed (3 μ L) mais Corante TAE 6x (2 μ L) e separados em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 150V por cerca de 2 horas. Também foi utilizado marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pares de bases (Marca Ludwig Biotec) para auxiliar na análise do tamanho dos fragmentos. Como controle positivos foram utilizados plantas de sexo conhecido, sendo que onde houve amplificação de banda se caracterizou como planta macho, e com a ausência de banda, se caracterizou como planta fêmea. As reações de PCR foram repetidas três.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5. ENSAIOS DE TEMPERATURA

Dentre os 20 primers ISSR testados, cinco apresentaram temperatura ótima de anelamento em 56°C (UBC 808, UBC 827, OLIGO 1 e OLIGO 3), três em 53°C (BECKY, CHRIS e JOHN), cinco em 50°C (UBC 880, OMAR, MAO, MANNY e UBC 848) e apenas o OLIGO 2 à 47°C (tabela 3).

Tabela 5: Relação dos primers ISSR que obtiveram amplificação de bandas com as suas sequências de nucleotídeos e as suas respectivas temperaturas de anelamento.

Primers ISSR	Sequência de nucleotídeos	T°C de anelamento
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	56°C
UBC 827	(AC)8G	56°C
UBC 848	(CA)8RG	50°C
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	50°C
JOHN	(AG)7-YC	50°C
BECKY	(CA)7-YC	53°C
CHRIS	(CA)7-YG	53°C
MANNY	(CAC)4-RC	53°C
MAO	(CTC)4-RC	50°C
OMAR	(GAG)4-RC	50°C
OLIGO 1	(GACA)4G	56°C
OLIGO 2	(TGTC)4T	47°C
OLIGO 3	(AGC)5A	56°C

Os demais primers (OLIGO 4, OLIGO 5, OLIGO 6, UBC 901, GOOFY, TERRY e DAT não apresentaram amplificação de bandas em nenhuma das temperaturas do gradiente. Na figura 2 é possível ver o padrão de amplificação de banda nas respectivas temperaturas do gradiente dos primers OLIGO1, BECKY, JOHN e OLIGO 2 nos 4 acessos testados (1, 5, 17 e 21).

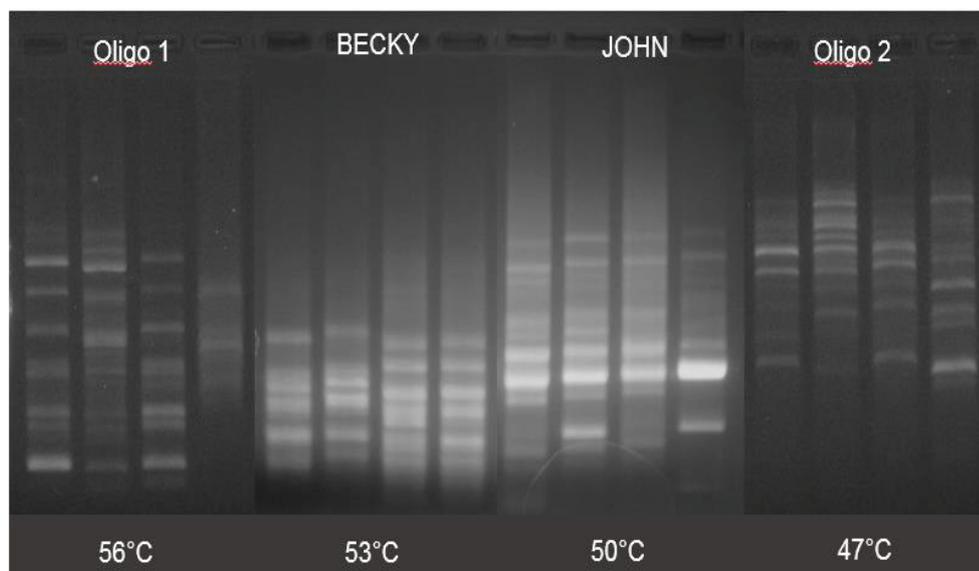


Figura 3 - Perfil eletroforético dos primers OLIGO1, BECKY, JOHN e OLIGO 2, com suas respectivas temperaturas de anelamento escolhidas, em 4 diferentes acessos (acessos 1, 5, 17 e 21).

A escolha da temperatura de anelamento ideal para a amplificação tem importância para estudos genéticos, uma vez que, baixas temperaturas podem aumentar a eficiência da PCR, porém diminuíram a especificidade, altas temperaturas aumentam a especificidade, mas diminuem a eficiência da PCR, além de que temperatura mal otimizada poderá gerar ineficiência significativa dos primers (SILVA-PEREIRA et. al., 2003).

DANILOVA et al. (2006), demonstraram que as temperaturas de anelamento dos primers de lúpulo podem ser variáveis dependendo do genótipo em estudo e dos primers utilizados, podendo haver uma variação entre 45°C a 54°C, caso semelhante aconteceu no presente trabalho, tendo variação entre 47°C e 56°C.

Esta variação de temperatura também ocorre de acordo com a espécie vegetal em estudo. GORSKI (2015), utilizando os primers UBC 808, UBC 827, UBC 848, obteve as temperaturas de anelamento de 50°C, 50°C e 55° respectivamente, para a *Baccharis crispa* SPRENG. Já SILVA (2015), obteve como melhor temperatura de anelamento para o primer UBC 848, 48°C na cultura do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). Pela Figura 2 observa-se que

ocorre essa variação de temperatura de anelamento mesmo sendo utilizado na mesma espécie.

4.6. SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM LÚPULO.

Dos 20 primers ISSR que foram avaliados, treze (65%) apresentaram produtos de amplificação e 7 (35%) não apresentaram produtos de amplificação. Os 13 primers amplificaram 170 bandas, o que resultou em aproximadamente numa média de 13 bandas por *primer*. Todos os primers resultaram em bandas polimórficas. O primer BECKY, foi o que apresentou o maior número de bandas (20) e o MAO o menor número de bandas (3). Na figura 3 é possível observar o padrão de amplificação do primer ISSR UBC880 nos 17 acessos utilizados neste trabalho.

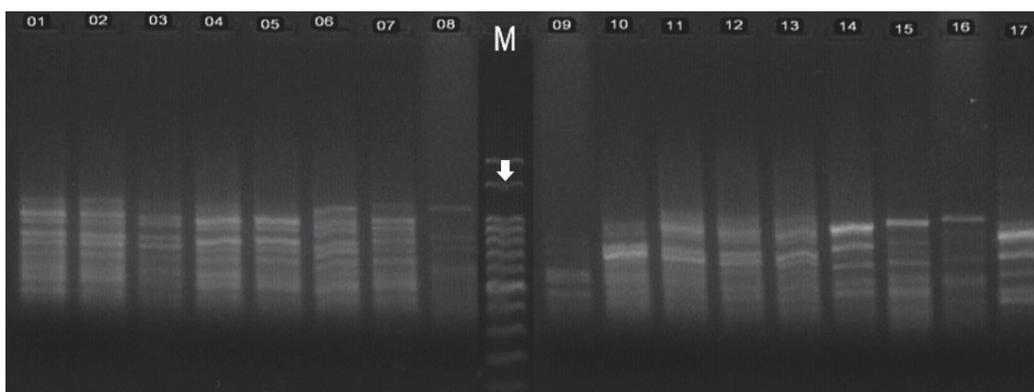


Figura 4 - Padrão de amplificação do primer ISSR UBC 880 em gel de agarose nos 17 acessos de lúpulo testados. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb e a seta indica o fragmento de 1000 pb.

O intervalo dos fragmentos amplificados teve variação entre 200 a 2080 pb, sendo que a menor amplitude de fragmentos foi do *primer* UBC 880 (300 a 1500 pb), e a maior amplitude no primer UBC 827 (200 a 2080 pb).

Dentre os 20 primers que obtiveram produtos de amplificação, somente 13 deles foram selecionados para o cálculo dos parâmetros descritos anteriormente, por apresentarem amplificação de bandas (tabela 6).

Tabela 6: Primers ISSR utilizados em lúpulo com suas respectivas sequências de nucleotídeos, número de bandas obtidas, número de bandas polimórficas e intervalo de amplificação dos fragmentos. Primers com nomes em negrito representam aqueles que foram selecionados para a análise genética e cálculo dos parâmetros.

Número	Primers ISSR	Sequência de nucleotídeos	n° de bandas obtidas	n° de bandas polimórficas	Intervalo dos fragmentos
1	UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	13	13	330 a 2080 pb
2	UBC 827	(AC)8G	18	18	200 a 2080 pb
3	UBC 848	(CA)8RG	6	6	300 a 1500 pb
4	UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	14	14	330 a 1500 pb
5	UBC 901	(GT)6-YR	0	0	x
6	JOHN	(AG)7-YC	14	14	330 a 1500 pb
7	BECKY	(CA)7-YC	20	20	330 a 2080 pb
8	CHRIS	(CA)7-YG	17	17	330 a 2080 pb
9	MANNY	(CAC)4-RC	6	6	300 a 1500 pb
10	GOOFY	(GT)7-YG	0	0	x
11	MAO	(CTC)4-RC	3	3	300 a 1500 pb
12	OMAR	(GAG)4-RC	6	6	300 a 1500 pb
13	TERRY	(GTG)4-RC	0	0	x
14	DAT	(GA)7-RG	0	0	x
15	OLIGO 1	(GACA)4G	20	20	330 a 2080 pb
16	OLIGO 2	(TGTC)4T	19	19	330 a 2080 pb
17	OLIGO 3	(AGC)5A	13	13	300 a 1500 pb
18	OLIGO 4	(GCT)5G	0	0	x
19	OLIGO 5	(TCG)GT	0	0	x
20	OLIGO 6	(CGT)5C	0	0	x

É importante ressaltar o resultado referente aos 6 primers sintetizados como base o trabalho de PATZAK et al., (2002), onde somente 3 deles obtiveram amplificação de bandas, sendo eles os primers OLIGO 1, OLIGO 2 e OLIGO 3.

A respeito dos parâmetros avaliados em cada um dos marcadores, o valor médio de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) foi de 0,3201, variando entre 0,01941 (MAO) e 0,4908 (BECKY). Na tabela 7 estão apresentados os marcadores, com seus respectivos valores de todos os parâmetros avaliados (PIC, MI e RP).

Tabela 7: Valores de Índice de Conteúdo Polimórfico (PIC), Multiflex Eficaz (EMR), Índice do Marcador (MI) e Poder de Resolução (RP) de cada um dos respectivos primers selecionados.

PRIMER*	PIC	EMR	MI	RP
UBC 808	0,4811	5,2353	2,5185	10,4706
UBC 827	0,4658	6,647	3,0964	13,0588
UBC 880	0,4797	10,2142	4,8994	16,7059
CHRIS	0,3776	4,2941	1,6214	8,5882
BECKY	0,4908	8,647	4,2444	17,2941
OLIGO 1	0,392	5,3529	2,0985	10,7059
OLIGO 2	0,4431	6,2941	2,7887	12,5882
OLIGO 3	0,4295	4,0588	1,7432	8,1176
JOHN	0,4406	4,4885	2,0218	9,1765
MAO	0,0194	6,0014	0,1164	0,6875
OMAR	0,0384	5,9985	0,2306	1,3812
UBC848	0,0421	6,0020	0,2526	1,5396
MANNY	0,0394	5,9899	0,2485	1,4912

* Primers destacados em negrito, representam aqueles que foram selecionados para o cálculo de similaridade genética, por apresentarem valores de índice de conteúdo polimórfico no mínimo mediamente informativos ($0,25 < \text{PIC} < 0,5$).

De acordo com PRECZENHAK (2013), os valores de PIC representam a capacidade do marcador detectar a variabilidade existente entre indivíduos, sendo que quanto maior o seu valor, maior será sua capacidade de informação. De acordo com a classificação sugerida por BOTSTEIN et al. (1980), os valores de PIC observados podem ser considerados mediantemente informativos, uma vez que o autor classifica marcadores com PIC superior a 0,5 como satisfatórios em conteúdo polimórfico, valores entre 0,25 e 0,5 como mediantemente informativos e valores abaixo de 0,25 como pouco informativos. Sendo assim, somente foram selecionados os marcadores que obtiveram valores no mínimo mediantemente informativos, ou seja, com valores entre 0,25 e 0,5, segundo BOTSTEIN et al. (1980).

No presente estudo, os marcadores BECKY e UBC 808 foram os marcadores mais informativos, com valores de PIC de 0,4908 e 0,4810 respectivamente. Os marcadores com menor capacidade informativa, ou seja, com menores valores de PIC foram o MAO e o OMAR, com valores de PIC de 0,01941 e 0,03844 respectivamente. Estes marcadores apresentam valores inferiores de PIC justamente pela maior frequência de fragmentos polimórficos. Segundo GRATIVOL et al. (2010), locos com maior frequência prevalecem entre os indivíduos, apresentando tendência ao monomorfismo, o que gerará valores menores de PIC. Apesar de nenhum primer apresentar bandas monomórficas, estes primers em questão apresentaram bandas bem frequentes em todos os indivíduos, explicando o baixo valor de PIC. De maneira igual, os locos que apresentam baixa frequência, também tendem ao monomorfismo, pelo fato de prevalecer bandas ausentes, resultando assim em menores valores de PIC também.

O índice do marcador (MI) de cada um dos primers teve variação entre 0,1146 e 4,8994, dando destaque aos primers UBC 880 e BECKY que obtiveram os maiores valores e os primers OMAR e MAO que obtiveram os menores valores de MI. (Tabela 7). O Índice do marcador (MI), leva em consideração a fração de marcadores polimórficos, sendo o produto entre o índice de conteúdo polimórfico (PIC) e a razão de multiflex eficaz (EMR). Não existe um valor específico ou um valor de padrão para o índice do marcador (MI), onde, segundo

TATIKONDA et al. (2009), seus resultados podem ser analisados comparando os valores de cada primer em estudo.

Segundo VARSHNEY et al. (2007), os altos valores para os índices calculados para cada primer estão relacionados com os altos valores de multiflex eficaz (EMR), porém não diretamente relacionadas com altas taxas de polimorfismo. No estudo em questão, os primers com maiores valores de índice do marcador (MI), foram os primers BECKY E UBC 880, com 4,2444 e 4,8994, que também apresentaram altos valores de polimorfismo.

Para o parâmetro poder de resolução (RP), foi observado valor de 17,2941 para o marcador BECKY, sendo assim o maior valor dentre todos os primers avaliados, e valor de 0,6875 para o marcador MAO, sendo esse o menor valor observado de RP. Vale destacar que os marcadores UBC 880 e UBC 827 também obtiveram valores altos de RP, com valores de 16,7058 e 13,0588 respectivamente. (Tabela 7).

Segundo PREVOST e WILKINSON (1999), o poder de resolução (RP) de cada primer apresenta a característica de discriminação de cada um deles, altamente correlacionado com diagnóstico de genótipos. Assim como os valores de índice do marcador (MI), o poder de resolução (RP), não apresenta um valor ótimo para comparação, sendo assim, é classificado de acordo com os seus maiores valores observados, ou seja, os primers com maiores capacidades de discriminação. Vale ressaltar que para TATIKONDA et al. (2009), qualquer um dos valores, tanto índice do marcador (MI) quanto poder de resolução (RP), são eficientes para a discriminação a combinação de primers com maiores capacidades informativas.

De maneira geral, para estudos genéticos entre os acessos avaliados, os marcadores com melhores informações, isso é, com maiores valores de PIC, MI e RP, resultando em maior capacidade de informação, são os marcadores BECKY, por apresentar maior valores de PIC e RP, e o marcador UBC 880, por apresentar maior valor de MI e ter obtido altos valores de PIC e RP também.

4.7. SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE LÚPULO

Os indivíduos foram separados em cinco grupos distintos, dando destaque aos acessos 13 e 17 que não foram agrupados em nenhum grupo, resultado em um índice de similaridade de 20% e 23%, respectivamente. Os indivíduos que obtiveram maiores similaridades foram os acessos 19 e 20 (52,83%), acessos 21 e 24 (50,26%) e acessos 10 e 12 (50,12%). O agrupamento dos acessos baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard está apresentado na figura 4.

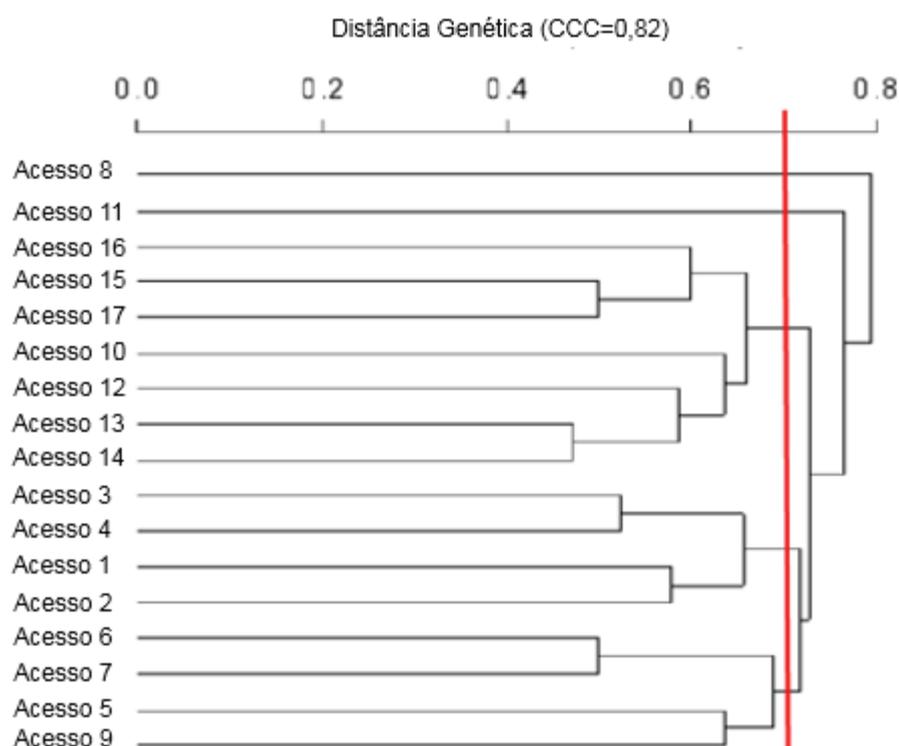


Figura 5: Dendrograma obtido com o método UPGMA, baseado no índice de similaridade de Jaccard, para os acessos de lúpulo, com corte na região de 30% de similaridade.

No Figura 4 é possível observar a formação de cinco grupos, utilizando um corte no dendrograma na similaridade genética média de 30% ou 70% de dissimilaridade. O resultado do coeficiente de correlação cofenética (CCC) demonstrou uma associação de 82% (CCC = 0,82) entre a similaridade obtida pelo índice de Jaccard e as representadas no dendrograma. Segundo

MOHAMMAD e PRASANNA (2003), quanto maior o valor de CCC, menor a distorção no agrupamento dos acessos, com $CCC > 0,7$ pode-se concluir que o método de agrupamento foi adequado.

Pelo dendograma da figura 4 é possível visualizar os acessos que obtiveram os maiores valores de similaridade, sendo eles: Acesso 19 e 20, com uma similaridade genética de 52,83%, seguido pelos acessos 21 e 24 com similaridade genética de 50,83% e por fim os acessos 10 e 12 com 50,12%. De modo geral, todos os 17 acessos analisados apresentam uma grande diversidade genética, mesmo aqueles mais similares (acesso 19 e 20 com 52,83%). Desta forma, os marcadores ISSR utilizados foram eficientes em mostrar variabilidade genética, resultando em dados muito importantes em etapas pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (AYA et al., 1997; FALEIRO, 2007; FALEIRO et al., 2008).

Os resultados da diversidade genética dos acessos ainda contornam problemas referentes a acessos duplicados ou redundantes. Um dos grandes problemas em programas de melhoramento, principalmente em bancos de germoplasma e coleções base de trabalho é justamente a duplicação de acessos, onde pode-se ter um conhecimento equívoco da quantidade real de genótipos diferentes que de fato o banco apresenta, erros que podem ser causados por identificações erradas que acabam dificultando a transferência de resultados e recomendações entre os diferentes programas de melhoramento, principalmente aqueles acessos que são mantidos *in vivo*, aumentando assim o gasto de tempo e de recursos para a avaliação e conservação do potencial genético dos acessos. O uso de marcadores moleculares nesse quesito tem sido utilizado para diminuir ou até mesmo eliminar tais problemas.

No caso do lúpulo, ter conhecimento da diversidade genética entre esses acessos analisados é importante justamente porque está se iniciando o programa de melhoramento desta espécie no Brasil. Apresentar uma grande quantidade de acessos, acessos com uma genética diferente um do outro, facilitam no aspecto de seleção de possíveis genitores, portanto é ideal que exista uma diversidade genética alta.

A escolha de genitores e o planejamento adequado de cruzamentos em programas de melhoramento, são fundamentais em programas de melhoramento (BORÉM, 1997). Os dados obtidos pelos marcadores ISSR podem auxiliar visando à maximização da heterose e das combinações gênicas desejadas. Da mesma forma, a escolha de genitores também pode ser baseada no agrupamento de potenciais genitores em grupos de similaridade, podendo existir uma redução no número inicial de cruzamentos sem perdas significativas da diversidade genética, diminuindo os custos sem perder a potencialidade do programa. Portanto, informações sobre diversidade genética obtida através destes marcadores ISSR geram uma grande quantidade de informações, que podem ser combinadas, fornecendo uma análise mais completa com relação a cada acesso (LIVINI et al., 1992; FALEIRO et al., 2004; VIEIRA et al., 2008).

4.8. SELEÇÃO DE “SEEDLINGS” DE LÚPULO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES MACHO-ESPECÍFICOS

Após as PCRs, os marcadores moleculares utilizados conseguiram identificar dos 75 genótipos testados, um total de 46 plantas fêmeas e 29 plantas machos. A figura 5, mostra o padrão de amplificação, dando a evidência de amplificação de banda somente para as plantas macho.

Figura 6: Padrão de amplificação dos 75 genótipos testados de lúpulo. Genótipos que obtiveram amplificação de bandas foram caracterizados como machos, assim como no controle positivo indicado pela seta.

Para o lúpulo, a identificação do sexo via seleção assistida por marcadores moleculares é de extrema importância, uma vez que seu florescimento somente ocorre na totalidade após o segundo ano. Tendo uma caracterização do sexo antecipada, irá ajudar tanto no planejamento da produção quanto na melhoria da seleção no processo de melhoramento (HAUNOLD, 1991). De modo geral, a realização destes testes de identificação do sexo em lúpulo tem importância principalmente para a escolha de possíveis genitores para programas de melhoramento (FALEIRO et al., 2001; 2004; YAMADA et al., 2009), de modo que, se ocorrer uma identificação precoce do sexo do lúpulo, ocorrerá uma otimização do espaço onde serão feitos os cruzamentos.

A eficiência do uso de marcadores na identificação do sexo em lúpulo foi observada por PATZAK et al., (2002), que conseguiram resultados satisfatórios utilizando os mesmos marcadores para a identificação de 840 genótipos de lúpulo oriundos de 7 diferentes cruzamentos, tendo uma eficiência de mais de 90%. Estes resultados da análise molecular foram ainda comparados com os resultados adquiridos pelos dados de florescimento a campo, mostrando assim a significância e importância da utilização destes primers.

A identificação precoce é especialmente importante para melhoristas, justamente porque existe uma atribuição de valor diferente a plantas masculinas e femininas, no caso do lúpulo a rápida identificação é um fator importante para o melhoramento, pois apenas as inflorescências não fertilizadas de plantas femininas são utilizadas na produção da cerveja. Tem-se acreditado que exista um mecanismo de cromossomo sexual que controla o desenvolvimento de plantas masculinas (XY) e femininas (XX), onde a expressão do sexo masculino é determinado por uma proporção de x:autossomo, embora o cromossomo Y seja indispensável para expressão completa do fenótipo masculino (POLLEY et al., 1997).

A eficiência da utilização destes marcadores visando identificar plantas machos e fêmeas de lúpulo também foram visualizadas por POLLEY et al. (1997) também. Os autores compararam um conjunto de plantas masculinas e femininas derivadas de um cruzamento de lúpulo com objetivo de identificar marcas moleculares associadas ao cromossomo Y, obtendo como resultado após teste de 900 primers, que 32 desses revelaram fragmentos específicos para plantas masculinas e desses 32 primers, 3 específicos para o cromossomo Y, sendo que um deles (Primer OPJ9), foi de baixa cópia em experimentos de hibridização e predominantemente presentes em plantas masculinas. Do mesmo modo outros autores buscaram utilizar marcadores para identificar plantas macho de lúpulo, como DANILOVA et al (2006), estudaram a aplicação de ISSR para detectar marcas moleculares na predição do sexo em lúpulo e revelaram que dois primers ISSR contêm fragmentos específicos em plantas masculinas e SEEFELDER et al (2008) estudaram marcas de ligação genéticas femininas e masculinas e constataram 10 marcadores macho específicos pela técnica AFLP.

5. CONCLUSÕES

- Dos 20 primers testados, nove demonstram ser eficientes para o estudo da diversidade genética dos acessos de lúpulo avaliados.
- Com os marcadores ISSR selecionados é possível verificar diversidade genética entre os acessos de lúpulo, sendo identificados cinco grupos distintos.
- Os marcadores macho-específicos utilizados resultam na seleção de plantas femininas e masculinas de lúpulo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Assim como os resultados da diversidade genética dos acessos de lúpulo quantos da análise molecular buscando identificar plantas machos e fêmeas são fundamentais no processo de melhoramento vegetal.
- Resultados forneceram informações a respeito que existe diversidade entre os acessos, portanto a capacidade e número de cruzamentos possíveis buscando indivíduos com características desejáveis é alta.
- A identificação sexual dos genótipos de lúpulo por marcadores moleculares será comparado com a avaliação a campo, a partir disso, serão feitas análises de comparação de proporções entre os resultados da análise molecular juntamente com o florescimento a campo, para saber a eficiência da identificação do sexo em plantas de lúpulo.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, A. N. Elimination of viruses from hop (*Humulus lupulus* L.) by heat therapy and meristem culture. **Journal of Horticultural Science**. v.50, p. 151-160, 1975.
- ALFENAS, A.C. Eletroferese de isoenzimas e prontéinas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. **Viçosa: Editora UFV**, 1998.
- ALICEWEB. Disponível em www.aliceweb.gov.br. Acesso em 21 fev. 2017
- ALMEIDA, C. M. A. Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens Brong.* (Bromeliaceae) na Mata Atlântica de Pernambuco. **Dissertação de Mestrado**, Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- ALSTROM-RAPAPORT, C.; LASCOUX, M.; WANG, Y.C.; ROBERTS, G.; TUSKAN, G.A. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). **Journal of Heredity**, v.89, p.44-49, 1998.
- ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 46, p. 173-174, 2003
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; MENARIM, H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Herança da resistência à Antracnose na Cultivar de Feijoeiro Comum Cornell 49-242. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28(3), p. 302-306, 2003.
- ALZATE-MARIN, AL.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v. 133, p. 165-169, 2003.
- ALZATE-MARIN, A. L; CERVIGNI, G.D. L; MOREIRA, M. A; BARROS, E. G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando o Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, 2005.
- ANDRADE A.R.M. Transformação de plantas. Planatina: Embrapa Cerrados, 2003. 27p. Disponível em: http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2003/doc/doc_102.pdf
Acesso em: 22 fev. 2018.
- ARADHYA, M.K.; DANGL, G.S.; PRINS, B.H.; BOURSQUOT, J.-M.; WALKER, M.A.; MEREDITH, C.P.; SIMON, C.J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. **Genetical Research**, v.81, p.179-192, 2003.
- AVISE J.C. Molecular markers, natural history and evolution. **New York: Chapman & Hall**, p.511, 1993.

BENITEZ J.L., MAGADAS J.A. Aproximación a la determinación del momento óptimo de madurez del lúpulo. **Cerveza y Malta**, v.2, p. 19-21, 1996.

BH (2001). Beer & Health Dossiers – Hop Properties of the hop plant. Disponível em: www.bierengezondheid.be
Acesso em: 12 mar. 2016

BH (2005). Beer & Health Dossiers - The Hop in the brewing process and as medicinal plant. Disponível em: www.bierengezondheid.be
Acesso em: 12 mar. 2016

BIENDL, M.; ENGELHARD, B.; FORSTER, A.; GAHR, A.; LUTZ, A.; MITTER, W.; SCHMIDT, R.; SCHONBERGER, C. Hops, Their cultivation, composition and usage. **Fachverlag Hans Carl**, 2014.

BLANK, A.F.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SANTOS NETO, A.L.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.113-116, 2004.

BORBA RS; GARCIA MS; KOVALLESKI A; OLIVEIRA AC; ZIMMER PD; BRANCO JSC; MALONE G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 565-569, 2005.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314–331, 1980.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, Brasília, DF v. 2, p. 679-735, 1999.

BROWN, A.H.D. ISOZYME, Plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics* v.52, p.145-157, 1978.

CARTER P.R., OELKE E.A., KAMINSKI A.R., HANSON C.V., COMBS S.M., DOLL J.D., WORF G.L., OPLINGER E.S. Hop - Alternative Fields Crops Manual, 2000. Disponível em <https://hort.purdue.edu/newcrop/afcm/hop.html>.
Acessado em 30 maio, 2016.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores inerentes à micropropagação. Campina Grande: Embrapa, p. 11-25, 2006. (Documentos, 148).

CATROVIEJO S., AEDO C., CIRUJANO S., LAÍN Z M., MONTSERRAT P., MORALES R., MUÑOZ GARMENDIA F., NAVARRO C., PAIVA J., SORIANO C. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. **Flora Iberica** v.3, p. 257-258, 1993.

CERVBRASIL, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2015. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php>. Acesso em 13 maio. 2016.

CHAVESBEDOYA, G., NUÑEZ V. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. **Euphytica**. p. 215–220, 2007.

CHO, R.J.; MINDRINOS, M.; RICHARDS, D.R.; SAPOLSKY, R.J.; ANDERSON, M.; DRENKARD, E.; DEWDNEY, J.; REUBER, T.L.; STAMMERS, M.; FEDERSPIEL, N.; THEOLOGIS, A.; YAN, W.H.; HUBBLL, E.; AU, M.; CHUNG, E.Y.; LASHKARI, D.; LEMIEUX, B.; DEAN, C.; LIPSHUTZ, R.J.; AUSUBEL, F.M.; DAVIS, R.W.; OEFNER, P. J. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, v.23, p.203-207, 1999.

CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C.Q.; RAMOS, V.H.; FALEIRO, F.G.; FRAGA, L.M.S. RAPD markers utilization and other parameters in determination of mango hybrids genitores. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, p. 164-167, 2006.

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetics distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, v.58, p.15-22, 1999.

CORREA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD-GOD, P.U.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Sequence characterization of an amplified region linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, v.40, p.804-807, 2000.

DALLAS, J.F. Detection of DNA “fingerprints” of cultivated rice by hybridization with a human microsatellite DNA probe. **Proceedings of the National Academic of USA**, v.85, p. 6831-6835, 1988.

DANILOVA, T. V; KARLOV, G. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) **Euphytica**, v.1, p.15-21, 2006.

DEKKERS, J.C.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nat Rev Genet**, p.22-32, 2002.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

DUKE, J. A. *Humulus lupulus* L. **Handbook of energy crops**, 1983. Disponível em: https://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Humulus_lupulus.html. Acesso em: 22 fev. 2018.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v.3, 1998.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Embrapa Cerrados, 2007.

FAOSTAT. Disponível em: www.fao.org. Acessado em 20 de abril de 2017.

FORSTER A. SCHMIDT R. The characterization and classification of Hop varieties. EBC Symposium on Hops. **EBC Monograph XXII**. p. 251-270, 1994.

FRITSCH, P. & RIESEBERG, L. H. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. **Nature**, p. 633- 636, 1992.

GANDER, E. S.; MARCELLIO, L. H. Plantas transgênicas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**. v. 1, p.34-37, 1997.

GIRI, C; SHYAMKUMAR, B; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v.18, p.115-135, 2004.

GORSKI, F. Seleção de primers ISSR e estrutura genética populacional de *Baccharis crispa* Spreng. (asteraceae) do sul do Brasil. **Dissertação de mestrado**, Guarapuava, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2015.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, p.81-89, 2001.

HAMRICK, J.L. Plant Population Genetics and Evolution. American Journal of Botany, v. 69, 1982.

HAUNOLD A; TSUCHYA T; GUPTA P.K. Cytology and cytogenetics of hops. **Genetics, breeding, evolution**, p. 551-563. 1991.

HEALE, J. B., LEGG T., CONNELL S. *Humulus lupulus* L. (Hop): In vitro culture; Attempted production of bittering components and novel disease resistance. **Biotecnology in Agriculture and Forestry**, v.7. 1989.

HILLER, S; GALE. G; ALFRED, H. Growing Hops, In the Home Garden. vol 19, 1996.

HILTON, J.F. Farm Fresh Hops for six generation, 2002. Disponível em <https://www.hopsteiner.com>. Acessado em 17 jun 2016.C

HOP GROWERS OF AMERICA. Statistical Report. 45th Annual HGA Convention Seattle, Washington, 2001.

HORLEMANN C., SCHWEKENDIEK A., HÖHNLE M., WEBER G. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 210-217, 1993.

HORMAZA, J.I.; DOLLO, L.; POLITO, V.S. Identification of RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.9-13, 1994.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.105-19, 1993.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite region in human DNA. **Nature**, v.315, p.67-73, 1985.

JAKSE, J; SATOVIC, Z. JAVORNIK, B. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). **Genome**, p.889-899, 2004.

JESUS, O. N. de. Caracterização morfológica e molecular de cultivares de bananeira. **Dissertação de Mestrado**, Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

JIANG, C.; SINK, K. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. **Euphytica**, v.94, p.329-333, 1997.

KANYAND, M.; DESSAI, A. P.; PRAKASH, C. S. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hipogaea*) plants in vitro. **Plant Cell Reports**, v.14. p.1-5, 1994.

KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, v.77, p.693-712, 1990.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, p. 30-33, 1997.

LAMEIRA, O. A; PINTO, J. E. B. P; CARDOSO, M. D. G; GAVILANES, M. L. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) Santa Maria, **Ciencia Rural** v.27, 1997.

KUMMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, v.17, p.143-182, 1999.

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, n.21, p.97-108, 2000.

LUCAS, M. A. K; FAGUNDES, J. D; PEREIRA D. D. SARMENTO, M. B. micropropagação de violeta-africana: estabelecimento e Iniciação de culturas

com a utilização de benzilaminopurina e Ácido indolacético. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.14, p.33-38, 2008.

LIU B; WENDEL JF. *Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton*. **Molecular Ecology**, p.205-208, 2001.

LYON DE CASTRO D. (2004). Transformação genética de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica para a introdução de resistência a fungos. **Tese de doutorado**, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2004

MAGDALITA, P.M.; DREW, R.A.; ADKINS, S.W.; GODWIN, I.D. Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.224-229, 1997.

MANSFELD'S DATABASE OF AGRICULTURAL AND HORTICULTURAL CROPS. Mansfeld's database Taxonomy Module Query for Names. htm © of the electronic version: IPK Gatersleben 2002.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ". **IPEF**, n.35, p.71-78, 1987.

MAY, B. Starch gel electrophoresis of allozymes. **Molecular genetics analysis of population**, p.1-27, 1992.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.508-517, 2001.

MILACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: Borém, Giudice, Sakiyama, Sedyama, Moreira, Portugal (eds.) *Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária*. Viçosa, 182p, 1998.

MROGINSKI, L; LEVITUS, G; ECHENIQUE, V; RUBINSTEIN, C; HOPP, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. v. 2 p.35-42, 2004.

MULCAHY, D.L.; WEEDEN, N.F.; KESSELI, R.; CARROLL, S.B. DNA probes for the Y-chromosomes of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. **Sexual Plant Reproduction**, v.5, p.86-88, 1992.

MURAKAMI, A. The practical application of PCR for the verification of hop variety. **MBAA Tec Quart**, p. 185-188, 1998.

MURAKAMI, A; DARBY, P; JAVORNIK, B; PAIS, M. S; SEIGNER, E. LUTZ, A. SVOBODA, P. Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. **Heredity**, p. 66-74, 2006.

NATIONAL HOP ASSOCIATION OF ENGLAND. What is a Hop? 2001. Disponível em: [www.hops.co.uk/sectionone/what is a hop.html](http://www.hops.co.uk/sectionone/what%20is%20a%20hop.html).

Acessado em 10 de janeiro de 2018.

ORINIAKOVA P., PAVINGEROVA D., MATOUSEK J. Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. **Rostlinna Vyroba**, v5. p. 219-227, 1999.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Developmento of rebiabile PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.985-993, 1993.

PARASNIS, A.S; GUPTA, V.S; TAMHANKAR, S. A; RANJEKAR, P.K. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. **Molecular Breeding**, v.6, p. 337-344, 200.

PATZAK, J; VEJL, P; SKUPINOVÁ, S. NESVADBA, V. Identification of sex in F₁ progenies of hop (*Humulus lupulus* L.) by molecular marker. **Rostlinná Výbora**, v.48, p. 318-321, 2002.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento in vitro de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 20, p. 301-306, 1996.

PERANI, L; RADKE, S; WILKE-DOUGLAS, M; BOSSERT, M. Gene Transfer Methods of Crop Improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, v.68, p. 566-570, 1986.

PILLAY, M. et al. *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, Humulus lupulus* L. level of genetic variability and segregation in F₁ progeny; **Theor Appl Genet**, p. 334-339, 1996.

PETRI, J.L.; ARGENTA, L.C.; SUZUKI, A. Efeitos do thidiazuron no tamanho e desenvolvimento dos frutos da macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, n.2, p.127-134, 1992.

POLLEY, A.; SEIGNER, E.; GANAL, M.W. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus* L.) using molecular markers. **Genome**, v.40, p.357-361, 1997.

PRECZENHAK, A. P. Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

PREVOST, A; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivares. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 107-112, 1999.

RIBEIRO, C. S.N; SILVA, H; DOS SANTOS, J. W; CARVALHO, J. M. F. C. Efeito do tiadiazuron na micropropagação in vitro de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, 2010.

RUAS, C.F.; FAIRBANKS, D.J.; EVANS, P.P.; STUTZ, H.C.; ANDERSEN, W.R.; RUAS, P.M. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). **American Journal of Botany**, v.85, p.162-167, 1998.

SAKAMOTO, K; SHIMOMURA, K; KOMEDA, Y; KAMADA, H; SATOH, S. A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. **Plant Cell Physiol**, p. 1549-1554, 1995.

SEEFELDER S; EHRMAIER H; SCHWEIZER G & SEIGNER E. Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. **Plant Breeding** v.119, p. 249, 2008.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v.5, p.2540-2568, 2006.

SILVA, A. T. Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD). **Tese de doutorado**, Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1999.

SILVA, F. DE A.S.E.; AZEVEDO C.A.V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, **American Society Of Agricultural And Biological Engineers**, v.7, 2009.

SILVA, M. L; QUEIROZ, M. A; FERREIRA, M. A. J. F; BUSO, G.S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.2, p. 405-408, 2006.

SILVA-PEREIRA, I; AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. Amplificação de DNA por PCR. Técnicas básicas em Biologia Molecular. 1.ed. Universidade de Brasília, cap. 6, p. 99-110, 2003.

SKOF, S; CERENAK, A; JAKSE, J. BOHANEK, B; JAVORNIK, B. Ploidy and sex expression in monoecious hop (*Humulus lupulus* L.) **Botany**, 2002.

STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B.; MANSHARDT, R. Using *randomly amplified polymorphic DNA* for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.697-701, 1993.

TATIKONDA L, SUHAS WANI P, KANNAN S, BEERELLI N, THAKUR SREEDEVI K, DAVID HOISINGTON A, DEVI P, RAJEEV VARSHNEY K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, p.505-513, 2009.

TOPPA, E.V.B. e JADOSKI, C.J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. In: **Scientia Agraria Paranaensis – SAP**, v12, n1. Marechal Candido Rondon, PR. p.1-5, 2013.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/769141>.

Acessado em 16 dez 2017.

VANCANNNEYT G, SCHMIDT R, O'CONNOR-SHANCHEZ A, WILLMITZER L, ROCHA-SOSA M. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 245-250, 1990.

WEEDEN, N.F. Approaches to mapping in horticultural crops. In: GRESHOFF, P.M. **Plant Genome Analysis**. p. 57-68, 1994.

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

WILLIAMS, J. G. K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI J.A.TINGEY S.V. **Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers**. *Methods Enzymol*, p. 704 - 740, 1993.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzymology**, v.395, p. 134-144, 2005.

WOLTERS, P.; POWELL, W.; LABUDAH, E.; SNAPE, J.; HENDERSON, K. Nucleotide diversity at homeologous loci in wheat. **Plant and animal Genome Conference**, p.103, 2000.

XU, Y; CROUCH, J.H. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. **Crop Science**, 2008.

ZIETKIEWICZ, E; RAFALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by *simple sequence repeat* (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. p. 176-183, 1994.