

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS
DE FUMO UTILIZADOS NO SUL DO BRASIL**

Mariangela dos Santos
Engenheira Agrônoma

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2002.

AGRADECIMENTOS

À professora Sandra C.K. Milach, pela orientação, exemplo profissional e amizade.

À Direção da DIMON do Brasil, por ter permitido a execução do curso. Em especial a Nestor Mähler, pela contribuição à minha formação e qualificação profissional.

À equipe da Pesquisa Genética da DIMON, pelo apoio e incentivo. Em especial a Irno Luiz Mallmann pela oportunidade de crescimento profissional, compreensão e colaboração decisiva na execução deste trabalho.

Ao professor Luis Carlos Federizzi, pelos ensinamentos e pela visão dinâmica e prática do melhoramento de plantas, e pela oportunidade de ingresso no programa de pós-graduação em Fitotecnia.

Aos professores José Barbosa, Maria Jane Sereno e Paulo Régis Ferreira pelo apoio, orientação e amizade durante o curso.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura, pela assistência prestada ao longo do curso.

Ao professor Gerson Oliveira, pelos ensinamentos de Inglês e pela amizade.

Aos meus amigos Alexandre Voltz, Edson Amorim, Mara C. Lopes e Paulo Fagundes com que pude dividir as alegrias e conquistas, bem como os momentos de dúvida e ansiedade ao longo do curso. Obrigada por compartilhar os conhecimentos nas horas agradáveis do nosso grupo de estudo.

Ao Fábio Roesch, pela amizade e auxílio na caracterização fenotípica.

A Marta M. Barbosa, pela amizade, ensinamentos e auxílio nas atividades de laboratório.

Ao colega Edson Amorim, pela dedicação e auxílio nas análises estatísticas.

A todos os colegas e amigos do curso de pós-graduação e em especial a Alexandre Volts, Cândida B. Cabral, Caren R. Lamb, Cláudia Lemons, Danielle Costenaro, Edson Amorim, Mara C. Lopes, Marta M. Barbosa, Paulo Fagundes, Paulo H. Oliveira, Paulo R. Silva, Renata P. da Cruz, Sérgio Lopes e Sérgio Silva pelo convívio, amizade e apoio fundamentais nos momentos mais difíceis do curso.

Aos bolsistas de iniciação científica Cândida R. Scherrer, Emerson Limberguer, Luis Marcelo Tisian e Roberto Weiler pela amizade, companherismo e auxílio nas atividades de laboratório.

Aos meus pais Paulo e Helena, irmãs e demais familiares pela motivação e apoio durante o curso.

A minha madrinha Maria Fernandina, que não mediu esforços para minha educação, permitindo que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo Breno pela compreensão da minha ausência, incentivo e apoio fundamentais durante o curso. É para você que dedico este trabalho.

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE FUMO UTILIZADOS NO SUL DO BRASIL^{1/}

Autor: Mariangela dos Santos

Orientador: Sandra Cristina Kothe Milach

RESUMO

O conhecimento do germoplasma disponível permite ao melhorista de fumo planejar estrategicamente o uso de genitores visando à ampliação da variância genética nas populações segregantes. Apesar de acreditar-se que a base genética do fumo é estreita, nenhum estudo foi feito com os genótipos utilizados pelos programas de melhoramento de fumo no Sul do Brasil. Os objetivos deste trabalho foram investigar a base genética e caracterizar genótipos de fumo utilizados em programas de melhoramento no Sul do Brasil através de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares, comparando diferentes métodos quanto à capacidade de distinção de genótipos individuais. Trinta e dois genótipos de fumo foram avaliados para 32 características fenotípicas, 271 marcadores RAPD, 86 microssatélites e 484 marcadores AFLP. Características fenotípicas e marcadores moleculares RAPD e AFLP foram eficientes para distinguir os genótipos estudados, permitindo evidenciar moderada similaridade e estreita base genética. Apesar disso, foi encontrada variabilidade para as características fenotípicas de maior importância econômica em fumo, sendo possível caracterizar individualmente os 32 genótipos através de 23 das 32 características fenotípicas avaliadas. Os genótipos K-326 LF e BY-64 divergiram dos demais e se destacaram para características de importância econômica, como rendimento, índice qualitativo de folhas, teor de nicotina e percentual de talo, sendo de grande potencial como genitores em cruzamentos elite. Foram identificados marcadores RAPD e AFLP específicos, capazes de distinguir, individualmente, os genótipos estudados. Os resultados deste estudo permitem concluir que os diferentes métodos utilizados se complementam na distinguibilidade dos genótipos e devem ser utilizados conjuntamente para o desenvolvimento de germoplasma e linhagens superiores de fumo.

^{1/}Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (122 p.) Abril, 2002.

PHENOTYPICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TOBACCO GENOTYPES USED IN THE SOUTH OF BRAZIL^{1/}

Author: Mariangela dos Santos
Adviser: Sandra Cristina Kothe Milach

ABSTRACT

By knowing the germplasm available, the tobacco breeder will be better supported to strategically plan the use of parents aiming the increase of genetic variance in segregant population. It is of general concern that tobacco has a narrow genetic base, but a study on the genotypes used in breeding programs in the south of Brazil, has not been performed yet. The objectives of the present study were to investigate the genetic base and to characterize tobacco genotypes utilized in breeding programs in the south of Brazil through phenotypical traits and molecular markers, comparing different methods in distinguishing individual genotypes. Thirty two tobacco genotypes were evaluated for 32 phenotypical traits, 271 RAPD markers, 86 microsatellites and 486 AFLP markers. Phenotypical traits, RAPD and AFLP molecular markers, were effective to distinguish the genotypes studied, estimating a moderate genetic similarity and a narrow genetic base. Nonetheless, variability for phenotypical traits of more economical importance in tobacco was found, making it possible to characterize the 32 genotypes individually through 23 from the 32 phenotypical traits evaluated. The genotypes K-326 LF and BY-64 differed from the others and distinguished themselves in traits of economical importance, such as yield, leaves quality, nicotine level and stem content, being of great potential as parents for superior crosses. Specific RAPD and AFLP markers were identified as able to individually distinguish the genotypes studied. The results of this study allow to conclude that the different methods utilized complement each other in distinguishing genotypes and that they must be utilized together for germplasm and variety development of tobacco.

^{1/}Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (122 p.) April, 2002.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	V
ABSTRACT	VI
RELAÇÃO DE TABELAS	VIII
RELAÇÃO DE FIGURAS	X
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I – Caracterização fenotípica de genótipos de fumo utilizados em programas de melhoramento no Sul do Brasil	31
1.1 INTRODUÇÃO	31
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
1.4 CONCLUSÕES	47
CAPÍTULO II – Variabilidade genética em fumo estimada através de marcadores RAPD, Microssatélites e AFLP	59
2.1 INTRODUÇÃO	59
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.4 CONCLUSÕES	75
CAPÍTULO III – Comparação entre marcadores fenotípicos e moleculares na estimativa de variabilidade genética no germoplasma de fumo utilizado pelos programas de melhoramento no Sul do Brasil	91
3.1 INTRODUÇÃO	91
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	93
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
3.4 CONCLUSÕES	104
CONCLUSÕES GERAIS	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1.1 Genótipos de fumo utilizados no estudo e suas respectivas origens. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	49
1.2 Média e desvio padrão de caracteres morfológicos utilizados para formação das classes. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	50
1.3 Médias dos caracteres rendimento em folhas, IQG, teor de nicotina e percentual de talo para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000. ...	51
1.4 Médias e classes dos caracteres morfológicos forma das plantas, estatura, ciclo e caule para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000. ...	52
1.5 Médias e classes dos caracteres morfológicos número de folhas, largura, comprimento e forma das folhas para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.	53
1.6 Médias e classes dos caracteres morfológicos de folha para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.	54
1.7 Classes dos caracteres morfológicos de inflorescência e fruto para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.	55
1.8 Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada na caracterização morfológica. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	57
2.1 Genótipos de fumo utilizados no estudo e suas respectivas origens. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	77
2.2 Marcados RAPD avaliados, número e tamanho de fragmentos em 36 genótipos de fumo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	78

2.3	Marcados microssatélites usados no estudo de diversidade genética de 36 genótipos de fumo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	79
2.4	Marcados AFLP avaliados em 36 genótipos de fumo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	80
2.5	Marcados RAPD e AFLP específicos para genótipos do programa DIMON. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	81
2.6	Similaridade genética média e desvio padrão de genótipos de fumo obtida através de marcadores RAPD microssatélites e AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	81
2.7	Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada em marcadores RAPD. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	85
2.8	Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada em marcadores microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	86
2.9	Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada em marcadores AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	87
3.1	Genótipos de fumo utilizados no estudo e suas respectivas origens. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	105
3.2	Similaridade genética média e desvio padrão de genótipos de fumo obtida através de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	106

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página	
1.1	Dispersão de 32 genótipos de fumo em relação a dois componentes principais com base em 13 características quantitativas. Número 1: K-326; 2: K-326LF; 3: NC-55; 4: RG-08; 5: K-149; 6: MsV17; 7: C-176; 8: DM-465; 9: V-961; 10: V-991; 11: V-201; 12: NC-95; 13: GLA-3; 14: LINC-95; 15: HINC-95; 16: NC-2326; 17: KY-14; 18: BYVa-509; 19: BY-37; 20: MBN-2; 21: BY-64; 22: TN-86; 23: TN-90; 24: KY-907; 25: B-972; 26: B-973; 27: B-991; 28: CSC-223; 29: BY-21; 30: HIBY-21; 31: LIBY-21; 32: LABY-21. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	56
1.2	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em 32 caracteres morfológicos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	58
2.1	Marcadores RAPD obtidos pelo <i>primer</i> OPA-13 para cultivares tipo Burlei. M: DNA ladder 100 pb; linha 1: TN-86; 2: TN-90; 3: KY-907; 4: KY-14; 5: MBN-2; 6: BY-21; 7: BY-37; 8: BY-64; 9: BYVa-509; 10: CSC-223; 11: HYBY-21; 12: LIBY-21; 13: LABY-21; 14: B-972; 15: B-973; 16: B-991. As flechas indicam os marcadores que diferenciam as linhagens irmãs TN-86 e TN-90. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	82
2.2	Padrão de amplificação do loco NTCP18 avaliado em 36 genótipos de fumo. M: DNA ladder 100 pb; linhas 1a 16: cultivares de fumo do tipo Virgínia; linhas 17 a 32: cultivares de fumo do tipo Burlei; linhas 33 a 36: espécies silvestres. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	83
2.3	Padrão de amplificação da combinação de <i>primers</i> M-CAG + E-ACT avaliado em 36 genótipos de fumo. M: marcador DNA ladder 100 pb; linhas 1-16: cultivares do tipo Virgínia; linhas 17-32: cultivares do tipo Burlei; linhas 33-36: espécies silvestres de Nicotinas. As flechas indicam marcadores identificados entre os genótipos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	84
2.4	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores RAPD. A SG média de genótipos tipo Burlei ($0,86 \pm 0,09$) foi utilizada para a separação dos grupos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	88

2.5	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores microssatélites. A SG média de genótipos tipo Burlei ($0,66 \pm 0,39$) foi utilizada para a separação dos grupos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	89
2.6	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores AFLP. A SG média de genótipos tipo Burlei ($0,88 \pm 0,07$) foi utilizada para a separação dos grupos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	90
3.1	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em caracteres fenotípicos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	107
3.2	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores RAPD. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	108
3.3	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	109
3.4	Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores RAPD + AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	110
3.5	Correlação entre as matrizes de similaridade de caracteres fenotípicos e marcadores RAPD. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	111
3.6	Correlação entre as matrizes de similaridade de caracteres fenotípicos e marcadores AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	111
3.7	Correlação entre as matrizes de similaridade de marcadores RAPD e AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	112
3.8	Correlação entre as matrizes de similaridade de caracteres fenotípicos e marcadores RAPD + AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.	112

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

O fumo é a principal cultura não alimentícia, amplamente cultivada em todos os continentes, com produção anual em torno de 6 milhões de toneladas e crescimento previsto pela FAO de 1 a 1,5% ao ano até 2005, movimentando cerca de 20 bilhões de dólares. Por constituir cultura de mão-de-obra intensiva, calcula-se que envolva em torno de 33 milhões de empregos na lavoura, aproximando-se de 100 milhões as pessoas ocupadas direta e indiretamente com a atividade fumageira (ABIFUMO, 1999).

Apesar de ser cultivado em mais de cem países, dois terços do fumo produzido provêm de apenas seis países. A China é o maior produtor mundial, seguido pela Índia, Estados Unidos, Brasil, Turquia e Zimbábue. Os Estados Unidos mantêm a posição de maior importador, seguido da Alemanha e Rússia (ABIFUMO, 2000). Aproximadamente um terço do fumo produzido é comercializado no mercado internacional.

Embora com desempenho marcante no desenvolvimento da economia brasileira, a atividade fumageira é pouco conhecida da sociedade. Na região Sul do Brasil, a cultura é desenvolvida por mais de 150 mil famílias de pequenos produtores, abrangendo cerca de 680 municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Este contingente de produtores realiza o plantio

anual de aproximadamente 265 mil hectares de fumo, sendo responsáveis pela produção de mais de 500 toneladas de tabaco/ano, cujo volume coloca o Brasil na posição de quarto maior produtor mundial do produto. Do total produzido, 65% é exportado para mais de 70 países, gerando divisas superiores a 1 bilhão de dólares ao ano e posicionando o fumo como terceiro produto primário na pauta das exportações brasileiras. Com esta performance, o Brasil mantém-se na posição de maior exportador mundial de fumo em folha desde 1993 (SINDIFUMO, 2000).

A fumicultura é desenvolvida na região Sul através do sistema Integrado de Produção entre indústrias e produtores. Por se tratar de atividade intensiva de mão-de-obra, a cultura do fumo é uma das poucas cuja rentabilidade assegura ao pequeno produtor remuneração adequada à manutenção familiar, evitando seu êxodo rural para as áreas urbanas. Nenhum outro produtor rural recebe mais atenção, incluindo programas educacionais, desportivos e culturais promovido pelas empresas. É o único produto que tem preço previamente estabelecido e garantia de compra total da produção. No Brasil, a área cultivada com fumo tem se mantido quase constante, limitada pela pequena elasticidade do mercado, que tem que ser conquistado com melhor preço e qualidade.

Para manter a privilegiada posição de maior exportador mundial de fumos, o setor investe constantemente na pesquisa e desenvolvimento. O melhoramento genético da espécie, realizado pelas empresas, colocou a disposição dos agricultores genótipos adaptados ao Sul do Brasil, com elevado rendimento e qualidade, proporcionando uma boa rentabilidade da cultura. Além disso, disponibilizou o uso de cultivares resistentes a pragas e moléstias, representando um importante fator para redução nas quantidades de agrotóxicos

na fumicultura, diminuindo assim riscos de contaminação humana e impactos ambientais.

Apesar dos avanços significativos no melhoramento do fumo, para a eficiente obtenção de ganhos genéticos no desenvolvimento de novos cultivares, é necessário o conhecimento da constituição genética da espécie. A caracterização da variabilidade genética é fundamental para o conhecimento do germoplasma disponível e planejamento dos programas de melhoramento de fumo. O conhecimento dos genótipos permite a escolha adequada de genitores visando a ampliação da variância genética nas populações segregantes.

Com a lei de proteção de cultivares, o registro de novos cultivares através de descritores mínimos passou a ser requerido. Trinta e sete características agronômicas e morfológicas fazem parte da lista de descritores mínimos requeridos para registrar um novo cultivar de fumo, propostos pelo SINDIFUMO. A utilidade destes descritores para este fim, contudo, não foi determinada e é possível que alguns deles sejam pouco informativos e de pouca utilidade.

Outra metodologia para caracterização da diversidade genética é a utilização de marcadores moleculares de DNA que permitem a identificação direta do genótipo, sem a influência do ambiente. Esta tecnologia possibilita a identificação, organização e gerenciamento de coleções de germoplasma, identificação e proteção do germoplasma elite do programa e identificação e seleção de genitores superiores e melhores combinações híbridas.

No Sul do Brasil, os genótipos que serviram de base para o melhoramento do fumo foram, na sua maioria, introduções norte americanas de *Nicotiana tabacum*. Apesar de acreditar-se que a base genética do fumo utilizado

em programas de melhoramento no Sul do Brasil é estreita, nenhum trabalho foi realizado até o momento para testar esta hipótese.

A hipótese é que caracteres morfológicos não permitiriam uma eficiente caracterização de genótipos de fumo utilizados em programas de melhoramento no Sul do Brasil, porque estes são altamente influenciados pelo ambiente e a base genética deste germoplasma é muito estreita. Por outro lado, através de marcadores moleculares, que identificam o polimorfismo a nível de DNA e não sofrem a ação do ambiente, seria possível caracterizar o germoplasma de fumo estudado e efetuar a sua distingüibilidade.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral caracterizar a variabilidade genética existente em germoplasma de fumo utilizado em programas de melhoramento no Sul do Brasil através de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

1. Caracterizar genótipos de fumo de diferentes origens a partir de características fenotípicas e marcadores moleculares;
2. Avaliar o uso de características fenotípicas quanto à capacidade de distinguir genótipos de fumo para fins de registro de cultivares;
3. Estimar o grau de similaridade genética no germoplasma de fumo avaliado através de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares;
4. Comparar os diferentes tipos de estimadores quanto a sua habilidade de distinguir os genótipos em estudo;
5. Identificar marcadores moleculares para os genótipos do programa de melhoramento da empresa DIMON.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e evolução do fumo (*Nicotiana tabacum*)

O fumo é uma espécie autógama, de cultivo anual, com um ciclo de desenvolvimento de aproximadamente 190 dias. Originado das Américas, Austrália e algumas ilhas do Pacífico Sul (Gerstel, 1979), o gênero *Nicotina* é membro da família Solanaceae e está dividido em 3 subgêneros (Rustica, Tabacum e Petunioides), compreendendo mais de 64 espécies reconhecidas (Goodspeed, 1954; Narayan, 1987). A maioria dos fumos cultivados pertence à espécie *Nicotina tabacum* L., um alotetraplóide que apresenta $2n = 4x = 48$ cromossomos, distribuídos nos genomas S e T. Grande parte dos estudos de genética e citologia indica que a espécie *N. tabacum* se originou da hibridização de duas espécies diplóides, *N. sylvestres* ($2n = 24$) com genoma S (maternal), e *N. tomentosiformis* ($2n = 24$), que apresenta o genoma T (paternal) (Gerstel, 1960, 1963; Bland et al., 1985; Okamuro & Goldberg, 1985; Sperisen et al., 1991). A origem e a similaridade genética das duas espécies genitoras resultaram, inicialmente, num alto nível de redundância genética no genoma do fumo (Wernsman & Ruffy, 1987). Muitas questões sobre a origem e a variabilidade genética do fumo permanecem não respondidas como quando a hibridização entre as espécies genitoras ocorreu; se houve contínuo fluxo gênico das espécies genitoras para a nova espécie e quanto da variabilidade genética presente nos genitores foi incluída em *Nicotiana tabacum*.

2.2 Melhoramento genético do fumo

Os principais objetivos dos programas de melhoramento genético de fumo foram, inicialmente, a resistência a moléstias com melhoras no rendimento e nos aspectos físicos da folha curada. Pouca atenção foi dada à composição química do fumo curado, e durante a década de 50, a seleção de cultivares com altos rendimentos reduziu a nicotina no fumo tipo Virgínia para níveis inaceitáveis. Programas oficiais para assegurar a qualidade dos fumos americanos foram implementados, objetivando resolver este problema (Wernsman, 1999).

Atualmente, o principal objetivo dos programas de melhoramento é o desenvolvimento de cultivares com características desejáveis para os agricultores e para a indústria. Em geral, as características importantes para os agricultores são potencial de rendimento, qualidade, resistência a moléstias e facilidade na colheita e cura. A indústria busca um produto com alto índice de qualidade, isto é, folhas com características físicas e químicas desejáveis, necessárias para a produção de misturas com aroma e sabor (Legg & Smeeton, 1999). As características físicas e químicas que determinam a qualidade no fumo são a coloração, elasticidade, relação talo/lâmina, oleosidade, teor de açúcares e teor de alcalóides, entre outras.

Vários são os métodos de melhoramento empregados para a espécie. Entre eles, a seleção massal foi responsável pelo desenvolvimento dos principais tipos de fumo usados hoje pela indústria, quais sejam Virgínia, Burlei e Oriental. Isto ocorreu bem antes da redescoberta das leis de Mendel e este método ainda é empregado no desenvolvimento de algumas populações de outros tipos de fumo (Legg & Smeeton, 1999).

O método genealógico, ou modificações deste, é o principal procedimento empregado no melhoramento do fumo, quando o objetivo é combinar características desejáveis encontradas em duas ou mais cultivares.

Quando o objetivo é obter resistência a moléstias ou alguma característica de outra espécie do gênero *Nicotiana* ou outro tipo de fumo, o método escolhido tem sido o retrocruzamento. A transferência de genes de resistência a diversas moléstias, através da hibridização interespecífica seguida por retrocruzamento, atesta a importância e a eficiência deste método no melhoramento do fumo (Legg & Smeeton, 1999).

Outro método que está sendo utilizado é o duplo haplóide, porém, sua eficiência em relação aos outros métodos é questionável para populações onde a frequência dos genótipos desejáveis esperada é baixa (Legg & Smeeton, 1999). A maior limitação é o processo de duplicação dos cromossomos das plantas haplóides (Wernsman, 1999).

Diversos estudos com o fumo tipo Virgínia demonstraram o potencial da seleção recorrente no melhoramento do fumo, especialmente no aumento da frequência de genes desejáveis numa população melhorada (Matzinger & Wernsman, 1979).

Muitos avanços têm ocorrido na genética e melhoramento do fumo nos últimos anos. Melhoristas tem desenvolvido cultivares com alto rendimento, qualidade e resistência a diversas moléstias. Além disso, informações sobre a herança de muitas características importantes foram obtidas e uma grande quantidade de germoplasma foi coletada e caracterizada. Esta base sólida de informação genética e de germoplasma realça as perspectivas para avanços futuros. Também, novas informações e tecnologias em química e biologia,

especialmente em engenharia genética, têm aplicações promissoras no melhoramento do fumo (Legg & Smeeton, 1999).

2.3 Variabilidade genética e melhoramento

A variabilidade genética é a base do melhoramento de plantas. A variabilidade genética existente dentro e entre as espécies de plantas está relacionada com a sua evolução e envolve três causas principais: variação mendeliana, hibridização interespecífica e poliploidia (Federizzi, 1998).

O fumo (*Nicotiana tabacum*) é um anfidiplóide natural contendo aproximadamente 77 % do DNA total do núcleo com seqüências repetitivas (Narayan, 1987), a maioria das quais parece ter sido conservada durante o processo de evolução molecular do gênero (Volkov et al., 1999). O DNA não repetitivo, o qual inclui a maioria dos genes estruturais, compõe apenas uma pequena fração do genoma total do fumo, mas deve ser responsável pela maior parte da variação na morfologia, características de crescimento, composição bioquímica e características qualitativas encontradas entre os acessos da espécie.

2.4 Caracterização da Variabilidade Genética

Na implantação de um programa de melhoramento, uma das principais necessidades do melhorista é o conhecimento do germoplasma disponível e a capacidade de identificar plantas que possuam genes de interesse em uma progênie segregante (Weeden et al., 1994).

A seleção de genitores e a caracterização da variabilidade genética existente são decisivas para o incremento de eficiência em programas de

melhoramento (Barbosa Neto, 1995). Outro aspecto fundamental é o conhecimento dos mecanismos de herança dos caracteres de interesse agrônômico (Bered et al., 1997). O grau de relacionamento genético entre genótipos pode ser estimado através de diferentes métodos, podendo ser baseado em dados de genealogia, caracteres morfológicos e marcadores moleculares ao nível de DNA (Melchinger et al., 1994).

2.4.1 Caracterização da variabilidade genética através de marcadores fenotípicos

Caracteres fenotípicos têm sido utilizados desde os tempos de Mendel em estudos de genética e melhoramento. As principais limitações do uso deste tipo de marcador para a caracterização de germoplasma são o efeito do ambiente, a ação gênica, a epistasia e a pleiotropia, que podem dificultar a avaliação. Apesar disso, diversos autores têm utilizado marcadores fenotípicos para caracterizar germoplasma de diferentes espécies. Alguns exemplos em espécies vegetais seguem.

Bered (1999) avaliou 53 genótipos de trigo de diferentes procedências e épocas de lançamento utilizando os caracteres adaptativos ciclo e estatura. A autora concluiu que houve uma redução significativa dos dois caracteres analisados no decorrer das últimas décadas e o agrupamento dos genótipos revelou a formação de cinco grupos principais, constituídos basicamente de cultivares da mesma época.

Mais de 3000 acessos de trigo tetraplóide de diversas origens foram caracterizados através de caracteres quantitativos, o que permitiu a formação de cinco grupos de acordo com a origem dos genótipos (Spagnoletti Zeuli & Qualset,

1987). Também, Van Beuningen & Busch (1997) avaliaram 289 cultivares de trigo quanto à distância genética estimada por caracteres morfológicos. Os cultivares foram agrupados em 17 grupos de mesma origem e época de lançamento.

Em aveia, Souza & Sorells (1991) avaliaram a relação genética de 70 variedades através de caracteres agronômicos de interesse como período de florescimento, estatura, diâmetro do colmo e peso médio de grãos.

Características fenotípicas, influenciadas por fatores ambientais, têm sido usadas para caracterização e registro de cultivares de fumo em diferentes países, com base na descrição recomendada pela UPOV (*Union pour la Protection des Obtentions Variétales*). Caracteres como forma e tamanho da folha, número de folhas, altura da planta e comprimento de internódios são importantes porque influenciam o manejo, o rendimento e a composição química das folhas. Características desejáveis incluem a insensibilidade ao florescimento precoce, que reduz o número de folhas por planta; resistência ao acamamento; amadurecimento uniforme das folhas; ausência de excessiva sensibilidade à quebra da folha e inclinação. Ainda, cultivares do tipo Burlei não devem ter estatura muito elevada e possuir um diâmetro moderado do caule para evitar rachaduras por ocasião da colheita. Informações sobre o mecanismo de herança de muitos destes caracteres de interesse agrônomo foram obtidas e contribuíram de forma efetiva para o melhoramento genético da espécie. Diversos mutantes de grande efeito sobre o fenótipo foram identificados para caracteres de folha, altura da planta e comprimento de internódios (Humphrey et al., 1964; Smith, 1950; Legg & Collins, 1982).

Cruzamentos interespecíficos e retrocruzamentos em espécies do gênero *Nicotiana* produziram 89 linhas de adição que foram classificadas em 12

grupos através de características morfológicas, como hábito de crescimento, altura da planta, forma, tamanho e coloração das folhas e forma e tamanho das flores (Suen et al., 1997).

A diversidade genética em fumo tem sido avaliada através de caracteres agrônômicos e morfológicos. Wang et al. (2001) utilizaram caracteres morfológicos qualitativos para selecionar uma amostra representativa da coleção de germoplasma da China, visando posterior avaliação genética. Mais de 400 acessos foram selecionados, onde a avaliação dos caracteres mostrou que estes foram representativos do total da coleção para o estudo de diversidade genética. Três componentes principais foram obtidos como referência para o melhoramento do fumo. Torrecilla (2001) avaliou a coleção de germoplasma de Cuba, composta de 758 acessos de *Nicotiana tabacum* e 19 espécies selvagens do gênero *Nicotiana*, através de 40 caracteres morfológicos qualitativos e quantitativos. A análise multivariada permitiu o agrupamento dos acessos em grupos de acordo com o tipo de fumo. Elevada variabilidade genética foi observada. Além disso, este estudo revelou variações entre os acessos quanto à reação a moléstias. Foram determinados 22 acessos resistentes ao mofo azul (*Peronospora tabacina*), 111 resistentes ao caule preto (*Phytophthora parasitica*) e 64 resistentes ao vírus do mosaico. A caracterização deste germoplasma serve como base para o melhoramento e deve contribuir para a preservação da diversidade genética do fumo.

2.4.2 Caracterização da variabilidade genética através de marcadores moleculares de DNA

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (Milach, 1998). Uma das principais vantagens do uso deste tipo de marcadores é a identificação direta do genótipo, sem a influência do ambiente. Segundo Lee (1995), marcadores moleculares podem ser muito úteis em programas de melhoramento. Algumas de suas aplicações são a caracterização da diversidade genética, possibilitando a identificação, organização e gerenciamento de coleções de germoplasma; identificação e proteção do germoplasma elite do programa e identificação e seleção de genitores superiores e melhores combinações híbridas. Ferreira & Grattapaglia (1998) sugerem, ainda, outras aplicações como a certificação de pureza genética de linhagens e híbridos, construção de mapas genéticos de ligação, mapeamento de características quantitativas e de importância econômica, introgressão de características via retrocruzamento assistido por marcadores, entre outras. A caracterização molecular de diversidade genética no germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na seleção dos genitores de populações básicas no estabelecimento de programas de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minisatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microsatélite ou

SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) (Milach, 1998).

2.4.2.1 Marcadores RAPD

A técnica de RAPD (random amplified polimorphic DNA ou DNA polimórfico amplificado ao acaso) se baseia na reação em cadeia da polimerase ou PCR, em que segmentos de DNA são amplificados ao acaso a partir de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores da reação) de seqüência arbitrária (Williams et al., 1990). A reação de RAPD consiste de ciclos repetidos de desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão do DNA, resultando na amplificação de segmentos de DNA que podem ser visualizados em gel de agarose. A reação de amplificação ocorre a partir do momento em que o *primer* encontra uma seqüência complementar a sua no DNA genômico do indivíduo a ser analisado. Assim, o polimorfismo é detectado através de segmentos de DNA que são amplificados em alguns indivíduos e não em outros. Os marcadores moleculares do tipo RAPD estão entre os mais utilizados e difundidos devido a sua facilidade de uso, rapidez e baixo custo. No entanto, também apresentam algumas desvantagens que podem ser limitantes para sua utilização, como a baixa repetibilidade, pouca consistência entre laboratórios e sua natureza dominante, não permitindo a distinção entre indivíduos heterozigotos e homozigotos dominantes (Cruz & Milach, 1998).

2.4.2.1.1 Utilização de marcadores RAPD nas culturas agrícolas

Este tipo de marcador tem sido utilizado com sucesso no melhoramento vegetal, em diferentes tipos de estudo e em espécies distintas.

Uma das aplicações é a determinação da identidade e diversidade genética. Baird et al. (1992) caracterizaram híbridos somáticos inter e intra específicos de batata através de marcadores RAPD e discutem sua utilização na introgressão de genes de resistência a moléstias para a cultura.

Cao & Oard (1997) utilizaram marcadores RAPD e dados de genealogia para caracterizar 23 cultivares e linhagens americanas de arroz. Cultivares com mesma maturidade e tipo de grão foram geralmente agrupadas, considerando ambos os tipos de marcadores. De forma similar, Ko et al. (1994) avaliaram a diversidade genética entre 37 variedades de arroz de diferentes origens e encontraram elevada similaridade entre genótipos americanos e australianos.

Com o objetivo de estimar a diversidade genética entre e dentro de acessos de trigo spelta e macha, Cao et al. (1998) utilizaram marcadores RAPD. O agrupamento destes acessos baseada no coeficiente de similaridade de Jaccard foi consistente com suas origens geográficas. Ainda, foram identificados alguns acessos com padrões RAPD idênticos, indicando que estes podem ser acessos duplicados nas coleções de germoplasma.

Coletta Filho et al. (1998) utilizaram marcadores RAPD para caracterizar 35 acessos de citros. Segundo os autores, a técnica foi eficiente para este tipo de avaliação, com a formação de diferentes grupos de similaridade, sendo consistente com a classificação taxonômica existente.

Casas et al. (1999) utilizaram marcadores RAPD para caracterização inter e intra-específica de germoplasma de pêssego (*Prunus sp.*) da Espanha. Os grupos formados foram concordantes com a classificação utilizada para caracterizar a espécie, baseada principalmente em descritores morfológicos.

Outro estudo semelhante foi realizado por Franco et al. (2001) para avaliar a diversidade genética entre cultivares de feijão através de marcadores RAPD. As análises de agrupamento confirmaram a ampla diversidade genética existente entre germoplasmas tropicais de feijão, separando os cultivares em dois grupos principais, correspondendo aos centros de domesticação da espécie.

Rodriguez et al. (1999) caracterizaram 134 acessos de seis espécies de pimenta (*Capsicum sp.*) utilizando marcadores RAPD. A análise de agrupamento baseada nas distâncias genéticas foi concordante com a classificação prévia existente, com exceção de seis acessos. Dez acessos duplicados foram encontrados. A utilização desta técnica se justifica, principalmente, devido à dificuldade de realizar a identificação taxonômica, baseada em caracteres morfológicos, de difícil avaliação. Um trabalho semelhante para esta espécie foi realizado por Lefebvre et al. (2001) para estimar a distância genética entre 47 linhagens de pimenta através de marcadores do tipo AFLP, RAPD e 41 caracteres morfológicos. Os resultados indicaram alta correlação entre marcadores moleculares e destes com caracteres morfológicos. Em relação à proteção de cultivares de pimenta, os autores sugerem que marcadores moleculares seriam uma informação complementar em caso de similaridade fenotípica.

Egashira et al. (2000) utilizaram marcadores RAPD para caracterizar 50 acessos de nove espécies do gênero *Lycopersicon*. O agrupamento dos acessos mostrou a formação de quatro grupos principais, confirmando as classificações baseadas em dados morfológicos. Ainda, acessos do complexo peruviano apresentaram a maior diversidade genética dentro do gênero

Lycopersicon e poderiam contribuir com características úteis para o melhoramento do tomate.

2.4.2.1.2 Utilização de marcadores RAPD na cultura do fumo

O melhoramento tradicional do fumo tem sido baseado na identificação de genótipos superiores de uma população segregante, seguido de sua seleção e uso em gerações subseqüentes. A seleção é normalmente feita com base no fenótipo, que é função do genótipo, do ambiente e da interação entre eles. As correlações genéticas e ambientais que ocorrem entre caracteres agrônômicos, componentes químicos da folha curada e constituintes do fumo processado representam uma das maiores dificuldades para o melhoramento. A separação dos efeitos genéticos e ambientais é geralmente difícil para características quantitativas, rendimento de folhas e qualidade, por exemplo, sendo necessários muitos testes a campo em diversos ambientes. O melhoramento para características de herança simples e controladas por um ou dois genes também pode ser dificultado se ambientes apropriados para avaliação não estiverem disponíveis (Wernsman, 1999).

Em muitas espécies de importância genética, grandes progressos foram feitos nos últimos 15 anos através do desenvolvimento de tecnologias moleculares que permitiram a identificação de genótipos desejáveis em laboratório (Wernsman, 1999). No entanto, há poucos relatos na literatura sobre o uso desta tecnologia para melhoramento do fumo. Alguns autores têm relatado a eficiência do uso destes marcadores de DNA em diferentes estudos com a cultura, entre eles a introgressão de genes de resistência a moléstias, análises de

filogenia, construção de mapas de ligação genética e diversidade genética de germoplasma. Alguns exemplos de aplicações seguem.

Marcadores do tipo RAPD, associados a um gene dominante de resistência à podridão preta das raízes causada pelo fungo de solo *Chalara elegans* foram identificados por Bai et al. (1995). Segundo os autores, a seleção assistida por estes marcadores pode acelerar a introgressão de genes de resistência nos cultivares comerciais de fumo, uma vez que as plantas resistentes nas populações retrocruzadas podem ser facilmente selecionadas, sem a necessidade de testes na presença da moléstia. Marcadores RAPD associados à resistência a moléstias bacterianas também foram identificados para a cultura. A partir da análise de bulks segregantes (BSA), Yi et al. (1998a) identificaram marcadores ligados a um gene dominante conferindo resistência ao fogo selvagem, causado por *Pseudomonas syringae*.

Em outro estudo, Noguchi et al. (1996) identificaram marcadores RAPD associados a genes de resistência a PVY, um complexo virótico que causa grandes danos à cultura do fumo em diversas regiões de cultivo. O mapeamento do gene RK, que confere resistência a nematóides, foi relatado por Yi et al. (1998b) utilizando marcadores RAPD. A origem do gene RK foi elucidada através do uso deste tipo de marcador, indicando que *Nicotiana tomentosa* é a provável fonte deste gene nos fumos cultivados (Yi & Rufty, 1998). Brake & Rufty (2000) identificaram marcadores RAPD associados ao gene BMR conferindo resistência ao mofo azul, causado por *Peronospora tabacina* Adam. Foi encontrada alta correlação entre a classificação fenotípica, baseada em testes a campo e a classificação por marcadores RAPD. A seleção assistida por estes marcadores

pode ser um método preliminar de avaliação para eliminar genótipos altamente suscetíveis.

Os marcadores RAPD têm sido utilizados para análise de filogenia entre espécies do gênero *Nicotiana*. Yu & Lin (1997) avaliaram a variação inter e intra-específica de 18 genótipos pertencentes a nove espécies de *Nicotiana* através de marcadores RAPD. Elevado nível de polimorfismo foi encontrado. Os genótipos foram agrupados em 2 grupos principais, correspondendo às seções *Tomentosae* e *Alatae* e em concordância com prévias classificações (Goodspeed, 1954). Este estudo demonstrou que marcadores RAPD constituem uma técnica rápida e sensível para identificação de relacionamentos filogenéticos entre e dentro de espécies do gênero *Nicotiana*. Marcadores RAPD, juntamente com AFLP, foram utilizados para construção de um mapa de ligação genética entre *Nicotiana plumbaginifolia* e *N. longiflora* (Lin et al., 2001). Nove grupos principais de ligação foram mapeados, cada um contendo mais de nove marcadores por loco.

Marcadores moleculares tem sido empregados para a identificação de diversidade genética no fumo, porém o nível do polimorfismo encontrado é geralmente baixo. Pesquisas conduzidas na Universidade da Carolina do Norte demonstraram que menos do que um polimorfismo é revelado para cada 10 *primers* testados (Wernsman, 1999). Também foram utilizados 1500 *primers* RAPD para avaliar populações duplo-haplóides de fumo tipo Virgínia e Burlei e detectou-se baixo polimorfismo (Yi apud Wernsman, 1999, p.24).

Marcadores moleculares RAPD foram utilizados para avaliar o relacionamento entre duas espécies progenitoras do fumo e seis híbridos somáticos gerados a partir de fusão e cultura de protoplastos (De Filippis et al.,

1996). O uso de gel de poliacrilamida para eletroforese, corado com prata, provou ser um método rápido, confiável e muito sensível de detecção de polimorfismo. Quatro primers amplificaram bandas polimórficas suficientes para distinguirem todas as plantas. Os resultados mostraram que RAPD é uma tecnologia versátil e sensível para análise do genoma dos híbridos. Da mesma forma, Coussirat (1993) utilizou marcadores RAPD para a identificação de híbridos somáticos entre *N. tabacum* e *N. rustica*. Segundo o autor, estes marcadores constituem um método simples e rápido para seleção precoce de híbridos somáticos ou originados através de técnicas tradicionais de seleção. Coussirat (1994) estudou a diversidade genética e a identificação de cultivares de fumo através de marcadores RAPD. Foram utilizadas 160 *primers* no estudo, porém apenas nove *primers* foram polimórficos para as 32 cultivares testadas. Segundo o autor, apesar do baixo nível de polimorfismo encontrado entre variedades, esta técnica permite um melhor gerenciamento das coleções de germoplasma e pode ser uma ferramenta complementar para ajudar os melhoristas de fumo na melhoria do programa. Outro estudo de variabilidade genética no gênero *Nicotiana*, utilizando marcadores moleculares RAPD, foi realizado por Del Piano et al. (1998). Os autores avaliaram 36 linhagens de fumo pertencentes a diferentes grupos e outras 12 espécies do gênero *Nicotiana*. Os resultados obtidos mostraram que a maior parte dos fragmentos amplificados nas variedades de fumo foram monomórficos, porém foi encontrado um alto nível de polimorfismo para as 12 espécies de *Nicotiana* utilizando apenas dois *primers*. Os autores salientaram que um teste cuidadoso de seleção de outros *primers* poderia permitir a detecção de polimorfismo para identificação de variedades de fumo. Ainda, acreditam que marcadores RAPD podem contribuir para uma melhor caracterização do gênero e

ser uma ferramenta importante no monitoramento e manutenção de coleções botânicas.

2.4.2.2 Marcadores Microssatélites

Microssatélites são seqüências de um a quatro pares de bases repetidas e adjacentes distribuídas no genoma. Em plantas, uma pesquisa nos bancos de dados de seqüências de DNA publicadas revelou que sítios de microssatélites são largamente distribuídos com freqüência de um a cada 50 mil pares de bases (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Esse tipo de marcador utiliza *primers* específicos que amplificam regiões com DNA repetitivo (Milach, 1998). Cada loco de microssatélite é analisado individualmente ao se utilizar o par de primer construído especificamente para sua amplificação.

Para detecção de seqüências repetidas via PCR, utiliza-se eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução, uma vez que é necessário um gel adequado para separação de segmentos que diferem em poucos pares de bases. A visualização das bandas no gel geralmente é feita por coloração com nitrato de prata, mas também pode ser utilizado o brometo de etídio. É uma técnica mais cara e elaborada devido à necessidade do desenvolvimento prévio dos marcadores, porém o elevado polimorfismo revelado, a expressão co-dominante e a completa cobertura do genoma fazem com que seja uma das melhores opções para mapeamento genético e identificação e discriminação de genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.4.2.2.1 Utilização de marcadores microssatélites nas culturas agrícolas

Marcadores tipo microssatélites têm sido utilizados para caracterização de germoplasma de diferentes espécies. Rongwen et al. (1995) avaliaram a diversidade genética entre 96 genótipos de soja, compreendendo cultivares norte americanas, introduções e selvagens utilizando marcadores microssatélites. A diversidade genética entre todos os genótipos foi 0,87 e entre cultivares foi 0,74 , não concordante com resultados prévios obtidos com marcadores RFLP, onde a diversidade foi menor entre cultivares.

Fahima et al. (1998) utilizaram microssatélites para estudar a diversidade genética entre 21 acessos selvagens de *Triticum dicoccoides*, considerado uma fonte valiosa de genes de resistência à ferrugem amarela, dois acessos de *Triticum durum* e um de *Triticum aestivum*. As diferentes espécies do gênero *Triticum* foram agrupadas separadamente e o agrupamento dos acessos do *T. dicoccoides* foi consistente com sua origem ecogeográfica. Segundo os autores, um número relativamente pequeno de microssatélites pode ser utilizado para estimar a diversidade genética entre estes acessos selvagens e identificar genitores potenciais para mapeamento e transferência de genes de resistência à moléstia. Um trabalho semelhante foi desenvolvido por Prasad et al. (2000) com marcadores microssatélites para determinar a identidade genética e estimar a diversidade genética entre 55 genótipos de trigo originados de 29 países representando seis continentes.

Daviewala et al. (2000) utilizaram marcadores microssatélites (ISSR e STMS), RAPD e Coeficiente de Parentesco para avaliar a diversidade genética entre 42 cultivares de arroz indiano. Os três sistemas de marcadores moleculares juntos provaram ser um melhor indicador do relacionamento genético entre os cultivares do que utilizando os marcadores individualmente. A similaridade

genética média encontrada foi de 0,70 com marcadores moleculares e 0,10 com Coeficiente de Parentesco, com baixa correlação entre eles. Os autores sugerem o uso combinado de diferentes marcadores para estudos de diversidade genética no arroz e consideram marcadores moleculares como uma ferramenta para ampliar a base genética da cultura.

Marcadores microssatélites foram utilizados para estimar a variabilidade genética entre 12 genótipos de ervilha (*Pisum sativum*) (Burstin et al., 2001). Estes marcadores foram altamente polimórficos entre os genótipos avaliados e podem contribuir para acessar a variabilidade genética entre espécies de ervilhas cultivadas.

Com o objetivo de determinar a identidade, estimar a diversidade e identificar o relacionamento genético entre 142 acessos de 23 espécies de maçã, Hokanson et al. (2001) utilizaram marcadores microssatélites. Um nível elevado de variação foi detectado entre os acessos com média de 26 alelos por locos e um elevado índice de heterozigotos foi observado, sendo consistente com estudos prévios. Isto pode ter ocorrido devido ao processo de seleção de cultivares, onde a melhoria de características agronômicas desejáveis pode ter sido conferida por altos níveis de heterozigotos. Ainda, a existência de um sistema de auto-incompatibilidade em maçã e a necessidade de cruzamentos compatíveis poderia resultar, também, em elevado nível de heterozigotos. Neste caso, microssatélites não foram eficientes na identificação de variabilidade genética entre os acessos e a maioria dos grupos de informações taxonômicas e ou de origem geográfica.

Sun et al. (2001) utilizaram marcadores microssatélites e RAPD para caracterização de 37 híbridos de milho. Valores de similaridade genética entre os

híbridos foi de 31 a 86 % para dados RAPD e de 12 a 77% para microssatélites. A diversidade genética revelada por microssatélites foi maior do que a obtida para RAPD. A correlação entre os dois marcadores foi moderada ($r = 0,43$) e as análises de agrupamento baseadas em ambos os marcadores agruparam os híbridos de mesma empresa juntos.

Mengoni et al. (2000) avaliaram o relacionamento genético entre populações de alfafa (*Medicago sativa*) através de marcadores RAPD e microssatélites. Ambos os marcadores indicaram elevada diversidade genética dentro das populações estudadas. Marcadores RAPD agruparam as populações em dois grupos segundo a sua origem, enquanto microssatélites separaram quatro ecotipos italianos. Ambos os marcadores foram eficientes para avaliar a variabilidade e o relacionamento genético em alfafa.

2.4.2.2 Utilização de marcadores Microssatélites na cultura do fumo

Ao contrário do que vem ocorrendo com outras espécies, poucos estudos utilizando microssatélites na cultura do fumo são relatados na literatura. *Primers* específicos foram desenvolvidos para amplificar regiões com DNA repetitivo no genoma de cloroplasto de angiospermas dicotiledôneas. Níveis de polimorfismo interespecífico dentro do gênero *Nicotiana* foram elevados, enquanto que a variação intraespecífica em *Nicotiana tabacum* foi limitada. Os resultados mostraram que microssatélites podem ser úteis no estudo da variação do cloroplasto de angiospermas (Weising & Gardner, 1999).

Bryan et al. (1999) desenvolveram marcadores microssatélites a partir de mononucleotídeos repetitivos distribuídos no genoma do cloroplasto de

Nicotiana tabacum e utilizaram para análises de diversidade genética em três níveis taxonômicos da Família Solanaceae, incluindo nove acessos de *Nicotiana*. O agrupamento dos acessos de fumo mostrou elevada similaridade entre a cultivar Samsun, que apresenta o gene N de resistência ao mosaico do fumo, e a espécie *N. glutinosa* doadora do gene. Os autores concluíram que estes marcadores revelaram um nível maior de polimorfismo entre os acessos de fumo testados, quando comparados com os resultados dos acessos de batatas primitivas e selvagens.

2.4.2.3 Marcadores AFLP

A análise de AFLP, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Zabeau, 1993; Vos et al., 1995), é a mais recente tecnologia para a obtenção de grande número de marcadores moleculares distribuídos no genoma. A técnica combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A análise de AFLP envolve quatro etapas: digestão do DNA com duas enzimas de restrição; ligação de adaptadores específicos; amplificação seletiva de fragmentos com *primers* específicos e separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida. Na primeira etapa, o DNA é clivado com duas enzimas de restrição, primeiro com uma de corte raro, que reconhece de seis a oito pares de bases, e depois com uma de corte freqüente, que reconhece quatro pares de bases. Com esta clivagem seqüencial, são geradas três classes de fragmentos que diferem quanto às extremidades, ou seja, fragmentos grandes, pequenos e intermediários. A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos que possuem

terminais complementares às extremidades resultantes da clivagem. Estes adaptadores possuem de 20 a 30 pares de bases, que possuem seqüências diferentes para cada adaptador. Na terceira etapa, uma fração de segmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando *primers* com seqüências específicas complementares aos adaptadores e algumas bases arbitrárias na extremidade 3', responsáveis pela ação seletiva. Esta ação seletiva é realizada em duas etapas: pré-seletiva, onde os *primers* utilizados contêm apenas um nucleotídeo arbitrário adicional e, seletiva, onde os *primers* utilizados possuem outros dois nucleotídeos arbitrários adicionais. A quarta e última etapa consiste da eletroforese de fragmentos amplificados e visualização em gel de poliacrilamida, onde somente os fragmentos de tamanho intermediário são visualizados claramente.

As principais vantagens do uso desta tecnologia são o grande número de marcadores obtidos por gel analisado e o grande poder de detecção de variabilidade genética. Ainda, a maior robustez da técnica devido à utilização de *primers* mais longos que aumentam a especificidade da amplificação. Por outro lado, marcadores AFLP apresentam algumas limitações como o baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que apresenta caráter dominante, não permitindo a discriminação entre genótipos heterozigotos e homozigotos. Além disso, é uma técnica mais laboriosa, envolvendo maior número de reagentes e equipamentos e necessita de DNA com maior pureza, para garantir completa digestão pelas enzimas de restrição.

2.4.2.3.1 Utilização de marcadores AFLP nas culturas agrícolas

Marcadores AFLP são muito eficientes na amostragem ampla e simultânea de um genoma e, por isso, muitos estudos de diversidade genética têm sido realizados com esta técnica em diferentes espécies. Barret & Kidwell (1998) avaliaram a diversidade genética entre 54 cultivares americanos de trigo de primavera e de inverno, através de marcadores AFLP. A estimativa de diversidade genética entre os diferentes tipos de trigo foi alta, intermediária entre os trigos de inverno e baixa entre os de primavera. A análise de agrupamento separou os cultivares hierarquicamente de acordo com classes de mercado e hábito de crescimento. Os marcadores AFLP foram eficientes para detectar diversidade genética entre os cultivares de trigo.

Schut et al. (1997) avaliaram o relacionamento entre a similaridade genética baseada em marcadores AFLP, Coeficiente de Parentesco, baseado em dados de genealogia e distância generalizada baseada em caracteres morfológicos para 31 linhagens de cevada (*Hordeum vulgare*). Houve moderada a baixa correlação entre similaridade genotípica e Coeficiente de Parentesco dentro das linhagens de primavera européias. Ainda, não houve correlação significativa entre distância morfológica e marcadores AFLP, e entre distância morfológica e Coeficiente de Parentesco. Diferentes ecotipos de cevada foram incluídos no estudo, levando a uma maior correlação entre marcadores AFLP e Coeficiente de Parentesco. Além disso, os marcadores AFLP identificaram individualmente todas as linhagens avaliadas. Os autores sugerem o uso combinado destes diferentes marcadores.

Ajmone Marsan et al. (1998) avaliaram a diversidade genética e o relacionamento entre linhagens híbridas de milho através de marcadores AFLP e RFLP. Variação considerável foi detectada com ambos os marcadores. Além

disso, marcadores AFLP foram mais eficientes na detecção de polimorfismo do que marcadores RFLP, devido ao grande número de locus em uma única reação de PCR. As distâncias genéticas estimadas com dados de ambos os marcadores foram maiores entre híbridos de grupos heteróticos diferentes do que entre híbridos do mesmo grupo heterótico. O agrupamento baseado nas distâncias genéticas entre as linhagens foi concordante com informações de genealogia. Segundo os autores, as correlações entre marcadores AFLP e estimativas de capacidade específica de combinação podem ter utilidade prática na predição da performance híbrida.

Marcadores AFLP foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre 57 acessos de arroz (*Oryza sativa*) (Zhu et al., 1998). As análises de agrupamento e componentes principais indicaram três grupos principais, os quais corresponderam aos agrupamentos feitos através de isoenzimas. O grupo Indica mostrou maior diversidade do que o grupo Japonica. O estudo demonstrou que marcadores AFLP são eficientes para análises de germoplasma de arroz, sendo consistente com resultados encontrados previamente por Mackill et al. (1996).

Marcadores AFLP foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre 31 variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e também populações selvagens brasileiras (Elias et al., 2000). Houve polimorfismo entre 21 variedades. Não houve correlação entre dados moleculares e características agronômicas. Todos os acessos selvagens de mandioca foram agrupados juntos e separadamente das variedades cultivadas. Estes resultados são consistentes com a hipótese de um evento de domesticação limitado a uma área restrita, seguido de uma rápida difusão de fenótipos cultivados e evolução convergente.

Lombard et al. (2000) utilizaram marcadores AFLP com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre cultivares de *Brassica napus*. Apenas duas combinações de *primers* foram suficientes para identificar individualmente todas as cultivares. O agrupamento dos genótipos claramente delimitou três fatores significantes: tipo de cultivar (inverno ou primavera), país de origem e empresa de melhoramento. Marcadores AFLP foram eficientes para identificação de cultivares da espécie.

Outros trabalhos avaliando a diversidade genética através de marcadores AFLP têm sido realizados em diferentes espécies como girassol (Quagliaro et al., 2001); feijão (Beebe et al., 2001); melão (Garcia-Mas et al., 2000), *Cynodon spp.* (Zhang et al., 1999) ; oliveira (Angiolillo et al., 1999), entre outros.

2.4.2.3.2 Utilização de marcadores AFLP na cultura do fumo

Poucos estudos foram relatados na literatura utilizando marcadores AFLP na cultura do fumo. A técnica foi utilizada para estudar a resistência à murcha bacteriana (*Rastonia solanacearum*), uma das mais destrutivas moléstias do fumo no mundo (Nishi et al., 2001). Por apresentar herança poligênica, o progresso no melhoramento para resistência tem sido limitado. Setenta e dois marcadores AFLP foram identificados usando 3072 combinações de primers entre W6, um cultivar japonês resistente e duas variedades japonesas suscetíveis. Um mapa de ligação foi construído e indicou 10 grupos de ligação. Um QTL maior foi detectado explicando 34% da variação dentro da população F1 duplo-haplóide avaliada. Esses marcadores AFLP podem ser úteis no melhoramento para resistência a esta moléstia em fumo.

Com o objetivo de investigar a diversidade genética de variedades de fumo, Rossi et al. (1999) utilizaram marcadores RAPD e AFLP. O DNA foi extraído de folha curada e verde de 19 variedades de fumo de diferentes grupos. No estudo foram utilizados 220 *primers* RAPD que geraram apenas 25 a 30 bandas polimórficas entre as variedades. Os resultados obtidos mostraram que a técnica RAPD não foi eficiente na caracterização das variedades devido ao baixo nível de polimorfismo detectado e dificuldade para reproduzir os padrões. A técnica AFLP mostrou ter alto poder de resolução, onde seis combinações de *primers* testadas sobre quatro variedades geraram 33 marcadores polimórficos. Ainda, estes marcadores mostraram boa reprodutibilidade e foram eficientes para identificação de cultivares utilizando DNA de folha curada e verde. Segundo os autores, o polimorfismo de AFLP encontrado entre variedades de fumo foi relativamente baixo quando comparado com outras espécies, confirmando que a variabilidade genética no fumo é baixa. Ainda, devido à capacidade da técnica AFLP gerar grande número de marcadores polimórficos em pequeno período de tempo, ela pode ser utilizada para construção de mapas de ligação genética e abrir novos caminhos para melhor entendimento da genética da espécie.

Ren & Timko (2001) utilizaram marcadores AFLP para determinar a variabilidade genética dentro de *Nicotiana tabacum* e entre espécies do gênero *Nicotiana*. Para o estudo foram avaliadas 46 linhagens de fumo (*Nicotiana tabacum*) e sete espécies selvagens de *Nicotiana* utilizando oito combinações de *primers*. O polimorfismo entre cultivares de fumo foi baixo, evidenciado pelo nível de similaridade nos fragmentos AFLP dos cultivares representativos do mundo todo. Seis maiores grupos foram identificados entre cultivares, correspondendo a sua origem geográfica e características de qualidade. Ainda, elevado polimorfismo

foi detectado entre espécies selvagens. Fragmentos presentes na espécie *N. tabacum* foram encontradas em pelo menos um dos três genitores selvagens propostos para a espécie cultivada. Isto reforça a hipótese de que estas espécies contribuíram para a origem de *N. tabacum*.

2.5 Utilização dos grupos de similaridade genética

Após a caracterização do germoplasma, através de diferentes metodologias como marcadores morfológicos, moleculares, Coeficiente de Parentesco e outros, os genótipos podem ser agrupados em grupos de similaridade genética. A classificação de genótipos em grupos de similaridade genética permite distinguir cultivares de acordo com sua origem, caracteres adaptativos, época de lançamento, entre outros, e tem grande importância no planejamento de programas de melhoramento. Estes grupos de similaridade podem ser utilizados para escolha de genitores que serão incluídos nos cruzamentos, baseando-se em informações de relacionamento genético estimado de diferentes formas (Barbosa-Neto & Bered, 1998). A escolha adequada de genitores e o cruzamento de grupos geneticamente distintos podem contribuir para a ampliação da variância genética em populações segregantes, e desta forma, aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

CAPÍTULO I

Caracterização fenotípica de genótipos de fumo utilizados em programas de melhoramento no Sul do Brasil

1.1 INTRODUÇÃO

O fumo (*Nicotiana tabacum* L.) apresenta grande importância social e econômica em todo o mundo, sendo cultivado em mais de cem países (ABIFUMO, 1999). Devido à sua importância econômica, avanços foram obtidos nos estudos genéticos e no melhoramento desta cultura nos últimos anos. Foram desenvolvidos cultivares com alto rendimento, qualidade e resistência a diversas moléstias (Leg & Smeeton, 1999). No entanto, o progresso genético para rendimento e qualidade foliar em fumo tem sido difícil de estimar devido à dificuldade de separar melhorias genéticas daquelas devidas a tecnologia de produção (Wernsman & Rufty, 1987). Bowmann et al. (1984) estimaram em 49,5 kg/ha o aumento médio anual no rendimento para o fumo tipo Virgínia na Carolina do Norte no período entre 1954 e 1981, dos quais 68% foram atribuídos à tecnologia e 32% ao ganho genético.

No desenvolvimento de populações melhoradas de fumo, esforços têm sido concentrados na obtenção de genótipos com caracteres agrônômicos e de qualidade foliar desejáveis, o que pode estar levando a uma restrição na base

genética do germoplasma. Apesar disso, segundo Wernsman & Rufty (1987), a variabilidade encontrada dentro das populações resultantes de cruzamentos entre cultivares modernos de fumo ainda é elevada.

A diversidade genética no fumo tem sido avaliada através de caracteres fenotípicos. Cruzamentos interespecíficos e retrocruzamentos com espécies do gênero *Nicotiana* produziram 89 linhas de adição que foram classificadas em 12 grupos através do hábito de crescimento, altura da planta, forma, tamanho e coloração das folhas e forma e tamanho das flores (Suen et al., 1997). Wang et al. (2001) utilizaram caracteres morfológicos qualitativos para selecionar uma amostra representativa da coleção de germoplasma da China, visando posterior avaliação genética. Mais de 400 acessos foram selecionados e a avaliação dos caracteres mostrou que estes são representativos do total da coleção para o estudo de diversidade genética. Três componentes principais foram obtidos como referência para o melhoramento do fumo. Torrecilla (2001) avaliou a coleção de germoplasma de Cuba, composta de 758 acessos de *Nicotiana tabacum* e 19 espécies selvagens do gênero *Nicotiana*, através de 40 caracteres morfológicos qualitativos e quantitativos. A análise multivariada permitiu o agrupamento dos acessos em grupos de acordo com o tipo de fumo. Elevada variabilidade genética foi observada entre acessos cultivados e selvagens, inclusive quanto à reação a moléstias.

No Sul do Brasil, os genótipos que serviram de base para o melhoramento do fumo foram, na sua maioria, introduções norte americanas de *Nicotiana tabacum*. Apesar de acreditar-se que a base genética do fumo utilizado em programas de melhoramento no Sul do Brasil é estreita, nenhum trabalho foi realizado até o momento para testar esta hipótese.

Diversas características fenotípicas têm sido utilizadas para caracterização e registro de cultivares de fumo em diferentes países, com base na descrição recomendada pela UPOV (*Union pour la Protection des Obtentions Variétales*) (SINDIFUMO – Subcomissão de Sementes). Caracteres como a forma e tamanho da folha, número de folhas, altura da planta e comprimento de internódios são importantes porque influenciam o manejo, o rendimento e a composição química das folhas. Características desejáveis incluem a insensibilidade ao florescimento precoce, que reduz o número de folhas por planta; resistência ao acamamento; amadurecimento uniforme das folhas; ausência de excessiva sensibilidade à quebra da folha e inclinação. Ainda, cultivares do tipo Burlei não devem ter estatura muito elevada e devem possuir diâmetro moderado do caule para evitar rachaduras por ocasião da colheita (Wernsman & Rufty, 1987).

Com a lei de proteção de cultivares, o registro de novos cultivares através de descritores mínimos passou a ser requerido. Trinta e sete características agronômicas e morfológicas fazem parte da lista de descritores mínimos, propostos inicialmente pelo SINDIFUMO, para registrar um novo cultivar de fumo. A utilidade destes descritores para este fim, contudo, não foi determinada.

Os objetivos deste trabalho foram o de caracterizar genótipos de fumo de diferentes origens a partir de características fenotípicas; avaliar o uso destas quanto à capacidade de distinguir genótipos para fins de registro de cultivares; e estimar o grau de similaridade genética no germoplasma de fumo avaliado através do agrupamento dos genótipos de acordo com os caracteres estudados.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados trinta e dois genótipos de fumo (Tabela 1.1), incluindo oito cultivares do Programa de Melhoramento Genético da DIMON do Brasil Tabacos Ltda. e outros vinte e quatro cultivares de diferentes procedências e instituições. Destes, a maioria são introduções que formaram a base dos programas de melhoramento no Sul do Brasil e são cultivados amplamente no País. Do total de genótipos avaliados, dezesseis pertencem ao grupo Estufa tipo Virgínia e dezesseis pertencem ao grupo Galpão tipo Burlei.

O experimento foi conduzido na Estação Experimental da DIMON, no município de Vera Cruz, que está localizado na Depressão Central do Rio Grande do Sul (Latitude S29°42,53'; Longitude W52°30,20'; Altitude 72 metros), no ano agrícola de 2000. O transplante foi realizado em quatro blocos casualizados, sendo três blocos utilizados para caracterização agrônômica e um para caracterização morfológica. Cada parcela foi constituída de duas linhas de 12 plantas e cada linha tinha 6 metros de comprimento com espaçamento de 1,20 metros entre linhas e 0,50 metro entre plantas.

Caracterização fenotípica

Trinta e seis caracteres foram analisados conforme definido pelo SINDIFUMO (Subcomissão de Sementes), com base na descrição recomendada pela UPOV e nas Legislações Americana e Italiana.

Foram avaliados quatro caracteres agrônômicos conforme segue:

- *rendimento*: rendimento total de folhas de todas as posições na planta;

- *índice qualitativo geral (IQG)*: média ponderada do rendimento em kg de cada classe qualitativa, multiplicada pelo seu índice de qualidade;
- *teor de nicotina*: média do teor de nicotina das folhas na planta;
- *percentual de talo*: média de todas as folhas da planta.

Para a avaliação dos caracteres agronômicos, os genótipos foram agrupados conforme a classificação quanto ao tipo de fumo e utilizou-se blocos com três repetições. Os resultados foram avaliados através do programa estatístico SAS (SAS Institute, 2000), considerando-se bloco e genótipo como fontes de variação. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%. Para os caracteres teor de nicotina e percentual de talo, os genótipos foram agrupados em classes levando em consideração a média dos padrões NC-95 e NC-2326 para o tipo Virgínia, e KY-14 e BYVa-509 para o tipo Burlei, segundo proposto pelo SINDIFUMO.

Foram avaliados 32 caracteres morfológicos conforme descrito abaixo:

- *forma das plantas*: planta inteira, início do florescimento;
- *estatura de planta*: nível do solo até a base da inflorescência;
- *dias até o florescimento*: número de dias do transplante ao florescimento;
- *diâmetro do caule*: zona mediana do caule, início do florescimento;
- *índice cilíndrico*: cociente entre o diâmetro médio do caule e o diâmetro do caule na região de inserção da última folha;
- *comprimento de internódios*: entre a 10^a e a 15^a folha;
- *coloração do caule*: início do florescimento;
- *presença de brotos basais*: base do caule, início do florescimento;
- *número de folhas por planta*: nível do solo até a base da inflorescência;
- *largura da 3^a folha*: início do florescimento;

- *comprimento da 3ª folha*: início do florescimento;
- *forma das folhas basais*: cociente da maior largura pelo maior comprimento na 3ª folha;
- *largura da 10ª folha*: início do florescimento;
- *comprimento da 10ª folha*: início do florescimento;
- *forma das folhas medianas centrais*: início do florescimento;
- *ângulo de inserção da 10ª folha no caule*: 10 cm de raio do ponto de inserção da 10ª folha;
- *coloração das folhas*: 10ª folha, início do florescimento;
- *curvatura da ponta da lâmina foliar*: 10ª folha, início do florescimento;
- *superfície da lâmina foliar*: 10ª folha, início do florescimento;
- *perfil transversal da 10ª folha*: início do florescimento;
- *disposição das nervuras secundárias*: ângulo das nervuras secundárias em relação à nervura principal da 10ª folha, início do florescimento;
- *margem da lâmina foliar*: 10ª folha, início do florescimento;
- *ponta da lâmina foliar*: 10ª folha, início do florescimento;
- *formato da aurícula*: 10ª folha, início do florescimento;
- *forma da inflorescência*: pleno florescimento, 20 a 30 frutos formados;
- *tipo de flor*: presença ou ausência de anteras;
- *tamanho do cálice*: comprimento do cálice, início do florescimento;
- *tamanho da corola*: flor aberta, antes da deiscência do pólen;
- *cor da corola*: início do florescimento;
- *formato do limbo da corola*: forma da seção vista do alto;
- *tipo de deiscência do fruto*: na maturação completa;
- *formato da cápsula*: média de 20 a 30 frutos formados.

Para a caracterização morfológica, considerou-se todos os genótipos conjuntamente, independente do tipo de fumo. Foram avaliadas cinco plantas por parcela, sendo os genótipos acompanhados durante todo o ciclo de desenvolvimento. A maioria das avaliações foi realizada no início do florescimento, ou seja, quando pelo menos 20% das plantas de cada parcela apresentaram pelo menos cinco flores abertas. Os caracteres medidos de forma quantitativa foram analisados individualmente e as médias foram utilizadas para análise estatística (SAS), sendo submetidas ao teste de Duncan. Ainda, os caracteres quantitativos e qualitativos foram agrupados em classes pré-estabelecidas (SINDIFUMO). Os caracteres quantitativos que não apresentavam classes definidas, foram agrupados em classes de até um desvio padrão ao redor da média de cada caráter (Tabela 1.2).

Avaliação da similaridade genética

Com as médias de 13 caracteres quantitativos, foi gerada uma matriz de correlação para análise de componentes principais, utilizando o procedimento PRINCOMP do aplicativo SAS.

Com o objetivo de construir uma matriz de similaridade entre os genótipos, os 32 caracteres morfológicos foram classificados de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de cada classe, sendo que cada uma constituiu um marcador morfológico. Os dados desta matriz foram utilizados para a estimativa do coeficiente de similaridade Simple Matching, através do módulo SIMQUAL do programa computacional NTSYS versão 2.1 (Rohlf, 2000). Com base nesta matriz de similaridade, os genótipos foram agrupados utilizando o modelo hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) e foi

gerado um dendograma a partir dos resultados obtidos, através do módulo SAHN, ambos utilizando o pacote estatístico NTSYS.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracteres fenotípicos

Para os caracteres agronômicos houve diferença significativa entre os genótipos tipo Virgínia e tipo Burlei avaliados (Tabela 1.3). O teste de Duncan separou os genótipos em diferentes grupos para os caracteres rendimento de folhas, IQG, teor de nicotina e percentual de talo. De maneira geral, os cultivares mais modernos, como o K-326 LF, do tipo Virgínia, e TN-90, do tipo Burlei, foram os genótipos que apresentaram maior rendimento em folhas. Por outro lado, LINC-95 e NC-2326, do tipo Virgínia, e LABY-21, do tipo Burlei, foram os menos produtivos.

Para IQG, a amplitude de variação foi de 42,36 a 60,94% para fumos do tipo Virgínia e de 23,91 a 77,65% para tipo Burlei. A menor variação para esta característica nos genótipos Virgínia pode ser explicada pela forte pressão de seleção dos programas de melhoramento para qualidade neste tipo de fumo. Em geral, genótipos com maior rendimento tiveram um IQG elevado. Cabe salientar o caso de BY-37 que, apesar de seu rendimento inferior em relação ao tipo Burlei, apresentou o melhor IQG do grupo. De fato, este material se caracteriza por produzir fumos de excelente qualidade e tem sido muito utilizado no desenvolvimento de genótipos do tipo Burlei.

Assim como o IQG, o teor de nicotina é um dos principais caracteres qualitativos, visto que o mercado atual procura fumos de médio a baixo teor deste

alcalóide. Para este caráter, os genótipos foram agrupados em quatro classes para ambos os tipos de fumo. Entre os cultivares do tipo Virgínia, C-176 teve o maior e GLA-3 o menor teor de nicotina. Ainda, para o tipo Burlei os cultivares BY-21 e LABY-21 apresentaram o maior e menor teor deste alcalóide, respectivamente. Isto mostra que existe variação significativa para teor de nicotina, o que indica que o germoplasma estudado pode ser melhorado para aumento ou redução do teor deste alcalóide na folha.

Para percentual de talo, os genótipos foram agrupados em duas classes. Os cultivares K-326 LF, NC-55 e RG-08, do tipo Virgínia, e BYVa-509, do tipo Burlei, apresentaram maior percentual de talo. Por outro lado, NC-2326, do tipo Virgínia, e CSC-223, do tipo Burlei, foram os que apresentaram menor percentual. Esta característica é importante para o melhoramento, uma vez que o mercado procura fumos com menor percentual de talo.

A análise destes resultados mostrou que para os caracteres acima descritos existe variabilidade genética a ser explorada pelos programas de melhoramento de fumo.

Trinta e dois caracteres morfológicos foram avaliados, tendo nove apresentado-se monomórficos e 23 polimórficos entre os genótipos estudados (Tabelas 1.4 a 1.7). Os caracteres de forma das plantas, estatura, ciclo e caule são apresentados na Tabela 1.4. As características forma das plantas e presença de brotos basais apresentaram-se monomórficos entre os genótipos estudados e a coloração do caule permitiu distinguir apenas os tipos Virgínia e Burlei. Essas características, portanto, são pouco informativas como descritores mínimos para o germoplasma de fumo estudado. Para estatura, a amplitude de variação foi de 104,5 a 150,9 cm para fumos do tipo Virgínia e de 111,4 a 191,5 cm para o tipo

Burlei. O tipo moderno de planta não deve apresentar estatura muito elevada, para evitar acamamento. Além disso, os processos de colheita e cura podem ser dificultados para os genótipos do tipo Burlei com elevada estatura. Da mesma forma, houve grande amplitude de variação para ciclo, com os genótipos de ambos os tipos de fumo variando de 53 a 85 dias até o florescimento. Em geral, os genótipos de alta e baixa estatura apresentaram maior e menor dias até o florescimento, respectivamente, com alta correlação ($r = 0,75$). O diâmetro médio do caule é uma característica particularmente importante para genótipos de fumo do tipo Burlei, que devem apresentar diâmetro moderado para evitar rachaduras no caule por ocasião da colheita. No entanto, apenas quatro (25%) dos cultivares de Burlei estudados apresentaram esta classe, indicando que esta característica deve receber mais esforços pelos melhoristas de fumo. Por outro lado, a maioria dos genótipos apresentou um valor médio de índice cilíndrico, o que é desejável para manter um equilíbrio na planta. Em geral, os genótipos mais antigos, como NC-2326 e HINC-95, do tipo Virgínia, e MBN-2 e KY-907, do tipo Burlei, apresentaram maior comprimento de internódios em relação aos mais modernos, mostrando ter havido seleção pelos melhoristas para este caráter.

Os caracteres de folha foram polimórficos, com exceção da margem e ponta da lâmina foliar (Tabelas 1.5 e 1.6). Para número de folhas por planta, a variação foi em torno de 20 folhas para ambos os tipos de fumo, variando de mediano a muito numeroso (Tabela 1.5). Cabe salientar, ainda, que os genótipos com maior número de folhas por planta foram os de maior estatura, com alta correlação ($r = 0,80$). Além disso, houve alta correlação entre número de folhas por planta e dias até o florescimento ($r = 0,79$), conforme esperado. De fato, genótipos insensíveis ao fotoperíodo geralmente apresentam maior estatura e

número de folhas por planta. Os genótipos do tipo Burlei apresentaram maior amplitude de variação para a largura da 3ª folha, que foi de 24,28 a 35,30 cm. Por outro lado, ambos os tipos de fumo apresentaram grande amplitude de variação para comprimento da 3ª folha. Através do cociente entre a maior largura e comprimento da 3ª folha foi determinada a forma das folhas basais sub-ovais, com exceção do K-326 LF que apresentou forma oval. De fato, esse cultivar se diferencia dos demais cultivares do tipo Virgínia por apresentar a 3ª folha estreita e comprida. Para largura e comprimento da décima folha, os genótipos foram agrupados em três e duas classes, respectivamente, com elevada variação para estas características. Ainda, os genótipos apresentaram forma das folhas medianas centrais elíptica lanceolada, com exceção do K-326 LF que foi lanceolada, o que confirma que este apresenta a menor largura de folha entre os genótipos estudados, o que constitui uma característica indesejável para o desenvolvimento de novos cultivares.

Para ângulo de inserção da 10ª folha, V-991, do tipo Virgínia, e TN-90, do tipo Burlei, foram os genótipos que apresentaram menor ângulo (Tabela 1.6). Por outro lado, K-326 LF, do tipo Virgínia, e LIBY-21, do tipo Burlei, foram os de maior ângulo. Os caracteres coloração das folhas e disposição das nervuras secundárias agruparam em classes distintas os genótipos tipo Virgínia e Burlei, com exceção do KY-14, o que confirma sua semelhança ao tipo Virgínia para estes caracteres. Além disso, os genótipos Virgínia e Burlei foram agrupados em diferentes classes para os caracteres curvatura da ponta da lâmina foliar, perfil transversal da décima folha e formato da aurícula. Quanto à superfície da lâmina foliar, os genótipos tipo Virgínia apresentaram-se ligeiramente enrugados, com exceção do NC-95 e HINC-95, de superfície enrugada. Por outro lado, os

genótipos do tipo Burlei apresentaram superfície lisa, com exceção do HIBY-21. Todos os genótipos apresentaram margem da lâmina foliar lisa e ponta da lâmina foliar medianamente afilada, portanto, estes caracteres são pouco informativos como descritores mínimos para o germoplasma de fumo estudado.

Os caracteres morfológicos de inflorescência e fruto analisados foram, na sua maioria, monomórficos entre os genótipos avaliados, com exceção da forma da inflorescência e tipo de flor, os quais agruparam os genótipos em duas classes distintas (Tabela 1.7). Características como tamanho do cálice e da corola, cor e formato do limbo da corola, tipo de deiscência do fruto e formato da cápsula, são de avaliação morosa, além de não serem informativas.

Similaridade genética e agrupamento dos genótipos

A análise de componentes principais, baseada em dados de 13 caracteres quantitativos, indicou 3 componentes principais explicando 75% da variação total entre os genótipos avaliados. O primeiro componente explicou 47% da variação e o segundo 17%. Juntos estes componentes explicaram 64% da variação total. A diversidade genética entre os genótipos foi avaliada através da dispersão dos 32 genótipos em relação aos dois primeiros componentes principais (Figura 1.1). Os resultados não mostraram a separação clara dos genótipos conforme o tipo de fumo. De fato, nenhum dos 13 caracteres quantitativos analisados diferencia os genótipos de fumo Virgínia dos de Burlei. Por outro lado, os resultados indicaram que a similaridade genética foi maior entre os genótipos tipo Virgínia. Observa-se que em relação aos caracteres avaliados, os genótipos K-326 LF e BY-64 apresentaram a maior diversidade em relação ao seu grupo. Enquanto que K-326 LF destaca-se para rendimento e qualidade de folhas,

apresentando % de nicotina e talo intermediários, BY-64 apresenta boa qualidade de folhas e baixo talo (Tabela 1.3). Estes resultados podem ser úteis para identificar cruzamentos promissores entre os genótipos estudados, visando maximizar a variabilidade genética disponível, dentro de um grupo elite de cruzamentos.

A similaridade genética (SG) entre todos os possíveis pares de genótipos, obtida através do coeficiente Simple Matching, variou de 0,42 a 1,0, com média de 0,68 (Tabela 1.8). C-176 e GLA-3 não puderam ser diferenciados com base nos 32 caracteres morfológicos utilizados nesta análise, ficando a sua diferenciação dependente de caracteres quantitativos, como % de nicotina e talo, que são influenciados pelo ambiente de cultivo. Considerando os genótipos dentro de seus respectivos tipos, a SG média foi 0,83 para Virgínia e 0,79 para Burlei, não diferindo estatisticamente pelo teste t a 5%. A maior SG foi detectada entre os genótipos C-176 e GLA-3, do tipo Virgínia, e entre BY-37 e B-972, para o tipo Burlei, sendo que para os dois últimos, existe parentesco. Por outro lado, a menor SG foi entre os genótipos K-326 LF e V-961, do tipo Virgínia, e entre KY-14 e LIBY-21, do tipo Burlei.

Uma SG média de 0,68 entre todos os genótipos evidencia que existe variabilidade para os caracteres agrônômicos de maior interesse econômico. Assim como no fumo, os programas de melhoramento das principais espécies restringem o uso de genitores àqueles com características vantajosas. Apesar disso, o ganho genético com a utilização de cruzamentos entre genótipos elite parece ser elevado e são suficientes para encorajar o contínuo melhoramento dentro de um grupo de materiais com base genética estreita. Segundo Rasmusson & Phillips (1997), o genoma de plantas é dinâmico e nova variação

genotípica e fenotípica devido a mudanças genéticas resulta em alelos com efeitos modificados e de efeitos epistáticos.

O agrupamento dos genótipos, baseado no coeficiente de similaridade, revelou a formação de dois grupos principais correspondendo ao tipo de fumo, e nove subgrupos (Figura 1.2). Para formação dos subgrupos, utilizou-se a SG média para o tipo Virgínia (0,83) (Tabela 1.8), que agrupou os genótipos de acordo com caracteres morfológicos importantes para o melhoramento.

Os agrupamentos Virgínia e Burlei foram constituídos de três e seis subgrupos respectivamente. O subgrupo 1 se caracterizou por apresentar genótipos com a 3ª folha estreita e o subgrupo 2 com largura mediana. O cultivar K-326 LF agrupou isoladamente no subgrupo 3, devido a maior estatura e número de folhas, menor largura da 10ª folha e forma das folhas basais e medianas centrais distintas dos demais cultivares. Esse genótipo também divergiu dos demais na análise de componentes principais feita com base em 13 caracteres quantitativos (Figura 1.1). O subgrupo 4 foi constituído apenas pelo cultivar KY-14 que se diferenciou dos demais do tipo burlei pela coloração verde normal das folhas e disposição intermediária das nervuras secundárias. O subgrupo 5 foi constituído de genótipos com a 10ª folha larga e o subgrupo 6 por genótipos com número de folhas bastante numeroso. Apesar de se destacar na análise de componentes principais com base em características quantitativas, o genótipo BY-64 foi incluído neste subgrupo junto com KY-907 e B-991. O cultivar CSC-223 agrupou isoladamente no subgrupo 7, com curvatura da ponta da lâmina foliar côncava. O subgrupo 8 caracterizou-se por apresentar genótipos com ângulo aberto de inserção da 10ª folha e 3ª folha estreita. O cultivar HIBY-21 agrupou

isoladamente no subgrupo 9, se diferenciando dos demais genótipos pela superfície ligeiramente enrugada da lâmina foliar.

Aplicação no melhoramento genético do fumo

O conhecimento do germoplasma disponível e a capacidade de identificar plantas que possuem genes de interesse em uma progênie segregante são os maiores desafios do melhorista (Weeden et al., 1994). Por isso, a seleção de genitores e a caracterização da variabilidade genética são decisivas para o incremento de eficiência em programas de melhoramento (Barbosa Neto, 1995). O grau de relacionamento genético entre genótipos pode ser estimado através de características fenotípicas. No entanto, estas apresentam algumas limitações de uso para a caracterização de germoplasma, como os efeitos do ambiente, a epistasia e a pleiotropia, que podem dificultar a avaliação. Apesar disto, este tipo de marcador tem sido utilizado para caracterizar coleções de germoplasma de diferentes espécies de importância agrícola como trigo (Bered, 1999; Souza & Sorrells, 1991; Van Beuningen & Busch, 1997), cevada (Schut et al., 1997), soja (Choi et al., 2000) entre outras.

Neste estudo de caracterização fenotípica do germoplasma de fumo ficaram evidenciadas limitações que podem dificultar o uso desses descritores para proteção de cultivares de fumo. Uma das limitações foi a inexistência de um critério definido para o agrupamento dos genótipos em classes estabelecidas para as características diâmetro médio do caule, índice cilíndrico, comprimento dos internódios, largura e comprimento da 3ª folha e ângulo de inserção da 10ª folha. Neste trabalho foi utilizado a média mais ou menos um desvio padrão para definição dessas classes (Tabela 1.2). Ainda, para os descritores forma das folhas

medianas centrais e ponta da lâmina foliar, algumas plantas apresentaram folhas de diferentes classes para o mesmo genótipo, sendo necessário estabelecer o padrão do genótipo pela classe de maior frequência após a avaliação de um maior número de plantas. Além disso, o grande número de descritores utilizados para caracterização faz com que este tipo de estudo seja demorado e envolva recursos humanos e financeiros desnecessários, no caso da avaliação de características como forma das plantas, presença de brotos basais, margem e ponta da lâmina foliar, tamanho do cálice e da corola, cor e formato do limbo da corola, tipo de deiscência do fruto e formato da cápsula, que não diferenciaram os genótipos deste estudo, não tendo utilidade para fins de registro desses cultivares.

Apesar disto, a estimativa de similaridade genética entre genótipos, obtida através da caracterização morfológica, é uma informação valiosa para o programa de melhoramento de fumo. A utilização desta informação deve levar em consideração os objetivos dos cruzamentos. Quando o objetivo for o desenvolvimento de germoplasma, os genitores com baixa a moderada similaridade genética e que apresentam características de interesse, podem ser combinados, visando o desenvolvimento de genitores potenciais para o programa. Por exemplo, para o fumo do tipo Virgínia, o cruzamento entre os genótipos NC-95 e K-326 LF, que apresentam moderada similaridade, teria como objetivo combinar características de qualidade, baixo percentual de talo e tolerância à murcha bacteriana de NC-95, com alto rendimento, menor comprimento de internódios e maior número de folhas de K-326 LF. Para o tipo Burlei, o cruzamento entre os genótipos BY-64 e LIBY-21, com moderada similaridade, teria como objetivo combinar boa qualidade, maior largura e número de folhas e tolerância à murcha bacteriana de BY-64 com o baixo teor de nicotina de LIBY-21.

De maneira geral, espera-se maior segregação nas progênies obtidas a partir de genitores com menor similaridade, podendo-se maximizar a seleção de plantas com características de interesse.

Por sua vez, quando o objetivo for o desenvolvimento de variedades de fumo, a escolha de genitores que agregam características exigidas pelo mercado, agronomicamente superiores e adaptados à região de cultivo, aumenta a probabilidade de se obter linhagens superiores. Neste caso, a seleção de genitores com base no grau de similaridade deve ser sempre ponderada pela avaliação do comportamento em si dos genótipos envolvidos, uma vez que existe tendência dos genótipos muito divergentes apresentarem limitações em características agronômicas e de mercado.

1.4 CONCLUSÕES

É possível caracterizar individualmente os 32 genótipos de fumo utilizados nos programas de melhoramento do Sul do Brasil e incluídos neste estudo através de 23 características fenotípicas.

As características fenotípicas forma das plantas, presença de brotos basais, margem e ponta da lâmina foliar, tamanho do cálice e da corola, cor e formato do limbo da corola, tipo de deiscência do fruto e formato da cápsula não diferenciam os genótipos deste estudo, não tendo utilidade para fins de registro desses cultivares.

Existe variabilidade para as características fenotípicas de maior importância econômica, tais como rendimento; qualidade de folhas; teor de

nicotina e percentual de talo no germoplasma de fumo utilizado nos programas de melhoramento do Sul do Brasil.

Os genótipos K-326 LF, do tipo Virgínia, e BY-64, do tipo Burlei, divergem dos demais e destacam-se para características fenotípicas de importância econômica, sendo de grande potencial como genitores em cruzamentos entre materiais elite para desenvolvimento de cultivares de fumo para o Sul do Brasil.

TABELA 1.1. Genótipos de fumo utilizados no estudo e suas respectivas origens. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

Código	Genótipo	Grupo	Tipo	Origem
1	K-326	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
2	K-326 LF	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
3	K-149b	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
4	RG-08	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
5	C-176	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
6	DM-465	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
7	NC-55	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
8	NC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
9	NC-2326	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
10	GLA-3	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
11	LINC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
12	HINC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
13	MS V17	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
14	V-961	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
15	V-991	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
16	V-201	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
17	TN-86	Galpão	Burlei	Estados Unidos
18	TN-90	Galpão	Burlei	Estados Unidos
19	KY-907	Galpão	Burlei	Estados Unidos
20	KY-14	Galpão	Burlei	Estados Unidos
21	MBN-2	Galpão	Burlei	Japão
22	BY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
23	BY-37	Galpão	Burlei	Estados Unidos
24	BY-64	Galpão	Burlei	Estados Unidos
25	BY Va-509	Galpão	Burlei	Estados Unidos
26	CSC-223	Galpão	Burlei	Souza Cruz – Brasil
27	HIBY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
28	LIBY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
29	LABY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
30	B-972	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
31	B-973	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
32	B-991	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil

TABELA 1.2. Média e desvio padrão de caracteres morfológicos utilizados para formação das classes. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

Caracteres	Média e desvio padrão	Classes*
Diâmetro médio do caule	2,56 ± 0,19	Grande, médio, pequeno
Índice cilíndrico	1,71 ± 0,22	Alto, médio, baixo
Comprimento dos internódios	4,27 ± 0,45	Longo, médio, curto
Largura da 3ª folha	28,52 ± 1,99	Larga, mediana, estreita
Comprimento da 3ª folha	49,21 ± 3,20	Comprida, mediana, curta
Ângulo de inserção da 10ª folha	64,85 ± 12,66	Aberto, intermediário, fechado

* Média ± 1 desvio padrão = classes denominadas “médio”, “mediana”, “intermediária”; demais classes acima ou abaixo desses valores.

TABELA 1.3. Médias dos caracteres rendimento em folhas, IQG, teor de nicotina e percentual de talo para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.

Genótipos	Rendimento (kg ha ⁻¹)	IQG (%)	Nicotina (%)		Talo (%)	
			Médias	Classes	Médias	Classes
Tipo Virginia						
K-326	3.121 c-d*	52,07 a-b*	2,94 d-f*	Médio	26,97 a-c*	Médio
K-326 LF	3.493 a	52,84 a-b	2,67 e-g	Médio	29,60 a	Médio
NC-55	3.316 a-c	51,73 a-b	3,05 d-e	Médio	28,70 a	Médio
RG-08	3.243 a-d	51,42 a-b	3,72 a-c	Alto	29,60 a	Médio
K-149b	3.413 a-b	53,56 a-b	3,79 a-b	Alto	26,57 a-c	Médio
MsV17	3.240 a-d	55,98 a-b	3,24 c-d	Médio	28,47 a-b	Médio
C-176	2.799 e-f	43,42 b	3,97 a	Alto	27,73 a-c	Médio
DM-465	3.360 a-c	57,81 a-b	3,37 b-d	Alto	28,47 a-b	Médio
V-961	3.199 b-d	54,36 a-b	3,76 a-b	Alto	28,50 a-b	Médio
V-991	3.167 b-d	53,02 a-b	2,73 e-f	Médio	28,13 a-c	Médio
V-201	3.391 a-c	60,94 a	2,72 e-f	Médio	27,70 a-c	Médio
NC-95	3.018 d-e	42,36 b	2,19 g	Médio	24,53 c-d	Baixo
GLA-3	2.989 d-e	49,82 a-b	0,51 i	Muito Baixo	24,97 b-d	Baixo
LINC-95	2.504 g	55,53 a-b	1,60 h	Baixo	28,33 a-c	Médio
HINC-95	2.570 f-g	46,76 a-b	2,53 f-g	Médio	27,13 a-c	Médio
NC-2326	2.519 g	55,06 a-b	3,10 d-e	Médio	21,60 d	Baixo
Tipo Burlei						
KY-14	2.299 b-d*	64,15 b-c*	3,86 b-c*	Médio	23,73 b-e*	Baixo
BY Va-509	2.499 a-b	74,31 a-b	3,72 b-c	Médio	26,90 a	Médio
BY-37	2.021 d	77,65 a	3,98 b-c	Médio	22,13 d-g	Baixo
MBN-2	2.412 a-c	68,34 a-c	3,86 b-c	Médio	25,50 a-b	Médio
BY-64	2.134 c-d	71,81 a-b	3,38 c-d	Médio	22,87 c-f	Baixo
TN-86	2.253 b-d	63,48 b-c	2,93 d-e	Médio	25,30 a-b	Baixo
TN-90	2.671 a	64,08 b-c	3,84 b-c	Médio	23,27 b-f	Baixo
KY-907	2.506 a-b	56,27 c	2,81 d-e	Baixo	20,33 g-h	Baixo
B-972	2.443 a-c	72,66 a-b	4,26 a-b	Médio	24,17 b-d	Baixo
B-973	2.446 a-c	69,47 a-b	3,66 b-c	Médio	21,87 d-g	Baixo
B-991	2.390 a-c	73,18 a-b	4,24 a-b	Médio	21,37 e-g	Baixo
CSC-223	2.053 d	70,93 a-b	3,82 b-c	Médio	18,30 h	Baixo
BY-21	2.151 c-d	73,38 a-b	4,75 a	Alto	21,93 d-g	Baixo
HIBY-21	2.262 b-d	68,88 a-b	3,94 b-c	Médio	21,00 f-g	Baixo
LIBY-21	1.974 d-e	64,45 b-c	2,65 e	Baixo	21,43 e-g	Baixo
LABY-21	1.704 e	23,91 d	0,45 f	Muito Baixo	25,00 a-c	Baixo

* – Médias seguidas de mesma letra comparadas entre genótipos de mesmo tipo, não diferem significativamente ao nível 5% de acordo com o teste de Duncan.

TABELA 1.4. Médias e classes dos caracteres morfológicos forma das plantas, estatura, ciclo e caule para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.

Genótipo	Forma das plantas	Presença brotos basais	Coloração do caule	Estatura		Dias até florescimento		Diâmetro médio do caule		Índice cilíndrico		Comprimento dos internódios				
				(cm)	Classes	Dias	Classes	(cm)	Classes	Índice	Classes	(cm)	Classes			
Tipo Virginia																
K-326	Ovalada	Ausentes	Verde	106,50	Baixa	62	Médio	2,38	g-i	Médio	1,52	g	Médio	3,77	h-m	Curto
K-326 LF	Ovalada	Ausentes	Verde	150,90	Mediana	85	Muito longo	2,56	d-g	Médio	1,54	f-g	Médio	3,56	j-m	Curto
NC-55	Ovalada	Ausentes	Verde	104,90	Baixa	62	Médio	2,40	g-i	Médio	1,56	d-g	Médio	3,71	i-m	Curto
RG-08	Ovalada	Ausentes	Verde	104,50	Baixa	53	Curto	2,47	f-i	Médio	1,42	g-h	Baixo	3,94	f-l	Médio
K-149b	Ovalada	Ausentes	Verde	118,90	Baixa	67	Médio	2,51	e-h	Médio	1,57	d-g	Médio	3,86	g-l	Médio
MsV17	Ovalada	Ausentes	Verde	126,96	Baixa	70	Médio	2,34	g-j	Pequeno	1,52	f-g	Médio	3,95	f-l	Médio
C-176	Ovalada	Ausentes	Verde	111,40	Baixa	67	Médio	2,32	g-j	Pequeno	1,53	f-g	Médio	4,48	b-g	Médio
DM-465	Ovalada	Ausentes	Verde	144,70	Mediana	62	Médio	2,33	g-j	Pequeno	1,86	c-f	Médio	4,14	e-j	Médio
V-961	Ovalada	Ausentes	Verde	115,60	Baixa	58	Curto	2,21	i-j	Pequeno	1,44	g-h	Baixo	4,20	d-j	Médio
V-991	Ovalada	Ausentes	Verde	117,32	Baixa	67	Médio	2,47	f-i	Médio	1,58	d-g	Médio	3,95	f-l	Médio
V-201	Ovalada	Ausentes	Verde	139,18	Baixa	67	Médio	2,20	i-j	Pequeno	1,59	d-g	Médio	3,75	h-m	Curto
NC-95	Ovalada	Ausentes	Verde	112,50	Baixa	53	Curto	2,27	h-j	Pequeno	1,62	d-g	Médio	4,52	b-g	Médio
GLA-3	Ovalada	Ausentes	Verde	109,60	Baixa	62	Médio	2,27	h-j	Pequeno	1,54	f-g	Médio	4,58	b-f	Médio
LINC-95	Ovalada	Ausentes	Verde	109,40	Baixa	58	Curto	2,30	g-j	Pequeno	1,61	d-g	Médio	4,88	b-d	Longo
HINC-95	Ovalada	Ausentes	Verde	121,10	Baixa	58	Curto	2,10	j	Pequeno	1,70	c-g	Médio	6,08	a	Longo
NC-2326	Ovalada	Ausentes	Verde	127,60	Baixa	53	Curto	1,61	k	Pequeno	1,21	h	Baixo	6,06	a	Longo
Tipo Burlei																
KY-14	Ovalada	Ausentes	Verde claro	162,18	Alta	72	Longo	2,71	c-f	Médio	2,21	a-b	Alto	4,32	d-i	Médio
BY Va-509	Ovalada	Ausentes	Verde claro	144,20	Mediana	72	Longo	2,85	a-c	Grande	1,90	c-d	Médio	4,14	e-j	Médio
BY-37	Ovalada	Ausentes	Verde claro	126,06	Baixa	62	Médio	2,83	a-d	Grande	1,76	c-g	Médio	4,42	b-h	Médio
MBN-2	Ovalada	Ausentes	Verde claro	138,30	Baixa	58	Curto	2,82	a-d	Grande	1,75	c-g	Médio	5,01	b-c	Longo
BY-64	Ovalada	Ausentes	Verde claro	191,50	Alta	85	Muito longo	2,76	b-e	Grande	1,99	b-c	Alto	3,40	k-m	Curto
TN-86	Ovalada	Ausentes	Verde claro	155,80	Mediana	75	Longo	2,69	c-f	Médio	1,72	c-g	Médio	4,65	b-e	Médio
TN-90	Ovalada	Ausentes	Verde claro	163,70	Alta	70	Médio	2,85	a-c	Grande	2,03	b-c	Alto	4,41	c-h	Médio
KY-907	Ovalada	Ausentes	Verde claro	175,00	Alta	75	Longo	2,87	a-c	Grande	2,50	a	Alto	5,10	b	Longo
B-972	Ovalada	Ausentes	Verde claro	127,40	Baixa	62	Médio	2,81	a-d	Grande	1,73	c-g	Médio	4,52	b-g	Médio
B-973	Ovalada	Ausentes	Verde claro	160,40	Mediana	70	Médio	2,75	c-e	Médio	1,88	c-e	Médio	4,34	c-i	Médio
B-991	Ovalada	Ausentes	Verde claro	173,04	Alta	75	Longo	3,04	a-b	Grande	2,21	a-b	Alto	3,30	l-m	Curto
CSC-223	Ovalada	Ausentes	Verde claro	157,56	Mediana	70	Médio	2,90	a-c	Grande	1,86	c-f	Médio	3,13	m	Curto
BY-21	Ovalada	Ausentes	Verde claro	124,10	Baixa	53	Curto	2,78	b-e	Grande	1,57	d-g	Médio	4,54	b-g	Médio
HIBY-21	Ovalada	Ausentes	Verde claro	117,60	Baixa	53	Curto	2,69	c-f	Médio	1,65	d-g	Médio	3,44	k-m	Curto
LIBY-21	Ovalada	Ausentes	Verde claro	113,50	Baixa	58	Curto	2,83	a-d	Grande	1,74	c-g	Médio	3,98	e-k	Médio
LABY-21	Ovalada	Ausentes	Verde claro	111,40	Baixa	58	Curto	3,06	a	Grande	1,55	e-g	Médio	4,52	b-g	Médio

– Médias seguidas de mesma letra comparadas entre todos os genótipos, independente do tipo de fumo, não diferem significativamente ao nível 5% de acordo com o teste de Duncan.

TABELA 1.5. Médias e classes dos caracteres morfológicos número de folhas, largura, comprimento e forma das folhas para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.

Genótipo	N.º folhas/planta		Largura 3ª folha		Comprimento 3ª folha		Forma folhas basais	Largura 10ª folha		Comprimento 10ª folha		Forma folhas medianas centrais ++		
	(N.º)	Classes +	(cm)	Classes	(cm)	Classes		(cm)	Classes	(cm)	Classes			
Tipo Virginia														
K-326	25,60	N	25,74	e-h	Estreita	46,82	g-i	Mediana	Sub-oval	23,04	Mediana	56,12	Mediana	EL
K-326 LF	40,60	BN	24,66	e-i	Estreita	53,22	b-f	Comprida	Oval	20,04	Estreita	57,68	Mediana	L
NC-55	25,20	M	24,92	e-i	Estreita	45,22	h-i	Curta	Sub-oval	24,10	Mediana	60,82	Mediana	EL
RG-08	24,20	M	27,42	e	Mediana	46,84	g-i	Mediana	Sub-oval	27,64	Mediana	60,50	Mediana	EL
K-149b	26,40	N	30,08	d	Mediana	49,70	e-h	Mediana	Sub-oval	25,90	Mediana	61,64	Mediana	EL
MsV17	29,60	N	27,42	e	Mediana	47,38	g-i	Mediana	Sub-oval	25,42	Mediana	57,48	Mediana	EL
C-176	23,20	M	25,84	e-h	Estreita	43,66	i-j	Curta	Sub-oval	27,34	Mediana	57,56	Mediana	EL
DM-465	33,00	BN	30,28	c-d	Mediana	54,48	b-d	Comprida	Sub-oval	25,02	Mediana	61,04	Mediana	EL
V-961	25,20	M	27,14	e-f	Mediana	45,00	h-i	Curta	Sub-oval	25,50	Mediana	58,06	Mediana	EL
V-991	27,80	N	26,78	e-g	Mediana	49,70	e-h	Mediana	Sub-oval	24,28	Mediana	58,08	Mediana	EL
V-201	30,80	N	27,32	e	Mediana	49,60	f-h	Mediana	Sub-oval	24,72	Mediana	58,80	Mediana	EL
NC-95	24,60	M	26,00	e-h	Estreita	45,06	h-i	Curta	Sub-oval	25,66	Mediana	60,32	Mediana	EL
GLA-3	22,60	M	25,06	e-i	Mediana	42,96	i-k	Curta	Sub-oval	26,58	Mediana	59,16	Mediana	EL
LINC-95	22,60	M	23,20	h-i	Mediana	38,22	l	Curta	Sub-oval	30,44	Mediana	56,98	Mediana	EL
HINC-95	21,80	M	23,98	g-i	Mediana	38,90	k-l	Curta	Sub-oval	24,20	Mediana	54,28	Mediana	EL
NC-2326	21,00	M	22,46	l	Mediana	40,36	j-l	Curta	Sub-oval	26,80	Mediana	58,82	Mediana	EL
Tipo Burlei														
KY-14	30,60	N	32,70	a-d	Larga	47,26	g-i	Mediana	Sub-oval	36,56	Larga	58,52	Mediana	EL
BY Va-509	26,80	N	34,16	a-b	Larga	59,40	a	Comprida	Sub-oval	34,40	Larga	62,18	Mediana	EL
BY-37	23,60	M	30,84	c-d	Larga	52,00	b-f	Mediana	Sub-oval	32,36	Larga	61,40	Mediana	EL
MBN-2	26,20	N	31,84	b-d	Larga	56,26	a-b	Cumprida	Sub-oval	30,62	Larga	65,80	Comprida	EL
BY-64	45,60	BN	33,18	a-c	Larga	54,40	b-e	Cumprida	Sub-oval	30,54	Mediana	60,48	Mediana	EL
TN-86	27,80	N	31,36	b-d	Larga	52,52	b-f	Cumprida	Sub-oval	36,44	Larga	68,56	Comprida	EL
TN-90	29,40	N	32,36	b-d	Larga	55,98	a-b	Cumprida	Sub-oval	36,08	Larga	68,16	Comprida	EL
KY-907	33,00	BN	35,30	a	Larga	55,86	a-c	Cumprida	Sub-oval	38,90	Larga	68,54	Comprida	EL
B-972	24,00	M	31,32	b-d	Larga	51,22	c-g	Mediana	Sub-oval	36,36	Larga	64,90	Mediana	EL
B-973	28,80	N	30,88	c-d	Larga	51,10	d-g	Mediana	Sub-oval	37,52	Larga	67,86	Comprida	EL
B-991	39,40	BN	32,08	b-d	Larga	54,56	b-d	Cumprida	Sub-oval	31,68	Larga	67,58	Comprida	EL
CSC-223	38,80	BN	31,60	b-d	Larga	52,42	b-f	Cumprida	Sub-oval	30,18	Mediana	60,58	Mediana	EL
BY-21	25,60	N	25,74	e-h	Estreita	47,10	g-i	Mediana	Sub-oval	29,36	Mediana	61,24	Mediana	EL
HIBY-21	26,80	N	26,08	e-h	Estreita	45,46	h-i	Cumprida	Sub-oval	31,76	Larga	60,62	Mediana	EL
LIBY-21	24,20	M	24,28	f-i	Estreita	45,90	h-i	Cumprida	Sub-oval	30,34	Mediana	63,58	Mediana	EL
LABY-21	23,00	M	30,52	c-d	Larga	56,14	a-b	Cumprida	Sub-oval	30,66	Larga	64,82	Mediana	EL

* – Médias seguidas de mesma letra comparadas entre todos os genótipos, independente do tipo de fumo, não diferem significativamente ao nível 5% de acordo com o teste de Duncan.

+ – N: Numeroso; BN: Bastante Numeroso; M: Mediano

++ – EL: Elíptica Lanceolada; L: Lanceolada

TABELA 1.6. Médias e classes dos caracteres morfológicos de folha para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS, 2000.

Genótipo	Ângulo 10ª folha		Coloração folhas	Disposição nervuras secundárias	Curvatura ponta lâmina foliar	Perfil transversal 10ª folha	Formato aurícula	Superfície lâmina foliar	Margem lâmina foliar	Ponta lâmina foliar	
	(°)	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes +	Classes	Classes ++	
Tipo Virginia											
K-326	72,60	a-c*	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
K-326 LF	80,80	a	Aberto	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
NC-55	52,60	d-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
RG-08	68,60	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
K-149b	57,00	b-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
MsV17	61,60	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
C-176	68,80	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
DM-465	68,40	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
V-961	56,80	b-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
V-991	51,80	e-f	Fechado	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
V-201	53,80	c-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
NC-95	72,40	a-d	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	E	Lisa	MA
GLA-3	67,00	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
LINC-95	66,00	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
HINC-95	61,80	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	E	Lisa	MA
NC-2326	67,00	a-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Curvado	Côncavo	Decorrente	LE	Lisa	MA
Tipo Burlei											
KY-14	58,20	b-f	Intermediário	Verde normal	Intermediárias	Côncavo	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
BY Va-509	71,00	a-e	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
BY-37	59,80	d-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
MBN-2	67,00	a-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
BY-64	64,60	a-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
TN-86	66,60	a-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
TN-90	50,80	f	Fechado	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
KY-907	58,80	b-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
B-972	60,00	b-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
B-973	57,60	b-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
B-991	59,80	b-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
CSC-223	69,20	a-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Côncavo	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
BY-21	80,80	a	Aberto	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
HIBY-21	76,60	a-b	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	LE	Lisa	MA
LIBY-21	81,00	a	Aberto	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA
LABY-21	66,40	a-f	Intermediário	Verde clara	Abertas	Direto	Retilíneo	Semi-peciolada	L	Lisa	MA

* – Médias seguidas de mesma letra comparadas entre todos os genótipos, independente do tipo de fumo, não diferem significativamente ao nível 5% de acordo com o teste de Duncan;

+ – LE: Ligeiramente Enrugada; E: Enrugada; L: Lisa

++ – MA: Medianamente Afilada

TABELA 1.7. Classes dos caracteres morfológicos de inflorescência e fruto para os genótipos de fumo avaliados na Estação Experimental da empresa DIMON, Vera Cruz, RS. 2000.

Genótipo	Forma inflorescência	Tipo de flor	Tamanho do cálice	Tamanho da corola	Cor da corola	Formato limbo corola	Tipo deiscência fruto	Formato cápsula
	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes	Classes
Tipo Virginia								
K-326	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
K-326 LF	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
NC-55	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
RG-08	Piramidal	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
K-149b	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
MsV17	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
C-176	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
DM-465	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
V-961	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
V-991	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
V-201	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
NC-95	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
GLA-3	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
LINC-95	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
HINC-95	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
NC-2326	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
Tipo Burlei								
KY-14	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
BY Va-509	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
BY-37	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
MBN-2	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
BY-64	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
TN-86	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
TN-90	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
KY-907	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
B-972	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
B-973	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
B-991	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
CSC-223	Poligonoide	Macho estéril	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	–
BY-21	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
HIBY-21	Piramidal	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
LIBY-21	Piramidal	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada
LABY-21	Poligonoide	Fértil	Pequeno	Intermediária	Rosada	Poligonoestelar	Não deiscente	Alongada

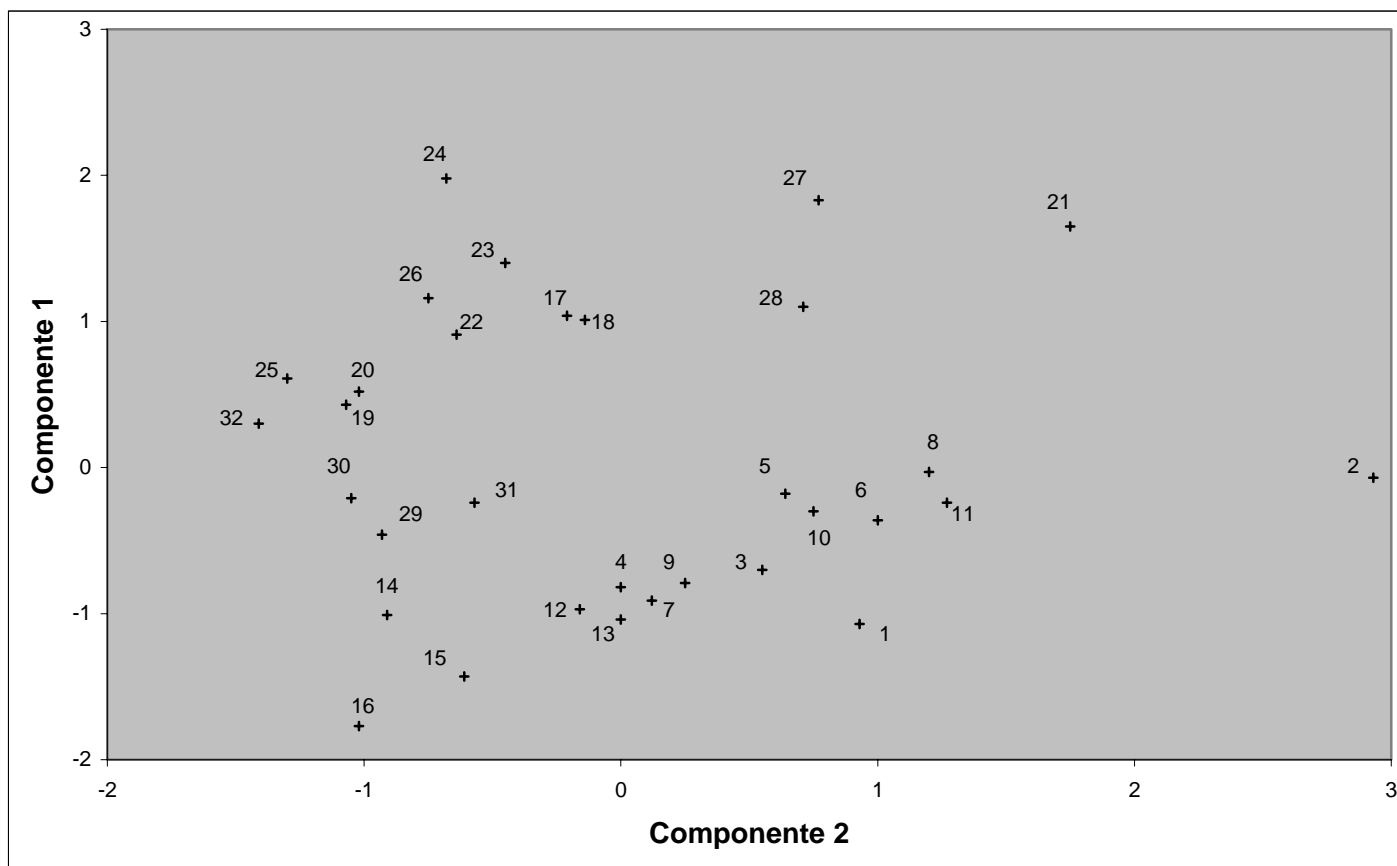


FIGURA 1.1. Dispersão de 32 genótipos de fumo em relação a dois componentes principais com base em 13 características quantitativas. Número 1: K-326; 2: K-326LF; 3: NC-55; 4: RG-08; 5: K-149; 6: MsV17; 7: C-176; 8: DM-465; 9: V-961; 10: V-991; 11: V-201; 12: NC-95; 13: GLA-3; 14: LINC-95; 15: HINC-95; 16: NC-2326; 17: KY-14; 18: BYVa-509; 19: BY-37; 20: MBN-2; 21: BY-64; 22: TN-86; 23: TN-90; 24: KY-907; 25: B-972; 26: B-973; 27: B-991; 28: CSC-223; 29: BY-21; 30: HIBY-21; 31: LIBY-21; 32: LABY-21. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

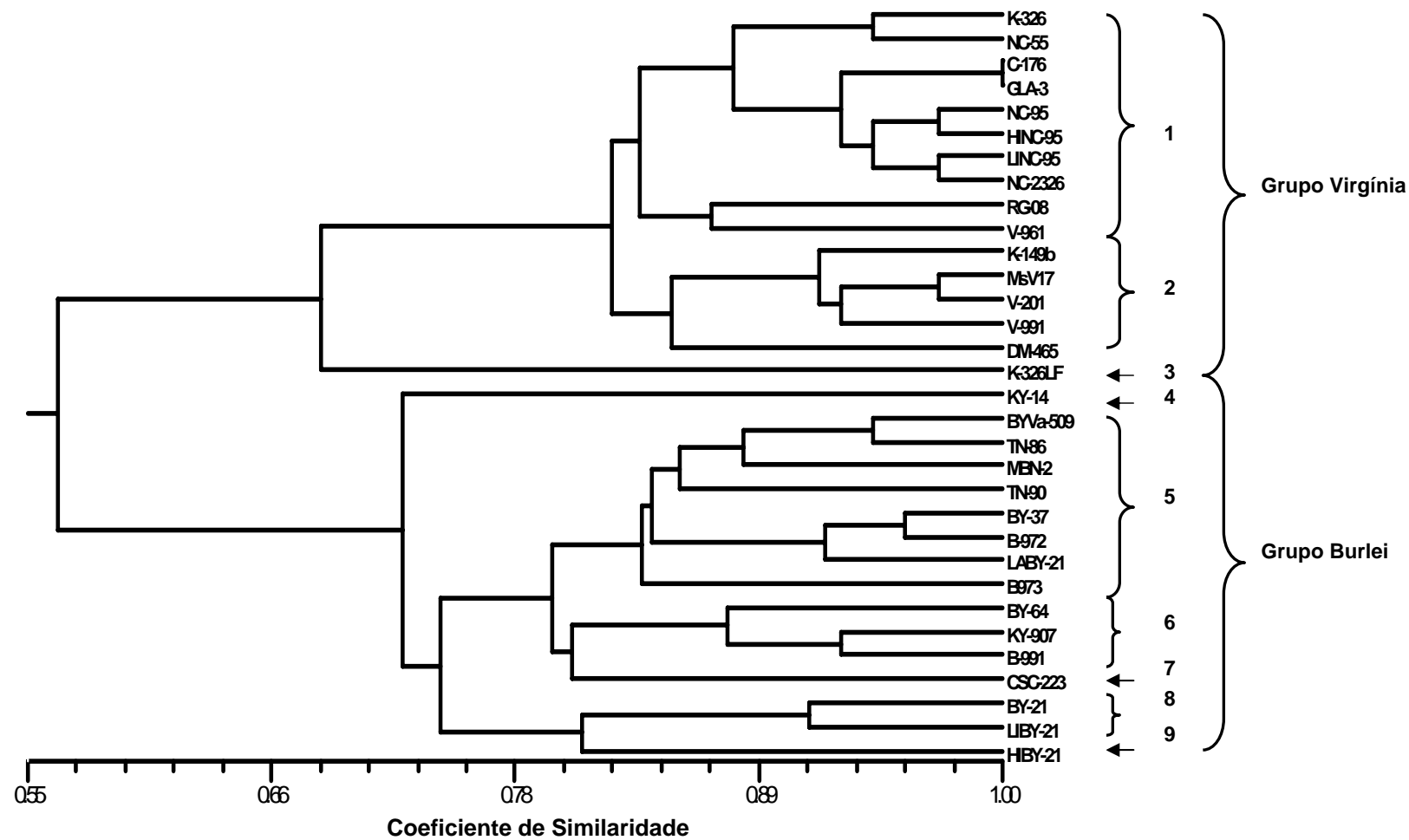


FIGURA 1.2. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em 32 caracteres morfológicos. Faculdade de Agronomia – UFRGS. Porto Alegre, RS. 2002.

CAPÍTULO II

Variabilidade genética em fumo estimada através de marcadores

RAPD, Microssatélites e AFLP

2.1 INTRODUÇÃO

O fumo (*Nicotiana tabacum* L.) é a cultura não alimentícia mais importante economicamente do mundo, sendo cultivado em mais de cem países e envolvendo em torno de 33 milhões de empregos na lavoura (ABIFUMO, 1999).

Devido a sua importância, avanços têm ocorrido na genética e no melhoramento desta espécie, com conseqüente desenvolvimento de cultivares com alto rendimento, qualidade e resistência a diversas moléstias (Legg & Smeeton, 1999). Paralelo a estes avanços, esforços têm sido concentrados na obtenção de genótipos com caracteres agrônômicos e de qualidade foliar desejáveis, o que pode estar levando a uma restrição na base genética dentro da espécie (Wernsman & Rufty, 1987). Apesar disso, a variabilidade morfológica encontrada dentro das populações segregantes de fumo resultantes de cruzamentos entre cultivares modernos ainda é elevada. Assim como no melhoramento das principais culturas agrícolas, os ganhos genéticos obtidos no fumo têm sido suficientes para encorajar o contínuo melhoramento dentro de um grupo gênico estreito.

Caracteres fenotípicos, tradicionalmente usados para estimar a diversidade genética, têm apresentado limitações, pois são geralmente influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta. Além disso, a manifestação fenotípica de um caráter pode ser influenciada por epistasia e pleiotropia, o que dificulta a avaliação. No entanto, caracteres morfológicos têm sido utilizados para caracterizar coleções de germoplasma de diferentes espécies de importância agrícola (Bered, 1999; Souza & Sorrells, 1991; Van Beuningen & Busch, 1997; Shut et al., 1997; Choi et al., 2000). Também na cultura do fumo estes caracteres são utilizados para caracterização e registro de cultivares e em estudos de diversidade genética (Wang et al., 2001; Torrecilla, 2001).

Por sua vez, marcadores de DNA são independentes das condições ambientais e mostram alto nível de polimorfismo, além de muito abundantes e de herança mendeliana, possibilitando uma descrição mais detalhada da estrutura genética de populações (Williams et al., 1990). Esse tipo de marcador tem sido utilizado com sucesso em estudos de diversidade genética em diferentes espécies como arroz (Cao & Oard, 1997; Zhu et al., 1998); trigo (Barret & Kidwell, 1998; Cao et al., 1998); cevada (Shut et al., 1997); feijão (Franco et al., 2001); soja (Rongwen et al., 1995); milho (Ajmone Marsan et al., 1998; Sun et al., 2001), entre outras.

Alguns autores têm relatado a eficiência do uso de marcadores de DNA em diferentes estudos com o fumo, entre eles a introgressão de genes de resistência a moléstias e seleção assistida (Bai et al., 1995; Brake & Rufty, 2000; Yi et al., 1998; Yi & Rufty, 1998). Também em estudos de filogenia entre espécies do gênero *Nicotiana* e construção de mapas de ligação genética (Yu & Lin, 1997; Lin et al., 2001; Nishi et al., 2001). Marcadores RAPD foram utilizados para avaliar

o relacionamento entre híbridos somáticos e outras espécies do gênero *Nicotiana* (Coussirat, 1993; De Filippis et al., 1996).

Apesar de seu uso, o nível de polimorfismo encontrado em fumo tem sido geralmente baixo, quando comparado com aquele de outras espécies. Em um estudo de avaliação de populações duplo-haplóides derivadas de dois híbridos de fumo tipo Virgínia e Burlei com marcadores RAPD, detectou-se baixo polimorfismo entre as linhas recombinantes (Yi apud Wernsman, 1999, p.24). Também Coussirat (1994) e Del Piano et al. (1998) utilizaram marcadores RAPD para avaliar a diversidade genética entre cultivares de fumo e relataram baixo polimorfismo.

Marcadores microssatélites cloroplásticos foram desenvolvidos por Bryan et al. (1999) para estudar a diversidade genética em espécies da família Solanaceae. Com o uso deste tipo de marcador, os autores relataram elevado polimorfismo entre espécies do gênero *Nicotiana*.

Estudos com marcadores AFLP mostraram que esta técnica é eficiente para identificar cultivares de fumo, apresentando alto poder de resolução e reprodutibilidade (Rossi et al., 1999; Ren & Timko, 2001).

Apesar de acreditar-se que a base genética do fumo utilizado em programas de melhoramento no Sul do Brasil seja estreita, nenhum trabalho foi realizado até o momento para testar esta hipótese. Os objetivos deste estudo foram estimar a grau de similaridade genética de germoplasma de fumo de diferentes origens através de marcadores RAPD, microssatélites e AFLP; comparar os diferentes tipos de marcadores quanto a sua habilidade de distinguir os genótipos em estudo; comparar o grau de similaridade genética entre os

grupos cultivado e de espécies silvestres e identificar marcadores moleculares para os genótipos do programa de melhoramento da empresa DIMON.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e dois genótipos de fumo de diferentes origens e quatro espécies silvestres do gênero *Nicotiana* foram avaliados através de marcadores RAPD, microssatélites e AFLP (Tabela 2.1). Dos cultivares avaliados, oito são genótipos do programa de melhoramento genético da DIMON do Brasil Tabacos Ltda., e outros 24 cultivares de diferentes procedências e instituições, que deram origem aos programas de melhoramento de fumo no Brasil. As espécies silvestres selecionadas para este estudo contribuíram com genes de resistência a diversas moléstias importantes para a espécie cultivada. A espécie *Nicotiana rústica* contribuiu com genes de resistência ao fogo selvagem; *N. debneyi* é uma fonte de resistência à podridão preta das raízes e ao mofo azul; *N. longiflora* apresenta genes de resistência a nematóides, canela preta e fogo selvagem e *N. alata* é uma fonte de resistência a viroses.

Os genótipos foram semeados em bandejas no sistema *floating* em casa de vegetação e a coleta de folhas verdes foi realizada no estágio de plântula. A extração de DNA foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Murray & Thompson (1980), com modificações. Após extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e diluído em água estéril para uma solução de trabalho de 5ng/ μ l.

Análise de RAPD

As reações de RAPD foram conduzidas conforme descrito por Williams et al. (1990), com modificações, e preparadas para um volume final de 13µl com os seguintes componentes: 20ng de DNA, 0,8 mM DNTPMix; 2,5 mM de MgCl₂; tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl da enzima *Taq* polimerase; 25ng *primer*; 1U *Taq* DNA polimerase. Os *primers* utilizados neste estudo foram oligonucleotídeos decâmeros da OPERON Technologies. As amplificações foram realizadas em Termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Inc.). Cada reação consistiu de 4 minutos a 94°C seguido de 41 ciclos de 1 minuto a 92°C (desnaturação), 1 minuto a 35°C (anelamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), e finalmente, uma extensão a 72°C por 2 minutos. A eletroforese foi conduzida a 100 Volts por 2,5 horas e os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,6%, corado com brometo de etídio. O marcador DNA Ladder – 100 pb (Gibco BRL) foi utilizado como padrão de peso molecular para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados, os quais foram visualizados sob luz ultravioleta (Transluminador, modelo TFX 20 M, Life Technologies). As imagens dos géis foram capturadas utilizando câmara digital (Kodak Digital Science). Cento e trinta e seis *primers* foram inicialmente avaliados usando-se oito genótipos, entre eles três cultivares do tipo Virgínia, três cultivares do tipo Burlei e duas espécies silvestres do gênero *Nicotiana*. Destes, foram selecionados 21, por apresentarem polimorfismo e padrão de bandas adequados para análise da divergência genética entre os demais genótipos. Com base na presença (1) ou ausência (0) de cada fragmento específico de DNA amplificado, gerado por 21 *primers*, foi obtida uma matriz de dados binários.

Análise de microssatélite

As reações de microssatélites cloroplásticos foram conduzidas conforme descrito por Bryan et al. (1999), com modificações, e preparadas para um volume final de 20µl com os seguintes componentes: 25ng de DNA, 0,4 mM DNTPmix; 2,5 mM de MgCl₂; tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl da enzima *Taq* polimerase; 25ng de cada *primer*; 1 U *Taq* DNA polimerase. Os *primers* utilizados neste estudo foram desenvolvidos por Bryan et al. (1999). As amplificações foram realizadas em Termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Inc.). Cada reação consistiu de 4 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 1 minuto na temperatura apropriada de anelamento e 1 minuto a 72°C (extensão) e, finalmente, uma extensão a 72°C por 5 minutos.

As amostras foram previamente desnaturadas em PCR a 94°C por 10 minutos e os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% durante 2 horas em cuba vertical (Life Technologies – Gibco BRL). Os produtos da amplificação foram corados com nitrato de prata, conforme protocolo sugerido por Promega Corporation (1996). O marcador DNA Ladder – 100 pb (Gibco BRL) foi utilizado como padrão de peso molecular para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados. As imagens dos géis foram capturadas utilizando um *Scanner*. Vinte *primers* foram avaliados, sendo 18 deles selecionados para análise da divergência genética entre os genótipos. Avaliou-se o número de alelos por loco para cultivares e genótipos silvestres, o número de alelos polimórficos entre cultivares e a genotipagem de cada amostra. Com base na presença (1) ou ausência (0) de cada alelo, gerado por 18 *primers*, foi obtida uma matriz de dados binários.

Análise de AFLP

As análises AFLP (Zabeau, 1993; Vos et al., 1995) foram conduzidas conforme o protocolo modificado descrito para cevada (Agriculture and Agri-Food Canada, 1997). Utilizaram-se 250ng de DNA da solução estoque para digestão com as enzimas *EcoRI* e *MseI*. Os fragmentos da restrição foram ligados a adaptadores específicos das respectivas enzimas, utilizando a enzima T4 ligase, a 20°C por 2 horas. Para a pré-amplificação, utilizou-se 5ng do DNA ligado e *primers* com seqüências específicas complementares aos adaptadores, com um nucleotídeo seletivo, e submetidos a 20 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos (1:2,5) em água e usados para amplificação seletiva. As reações seletivas foram preparadas para um volume final de 20µl com os seguintes componentes: 5µl do DNA da pré amplificação (1:2,5), 0,8 mM de DNTPMix; 1,5 mM de MgCl₂; tampão 40 mM Tris-HCl pH 8,4 e 100 mM KCl da enzima *Taq* polimerase; 30ng de cada *primer EcoRI* e *MseI* contendo 3 nucleotídeos arbitrários seletivos; 1U *Taq* DNA polimerase; e 8,6µl de água estéril. As amplificações seletivas foram realizadas em Termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Inc.). Cada reação consistiu de 94°C por 60 segundos; 65°C – 56 °C por 60 segundos (menos 1°C a cada ciclo); 72°C por 90 segundos, seguido por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos.

As amostras foram previamente desnaturadas em PCR a 94°C por 10 minutos e os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% durante 2,5 horas em cuba vertical (Life Technologies – Gibco BRL). Os produtos da amplificação foram corados com nitrato de prata, conforme o

protocolo sugerido por Promega Corporation (1996). O marcador DNA Ladder – 100 pb (Gibco BRL) foi utilizado como padrão de peso molecular para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados. As imagens dos géis foram capturadas utilizando um *Scanner*. Vinte e três combinações de *primers* foram avaliadas, sendo 13 delas selecionadas por apresentarem polimorfismo e padrão de fragmentos adequados para análise da divergência genética entre os genótipos. Avaliou-se o número de fragmentos amplificados totais e polimórficos entre cultivares e genótipos silvestres. Com base na presença (1) ou ausência (0) de cada banda, gerada por 13 combinações de primers, foi obtida uma matriz de dados binários.

Análises de agrupamento

Os dados de cada matriz binária gerada foram utilizados para estimar o coeficiente de similaridade genética de Jaccard. Com base nestas matrizes de similaridade, os genótipos foram agrupados utilizando o modelo hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) e, a partir dos resultados obtidos, foi gerado um dendograma através do módulo SAHN, ambos utilizando o programa computacional NTSYS versão 2.1 (Rohlf, 2000).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores RAPD

Cento e trinta e seis *primers* foram usados para avaliar as amostras de oito genótipos representando os diferentes tipos de fumo e espécies silvestres. Desses, 28 não produziram amplificações, 35 produziram amplificações fracas, 52 apresentaram bandas monomórficas, restando apenas 21 que produziram bandas avaliáveis. Dos 136 *primers* avaliados, apenas 19 (14%) apresentaram bandas polimórficas entre cultivares, sendo o polimorfismo detectado superior àquele relatado por Coussirat (1994), que avaliou 160 *primers* RAPD, porém apenas nove (5%) mostraram bandas polimórficas entre 32 cultivares de fumo. Também foram utilizados 1500 *primers* RAPD para avaliar populações duplo-haplóides de fumo tipo Virgínia e Burlei e detectou-se baixo polimorfismo (Yi apud Wernsman, 1999, p.24).

Os 21 *primers* usados na análise dos dados geraram um total de 271 fragmentos com amplitude de variação entre 7 e 17 fragmentos por *primer* (média de 12,9), sendo que o tamanho dos fragmentos amplificados variou de 275 a 2200 pb (Tabela 2.2). Do total de fragmentos amplificados, 106 (39,1%) foram polimórficos e 60 (22,1%) foram monomórficos entre cultivares, sendo 105 (38,8%) fragmentos específicos para as espécies silvestres. Isto revela que o nível de polimorfismo foi maior do que o relatado por Coussirat (1994), que utilizando 9 *primers* detectou 29 fragmentos polimórficos entre 32 cultivares. Também Del Piano et al. (1998) detectaram baixo nível de polimorfismo entre cultivares de fumo. Ainda, estudos na Universidade da Carolina do Norte demonstraram que menos de um polimorfismo é revelado a cada 10 *primers* testados (Wernsman, 1999). Também Rossi et al. (1999), utilizando 220 *primers* para caracterizar 19 cultivares de fumo, encontraram apenas 30 fragmentos polimórficos. O presente estudo revelou maior polimorfismo entre cultivares, o que

pode ser explicado pela seleção prévia de *primers* e pela utilização apenas daqueles que amplificaram fragmentos polimórficos na análise dos dados.

Com a utilização de alguns *primers* RAPD identificaram-se marcadores polimórficos entre duas linhagens irmãs de fumo tipo Burlei, TN-86 e TN-90. Um exemplo disso é apresentado com o *primer* OPA-13, onde estão identificados três marcadores polimórficos entre estes genótipos, com alta intensidade de bandas acima de 400pb (Figura 2.1).

Os resultados obtidos indicam que uma seleção prévia de *primers* RAPD pode permitir a detecção de polimorfismo para identificação de cultivares de fumo. Estes marcadores estão entre os mais utilizados e difundidos devido à sua facilidade de uso, rapidez e baixo custo. No entanto, apresentam baixa repetibilidade e pouca consistência entre laboratórios, que podem ser limitantes para sua utilização (Cruz & Milach, 1998).

Marcadores microssatélites

Oitenta e seis alelos foram detectados em 18 locos microssatélites cloroplásticos, sendo 46 alelos para cultivares e 40 específicos para espécies silvestres (Tabela 2.3). Quatorze locos foram polimórficos entre os 32 cultivares, obtendo-se 38 alelos. O número de alelos por loco variou de 2 a 8, com média de 4,7. A Figura 2.2 mostra o exemplo do loco NTCP18, onde três alelos foram identificados entre os 36 genótipos, com tamanho variando de 177 a 189 pb.

No presente estudo com marcadores microssatélites, um elevado nível de polimorfismo foi detectado para as espécies silvestres e entre estas e os cultivares, mas baixo polimorfismo entre cultivares. Os resultados obtidos são concordantes com aqueles relatados por Weising & Gardner (1999) que,

utilizando microssatélites cloroplásticos, encontraram níveis elevados de polimorfismo interespecífico dentro do gênero *Nicotiana* e limitada variação intraespecífica em *Nicotiana tabacum*. Segundo Brandle & Bai (1999), estudos com seqüências disponíveis do fumo têm revelado di e tri-nucleotídeos repetidos dentro dos introns e flanqueando genes estruturais. Entretanto, de maneira geral, os níveis de polimorfismo não foram maiores do que aqueles encontrados com outras metodologias. Os resultados obtidos também são concordantes com aqueles relatados por Bryan et al. (1999) que utilizaram 36 microssatélites cloroplásticos e identificaram maior polimorfismo entre espécies do gênero *Nicotiana*. Vinte destes *primers* foram os mesmos utilizados no presente estudo.

Marcadores AFLP

Treze combinações de *primers* produziram 1526 fragmentos de DNA amplificados entre os 36 genótipos avaliados, sendo 484 (31,7%) polimórficos (Tabela 2.4). Destes, 202 (13,2%) fragmentos foram polimórficos entre cultivares de fumo e 301 (19,7%) foram polimórficos entre espécies silvestres. O número de fragmentos polimórficos entre cultivares por combinação de *primers* variou de 5 (M-CGA + E-ACT) a 37 (M-CCT + E-ACT), com média de 15,5 fragmentos. A Figura 2.3 apresenta alguns dos marcadores AFLP identificados com a combinação de *primers* M-CAG + E-ACT para os genótipos avaliados.

No presente estudo, o nível de polimorfismo foi elevado para espécies silvestres e baixo entre cultivares. Os resultados obtidos, de maneira geral, foram concordantes com estudos prévios utilizando marcadores AFLP na cultura do fumo. Rossi et al. (1999) relataram alto poder de resolução para a técnica, onde seis combinações de *primers* resultaram em 33 marcadores polimórficos para

quatro variedades de fumo. Ren & Timko (2001) utilizaram cinco combinações de *primers* e identificaram 460 fragmentos AFLP, dos quais 119 (25,87%) foram polimórficos entre 46 linhagens de fumo.

Neste estudo, um grande número de marcadores AFLP foi obtido por gel analisado e, utilizando poucas combinações de *primers*, obteram-se marcadores polimórficos para os cultivares de fumo. Estes resultados mostram que estes marcadores são eficientes para estudos de diversidade genética da espécie. Além disso, uma seleção prévia de combinações de *primers* AFLP pode permitir maior detecção de polimorfismo para identificação de cultivares de fumo. O nível de polimorfismo encontrado entre cultivares de fumo, utilizando marcadores AFLP, foi relativamente baixo quando comparado com outras espécies como arroz (Mackill et al., 1996; Zhu et al., 1998); milho (Ajmone et al., 1998), confirmando que a variabilidade genética no fumo é baixa.

Identificação de marcadores moleculares para genótipos do programa de melhoramento Dimon

Os *primers* RAPD que separaram os tipos de fumos Virgínia e Burlei foram: OPA-13 (700pb); OPD-3 (500pb); OPJ-7 (555; 600; 800; 900pb); OPU-9 (1200pb). Também, as combinações de *primers* AFLP: M-CCC + E-ACA (460pb) e M-CTT + E-ACT (410pb).

Com RAPD, foram identificados sete fragmentos específicos para quatro dos oito genótipos do programa Dimon e com AFLP, 29 fragmentos para cinco destes (Tabela 2.5). Estes fragmentos específicos podem ser úteis para identificação de cultivares da Empresa e comprovação de sua distinguibilidade.

No caso de RAPD, a validação destes marcadores é fundamental para que possam ser implementados em rotina.

Similaridade genética

Os produtos amplificados foram usados para calcular os índices de similaridade genética (SG) média para os genótipos de fumo, obtidos através dos diferentes marcadores moleculares. O maior índice de SG média para todos os possíveis pares de genótipos foi obtido para marcadores RAPD, sendo 0,68, variando de 0,14 a 1,0, e entre os cultivares foi 0,74 (Tabelas 2.6 e 2.7). Considerando os genótipos dentro de seus respectivos tipos de fumo, obteve-se uma SG média de 0,87 para o tipo Virgínia e 0,86 para o tipo Burlei, diferindo dos resultados encontrados por Coussirat (1994), que relatou maior SG para o tipo Virgínia.

Os marcadores microsatélites apresentaram a menor SG média (0,55), variando de 0,10 a 1,0 (Tabelas 2.6 e 2.8). Considerando apenas os cultivares, a SG média foi 0,65, apresentando índices semelhantes para os diferentes tipos de fumo. Bryan et al. (1999) relataram alto nível de polimorfismo (heterozigosidade de 0,79) entre nove acessos de fumo, porém apenas três destes acessos eram cultivares (*Nicotiana tabacum*) e apresentaram maior similaridade genética.

Por sua vez, marcadores AFLP apresentaram SG variando de 0,01 a 0,97, com média de 0,64 (Tabelas 2.6 e 2.9). Dos tipos de marcadores, foi o que apresentou o maior valor absoluto de SG média entre cultivares (0,80). No entanto, apenas as estimativas de SG obtidas através de marcadores RAPD e microsatélites para genótipos do tipo Virgínia diferiram significativamente ao nível

de 5% pelo teste t. Apesar das estimativas médias de SG obtidas com marcadores RAPD e AFLP não diferirem estatisticamente, a SG entre alguns pares de genótipos mostrou grande variação para estes marcadores. Um exemplo disto pode ser observado entre os genótipos MSV17 e V-961, apresentando SG de 0,92 com RAPD e 0,23 com AFLP. Nesse caso, um maior número de marcadores capazes de diferenciar esses dois genótipos foi obtido com AFLP.

A comparação das SG médias obtidas com as espécies silvestres e com genótipos da espécie cultivada revelou diferenças estatísticas significativas entre esses dois grupos para todos os tipos de marcadores moleculares (Tabelas 2.6 a 2.9). Esses resultados evidenciam que existe grande diversidade dentro do gênero *Nicotiana* e que a base genética da espécie *N. tabacum* pode ser estreita, o que é esperado em anfidiplóides.

Agrupamento dos genótipos

Os dendogramas obtidos através dos diferentes índices de similaridade genética mostraram resultados distintos para os diferentes tipos de marcadores, considerando os grupos formados. Para formação de todos os agrupamentos, utilizou-se a SG média dos genótipos tipo Burlei, porque foi a que permitiu uma separação mais concordante com as características fenotípicas dos cultivares de fumo. O dendograma obtido com marcadores RAPD (Figura 2.4) separou os genótipos em 15 grupos, enquanto os dendogramas microssatélites e AFLP (Figuras 2.5 e 2.6) mostraram 6 e 10 grupos, respectivamente. Isto se justifica pelo fato de ter sido obtido maior nível de polimorfismo com marcadores RAPD, devido a uma seleção prévia de *primers*.

No dendograma gerado por marcadores RAPD (Figura 2.4), o grupo 1 foi formado por 11 cultivares do tipo Virgínia, sendo três deles genótipos do programa Dimon e os demais, cultivares americanos, todos com elevada similaridade genética. O grupo 2 foi constituído por 11 cultivares do tipo Burlei, sendo a maioria genótipos americanos. Destes, o cultivar BY-64 apresentou menor similaridade em relação aos demais, sendo concordante com dados fenotípicos. O genótipo B-991, que apresenta alta tolerância à murcha bacteriana, formou o grupo 3. O grupo 4 foi representado por C-176, que se diferencia dos demais por combinar resistência ao mosaico do fumo e tolerância à murcha bacteriana. HINC-95 formou o grupo 5. O grupo 6 foi constituído por dois genótipos do programa Dimon com semelhanças fenotípicas e de genealogia. O genótipo TN-90 agrupou isoladamente, se diferenciando da linhagem irmã TN-86 e mostrando maior similaridade com o B-973, o que é confirmado pelo parentesco entre eles. Os grupos 9, 10 e 11 apresentaram menor similaridade genética em relação aos demais genótipos. Elevado nível de diversidade interespecífica foi encontrado, o que pode ser observado através da disposição das espécies silvestres dentro do dendograma (grupos 12 a 15).

O dendograma, baseado em marcadores microssatélites, separou os genótipos em seis grupos distintos (Figura 2.5). Os grupos 2, 3, 5 e 6 foram constituídos das espécies silvestres, com elevada diversidade genética entre elas e entre cultivares. Todas os cultivares foram agrupados em apenas dois grandes grupos, conforme origem materna. O grupo 1 incluiu todos os genótipos mais antigos e de origens americana e japonesa, com exceção do cultivar DM-465, e o grupo 4 incluiu todos os genótipos mais modernos, híbridos e de origem brasileira, com exceção do cultivar NC-55. A similaridade genética entre os genótipos dos

grupos 3 e 6 foi baixa, porém foi alta (1,0) dentro dos respectivos grupos (Tabela 2.7 e Figura 2.5), com todos os genótipos apresentando os mesmos alelos. Estes resultados mostraram que marcadores microssatélites agruparam os cultivares de fumo de acordo com sua origem materna, o que é esperado de microssatélites cloroplásticos.

O dendograma, baseado em marcadores AFLP, separou os genótipos em 10 grupos distintos (Figura 2.6). Foi detectada baixa SG intraespecífica e elevada SG interespecífica, sendo concordante com os resultados de Ren & Timko (2001). O grupo 1 foi constituído de cultivares tipo Virgínia com semelhanças fenotípicas e de genealogia. Os cultivares NC-95 e NC-2326 aprovadas na década de 60 e que possuem em comum o progenitor Hicks na genealogia, além de serem consideradas como padrões de qualidade, formaram o grupo 2. O grupo 3 foi constituído por todos os genótipos tipo Burlei, com exceção do genótipo B-991, onde os subgrupos foram concordantes com dados de genealogia. Os grupos 4, 5 e 6 foram constituídos de genótipos do programa Dimon que agruparam isoladamente dos demais, sendo os cultivares MSV17, V-961 e B-991, respectivamente. Os grupos 7 a 10 foram constituídos por espécies silvestres apresentando grande diversidade genética.

A partir da observação dos dendogramas obtidos com marcadores RAPD e AFLP (Figuras 2.4 e 2.6), percebe-se que houve diferenças quanto à distinguibilidade de alguns cultivares. Com RAPD foi possível distinguir os genótipos: C-176; HINC-95; TN-90; B-973; CSC-223; KY-907 e NC-95. Por outro lado, com marcadores AFLP foi possível distinguir os cultivares V-961 e MSV17. Ainda, o genótipo B-991 foi diferenciado utilizando ambos os sistemas. Isto indica

que estes marcadores se complementam para análise da divergência genética e distinguibilidade em fumo.

2.4 CONCLUSÕES

O germoplasma de *Nicotiana tabacum* L. estudado neste trabalho apresenta moderada similaridade genética, variando de 0,65 a 0,80 de acordo com o marcador molecular utilizado na estimativa.

Marcadores RAPD e AFLP são mais eficientes para avaliar a variabilidade genética do germoplasma de fumo incluído neste estudo e utilizado pelos programas de melhoramento de fumo do Sul do Brasil. Estes diferentes marcadores se complementam na capacidade de distinguir genótipos individuais dentro do germoplasma estudado.

A similaridade genética do grupo de espécies silvestres do gênero *Nicotiana* é significativamente menor àquela estimada para genótipos de *Nicotiana tabacum* L., variando de 0,14 a 0,24 conforme o marcador molecular utilizado na estimativa. Existe evidência para um grande estreitamento de variabilidade do germoplasma cultivado para o silvestre, o que é esperado devido a introgressão através de retrocruzamentos para *N. tabacum*.

Trinta e seis marcadores de RAPD ou AFLP são específicos e permitem identificar e distinguir os genótipos do programa de melhoramento da empresa DIMON dos demais incluídos no estudo.

TABELA 2.1. Genótipos de fumo utilizados no estudo e suas respectivas origens. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Código	Genótipo	Grupo	Tipo	Origem
1	K-326	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
2	K-326NF	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
3	K-149	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
4	RG-08	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
5	C-176	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
6	DM-465	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
7	NC-55	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
8	NC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
9	NC-2326	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
10	GLA-3	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
11	LINC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
12	HINC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
13	MS V17	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
14	V-961	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
15	V-991	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
16	V-201	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
17	TN-86	Galpão	Burlei	Estados Unidos
18	TN-90	Galpão	Burlei	Estados Unidos
19	KY-907	Galpão	Burlei	Estados Unidos
20	KY-14	Galpão	Burlei	Estados Unidos
21	MBN-2	Galpão	Burlei	Japão
22	BY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
23	BY-37	Galpão	Burlei	Estados Unidos
24	BY-64	Galpão	Burlei	Estados Unidos
25	BY Va-509	Galpão	Burlei	Estados Unidos
26	CSC-223	Galpão	Burlei	Souza Cruz – Brasil
27	HIBY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
28	LIBY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
29	LABY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
30	B-972	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
31	B-973	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
32	B-991	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
33	<i>Nicotiana rustica</i>			
34	<i>Nicotiana debneyi</i>			
35	<i>Nicotiana longiflora</i>			
36	<i>Nicotiana alata</i>			

TABELA 2.2 Marcadores RAPD avaliados, número e tamanho de fragmentos em 36 genótipos de fumo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

<i>Primer</i>	Número de fragmentos amplificados			Tamanho (pb)	
	Total	Polimórficos para cultivares	Monomórficos para cultivares		Específicos para silvestres
OPA-8	15	13	0	2	300 – 2100
OPA-9	13	1	4	8	550 – 2000
OPA-13	14	11	2	1	280 – 1500
OPA-17	14	3	5	6	400 – 1700
OPD-2	7	2	3	2	400 – 1400
OPD-3	13	13	0	0	275 – 1400
OPD-6	13	2	5	6	250 – 1800
OPD-20	12	0	5	7	300 – 1500
OPJ-7	15	7	2	6	350 – 1400
OPJ-8	15	7	1	7	500 – 2200
OPN-13	11	9	0	2	400 – 1500
OPN-14	16	5	2	9	400 – 1500
OPN-15	12	4	3	5	400 – 1600
OPN-16	5	3	1	1	800 – 2000
OPN-20	13	2	3	8	325 – 1300
OPU-6	17	4	4	9	350 – 1400
OPU-7	16	0	9	7	350 – 1800
OPU-9	13	3	3	7	400 – 1600
OPU-10	11	1	3	7	400 – 1300
OPU-13	12	2	5	5	500 – 1300
OPU-17	14	14	0	0	400 – 1500
TOTAL	271	106	60	105	
MÉDIA	12,9	5,0	2,9	5,0	
%	100	39,1	22,1	38,8	

TABELA 2.3. Marcadores microssatélites usados no estudo de diversidade genética de 36 genótipos de fumo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

Locos	Seqüência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Número de alelos			Total
		Cultivares	Específicos Silvestres	Polimórficos cultivares	
NTCP3	AAGTCAAAAGAGCGATTAG TGATACATAGTGGGATACAG	2	5	0	7
NTCP6	GGTTCGAATCCTTCCGTC GATTCTTTTCGCATCTCGATTG	1	3	0	4
NTCP7	TGATCCCGGACGTAATCC CGAATCCCTCTCTTTCCG	2	6	0	8
NTCP8	ATATTGTTTTAGCTCGGTGG TCATTGCGCTCCTTTATG	4	0	4	4
NTCP9	CTTCCAAGCTAACGATGC CTGTCCTATCCATTAGACAATG	2	1	2	3
NTCP12	CCTCCATCATCTCTTCCAA ATTTATTTTCAGTTCAGGGTTCC	4	2	4	6
NTCP14	AATCCGTAGCCAGAAAAATAAA CCGATGCATGTAATGGAATC	4	1	4	5
NTCP18	CTGTTCTTTCCATGACCCCTC CCACCTAGCCAAGCCAGA	2	1	2	3
NTCP21	AAAAAGATCCCACAAAGAAAA CTTATCGATTCCGTCAAAAAG	1	1	0	2
NTCP23	CAAAGGAACATTATCAATCATC TAGCTCAGAGTTAGAGCATC	3	1	3	4
NTCP25	TTAGTCAGGTATTTCCATTTT CTTTTCATAGGAATCTTTCACA	2	4	2	6
NTCP26	GCAATTGCAATGGCTTCTTTA TTTATGTTCCGGTGGAAATCACA	4	4	4	8
NTCP27	ATAAATACAGAACCCGTCGTAA TGCTTAGAGTTGGACACAGAAT	4	3	4	7
NTCP30	GATGGCTCCGTTGCTTTAT TGCCGGAGAGTTCTTAACAATA	2	2	2	4
NTCP32	TGTTTCATCTTTTTAGGTTTAT TCAAGCAAAGTTATCTCAAC	2	1	2	3
NTCP34	GATCCATATCAGCATTTCGTAT CTGTTTCTAGTGGGGTATTTGA	2	3	1	5
NTCP38	AATTTTCGAGGTTCTTATTTACT GATTCTGAGCTCTATTCATTAG	3	0	2	3
NTCP39	GTCACAATTGGGGTTTTGAATA GACGATACTGTAGGGGAGGTC	2	2	2	4
Total		46	40	38	86
Média		2,5	2,2	2,1	4,7
%		53,5	46,5	44,2	100

TABELA 2.4. Marcadores AFLP avaliados em 36 genótipos de fumo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

Combinação de primers	Fragmentos amplificados					
	Total		Polimórficos			
	Cultivares	Silvestres	Cultivares	Silvestres	Cultivares e Silvestres	Total
M-CAT + E-AAC	54	75	12	13	2	23
M-CGA + E-AAC	57	42	7	16	3	20
M-CGA + E-ACT	52	21	5	9	0	14
M-CGC + E-ACG	25	36	6	33	3	36
M-CAG + E-ACC	51	39	11	9	0	20
M-CAA + E-AAG	82	52	8	7	0	15
M-CTT + E-AAC	79	69	20	10	0	30
M-CCC + E-ACA	63	66	25	27	1	51
M-CGC + E-ACC	58	42	16	19	0	35
M-CAG + E-ACT	95	92	36	34	5	65
M-CCT + E-ACT	88	57	37	49	4	82
M-CAG + E-ACA	53	57	7	46	0	53
M-CTT + E-ACT	85	36	12	29	1	40
Total	842	684	202	301	15	484
%	55,2	44,8	13,2	19,7	-	31,7
Média	64,8	52,6	15,5	23,1	-	37,2

TABELA 2.5. Marcadores RAPD e AFLP específicos para genótipos do programa DIMON. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

Marcador		Genótipo	Marcador		Genótipo
Primer	Tamanho (pb)		Primer	Tamanho (pb)	
OPA-8	400	V-961	M-CAG+E-ACT	810	V-961
OPA-8	900	B-973	M-CAG+E-ACT	910	B-991
OPA-9	550	MSV17, V-961	M-CCT+E-ACT	260	V-961
OPD-3	1300	B-973, B-991	M-CCT+E-ACT	310	MSV17, V-961
OPJ-8	1200	MSV17	M-CCT+E-ACT	350	V-961
OPN-13	550	MSV17, V-961	M-CCT+E-ACT	370	B-991
OPU-13	870	V-961	M-CCT+E-ACT	395	V-961
M-CAG+E-ACC	270	V-991, V-201	M-CCT+E-ACT	480	V-961
M-CAA+E-AAG	150	MSV17, V-961	M-CCT+E-ACT	530	V-961
M-CTT+E-AAC	350	MSV17	M-CCT+E-ACT	590	B-991
M-CTT+E-AAC	390	MSV17	M-CCT+E-ACT	790	V-961
M-CCC+E-ACA	480	B-991	M-CCT+E-ACT	810	B-991
M-CGC+E-ACC	380	MSV17	M-CAG+E-ACA	395	V-961
M-CAG+E-ACT	300	MSV17	M-CAG+E-ACA	680	V-961
M-CAG+E-ACT	370	MSV17, V-961	M-CTT+E-ACT	270	MSV17
M-CAG+E-ACT	420	B-991	M-CTT+E-ACT	350	MSV17, V-961
M-CAG+E-ACT	590	V-961	M-CTT+E-ACT	380	MSV17
M-CAG+E-ACT	680	MSV17	M-CTT+E-ACT	440	V-961

TABELA 2.6. Similaridade genética média e desvio padrão de genótipos de fumo obtida através de marcadores RAPD, microssatélites e AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

	RAPD	Microssatélites	AFLP
Total	0,68 ± 0,27	0,55 ± 0,39	0,64 ± 0,34
Silvestres	0,24 ± 0,06	0,21 ± 0,06	0,14 ± 0,06
Cultivares	0,74 ± 0,22	0,65 ± 0,40	0,80 ± 0,16
Tipo Virgínia	0,87 ± 0,09	0,61 ± 0,41	0,78 ± 0,21
Tipo Burlei	0,86 ± 0,09	0,66 ± 0,39	0,88 ± 0,07

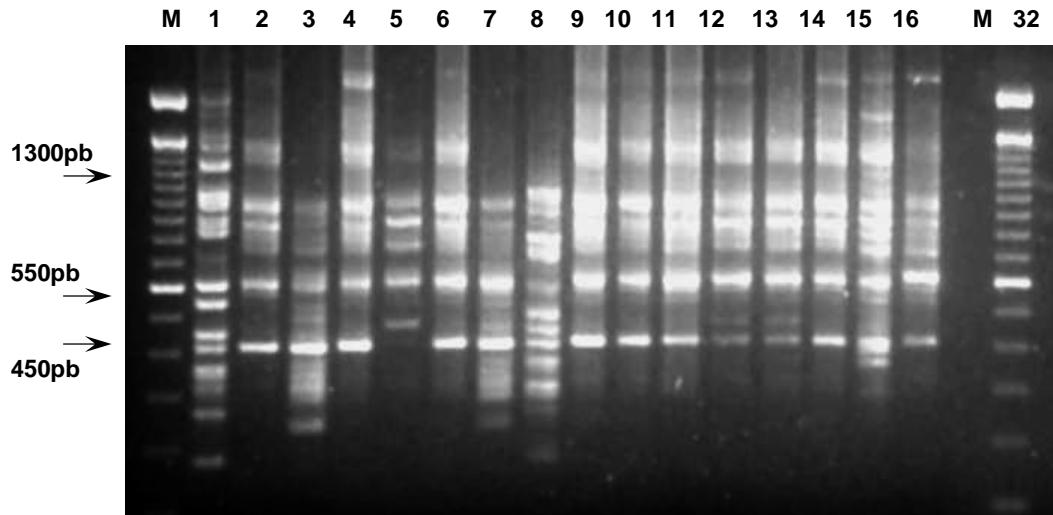


FIGURA 2.1. Marcadores RAPD obtidos pelo *primer* OPA-13 para cultivares tipo Burlei. M: DNA ladder 100 pb; linha 1: TN-86; 2: TN-90; 3: KY-907; 4: KY-14; 5: MBN-2; 6: BY-21; 7: BY-37; 8: BY-64; 9: BYVa-509; 10: CSC-223; 11: HYBY-21; 12: LIBY-21; 13: LABY-21; 14: B-972; 15: B-973; 16: B-991. As flechas indicam os marcadores que diferenciam as linhagens irmãs TN-86 e TN-90. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

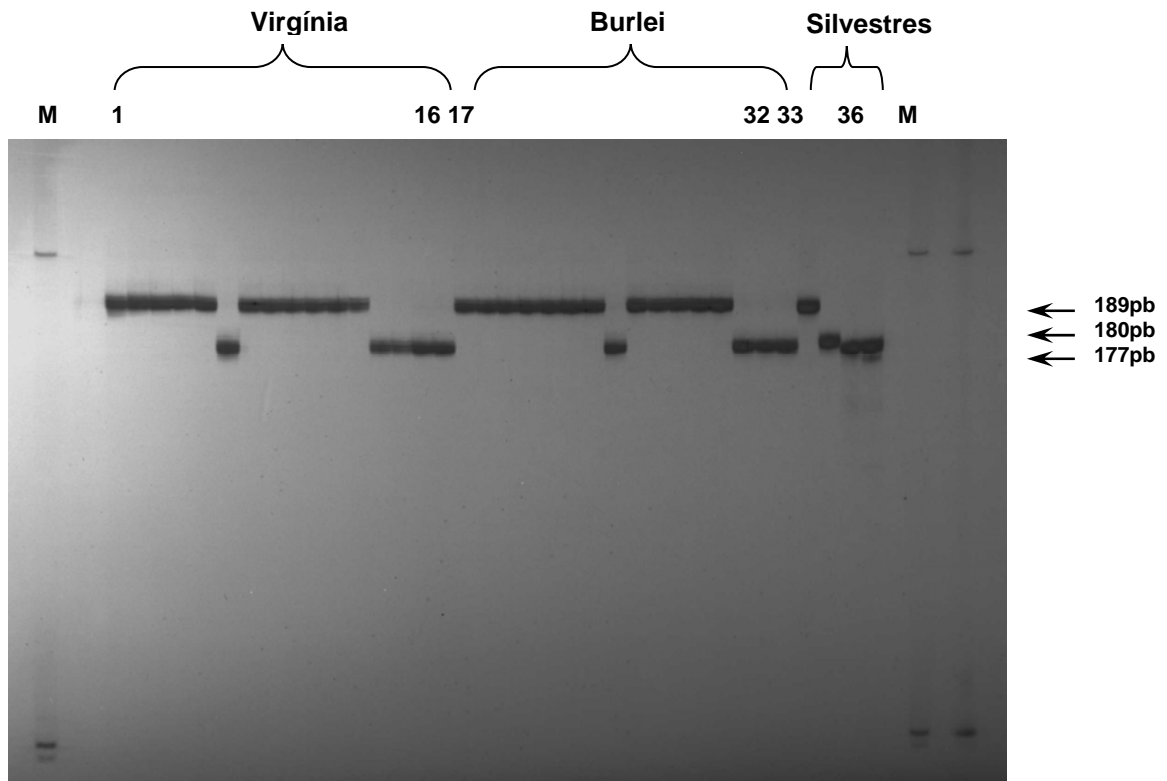


FIGURA 2.2 Padrão de amplificação do loco NTCP18 avaliado em 36 genótipos de fumo. M: DNA ladder 100 pb; linhas 1a 16: cultivares de fumo do tipo Virgínia; linhas 17 a 32: cultivares de fumo do tipo Burlei; linhas 33 a 36: espécies silvestres. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

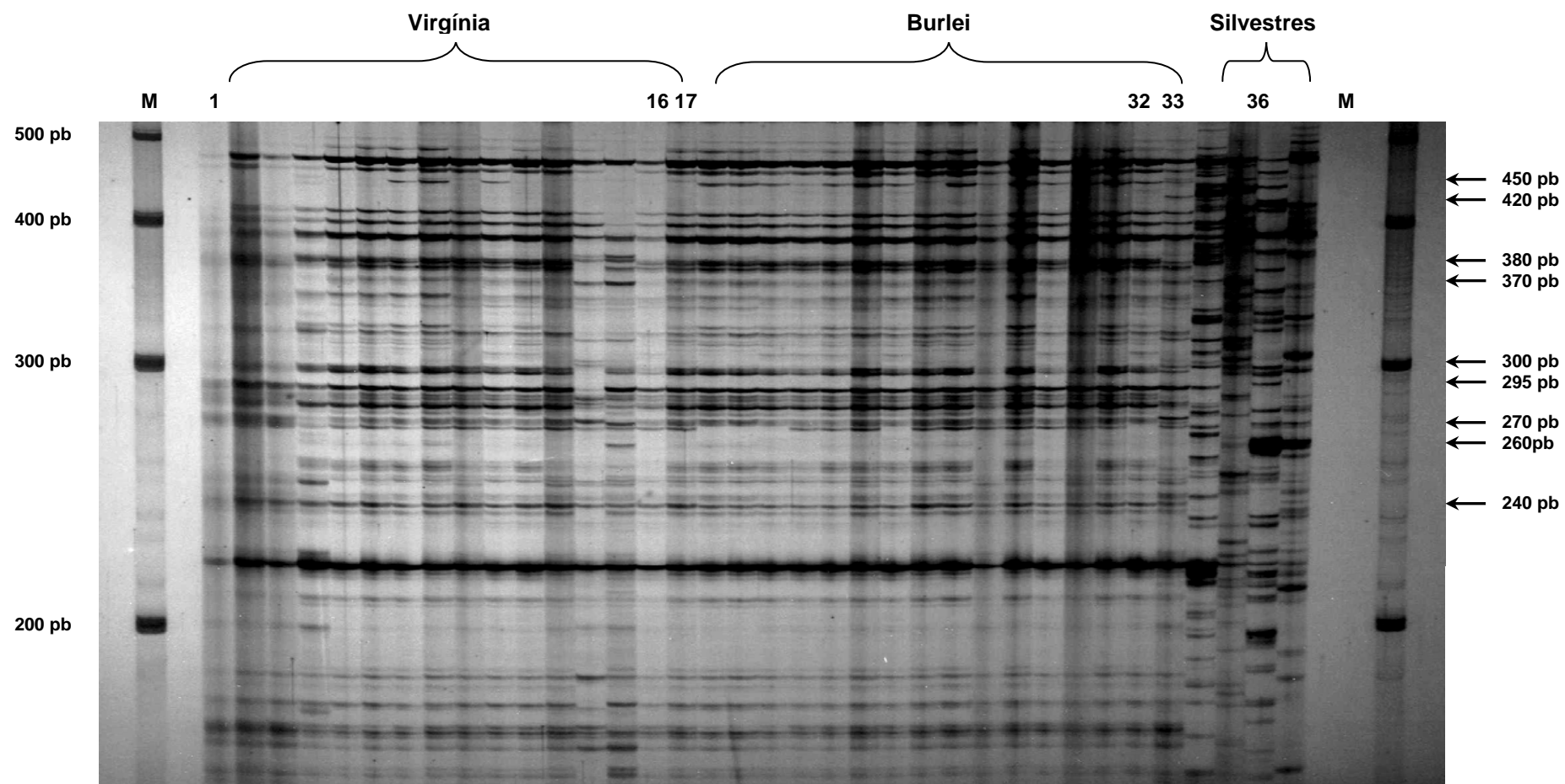


FIGURA 2.3. Padrão de amplificação da combinação de *primers* M-CAG + E-ACT avaliado em 36 genótipos de fumo. M: marcador DNA ladder 100 pb; linhas 1-16: cultivares do tipo Virgínia; linhas 17-32: cultivares do tipo Burlei; linhas 33-36: espécies silvestres de Nicotinas. As flechas indicam marcadores identificados entre os genótipos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

TABELA 2.7. Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada em marcadores RAPD. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
1. K-326																																						
2. K-149b	0,96																																					
3. RG-08	0,97	0,97																																				
4. C-176	0,82	0,82	0,96																																			
5. DM-465	0,96	0,98	0,96	0,81																																		
6. NC-55	0,92	0,95	0,92	0,78	0,96																																	
7. NC-95	0,74	0,75	0,78	0,69	0,77	0,75																																
8. NC-2326	0,95	0,96	0,94	0,82	0,97	0,96	0,79																															
9. K-326LF	0,94	0,95	0,93	0,81	0,96	0,95	0,79	0,97																														
10. GLA-3	0,95	0,96	0,94	0,80	0,97	0,95	0,78	0,98	0,96																													
11. LINC-95	0,93	0,94	0,95	0,82	0,96	0,94	0,80	0,97	0,96	0,95																												
12. HINC-95	0,74	0,74	0,90	0,75	0,74	0,72	0,55	0,74	0,75	0,74	0,72																											
13. MSV17	0,84	0,84	0,88	0,83	0,84	0,84	0,84	0,78	0,84	0,84	0,83	0,83	0,88																									
14. V-961	0,80	0,79	0,84	0,72	0,80	0,80	0,72	0,81	0,80	0,79	0,78	0,77	0,92																									
15. V-991	0,92	0,94	0,92	0,79	0,96	0,97	0,78	0,95	0,94	0,95	0,93	0,75	0,87	0,84																								
16. V-201	0,92	0,94	0,92	0,79	0,96	0,97	0,78	0,95	0,94	0,95	0,93	0,75	0,87	0,84	1,00																							
17. TN-90	0,69	0,68	0,83	0,76	0,66	0,63	0,51	0,68	0,65	0,66	0,65	0,72	0,77	0,60	0,65	0,65																						
18. TN-86	0,84	0,88	0,87	0,76	0,88	0,85	0,65	0,88	0,85	0,87	0,83	0,72	0,77	0,71	0,86	0,86	0,76																					
19. KY-907	0,66	0,67	0,71	0,70	0,67	0,64	0,59	0,67	0,66	0,65	0,62	0,71	0,77	0,65	0,69	0,69	0,71	0,77																				
20. MBN-2	0,84	0,87	0,86	0,75	0,87	0,84	0,64	0,87	0,84	0,86	0,83	0,72	0,76	0,71	0,86	0,86	0,75	0,99	0,77																			
21. BY-21	0,79	0,82	0,83	0,76	0,81	0,79	0,67	0,82	0,83	0,80	0,78	0,74	0,76	0,70	0,82	0,82	0,74	0,93	0,81	0,94																		
22. BY-37	0,82	0,85	0,85	0,77	0,85	0,82	0,65	0,85	0,82	0,84	0,80	0,74	0,76	0,71	0,84	0,84	0,77	0,97	0,79	0,98	0,93																	
23. BY-64	0,77	0,78	0,86	0,79	0,77	0,74	0,63	0,78	0,76	0,76	0,74	0,68	0,77	0,66	0,76	0,76	0,76	0,87	0,86	0,88	0,89	0,88																
24. CSC-223	0,69	0,69	0,82	0,75	0,67	0,68	0,55	0,69	0,67	0,68	0,65	0,73	0,77	0,63	0,71	0,71	0,78	0,75	0,74	0,76	0,78	0,76	0,76															
25. HIBY-21	0,83	0,87	0,85	0,76	0,86	0,84	0,64	0,86	0,84	0,85	0,82	0,72	0,76	0,70	0,85	0,85	0,76	0,98	0,78	0,99	0,93	0,98	0,88	0,75														
26. LIBY-21	0,82	0,86	0,84	0,75	0,85	0,85	0,63	0,86	0,84	0,86	0,82	0,72	0,76	0,70	0,85	0,85	0,75	0,98	0,77	0,99	0,93	0,98	0,88	0,74	1,00													
27. LABY-21	0,86	0,89	0,85	0,76	0,89	0,86	0,67	0,88	0,86	0,89	0,84	0,79	0,76	0,72	0,87	0,87	0,80	0,98	0,79	0,99	0,93	0,99	0,90	0,78	1,00	1,00												
28. BYVA-509	0,83	0,85	0,87	0,75	0,86	0,84	0,65	0,86	0,84	0,85	0,82	0,72	0,76	0,70	0,85	0,85	0,76	0,97	0,78	0,98	0,91	0,95	0,90	0,77	0,97	0,97	0,97											
29. KY-14	0,83	0,86	0,87	0,75	0,87	0,84	0,65	0,86	0,84	0,86	0,82	0,70	0,76	0,71	0,85	0,85	0,74	0,98	0,77	0,98	0,92	0,96	0,89	0,75	0,98	0,97	0,97	0,99										
30. B-972	0,83	0,85	0,85	0,73	0,86	0,86	0,66	0,86	0,84	0,86	0,82	0,71	0,78	0,73	0,88	0,88	0,73	0,97	0,79	0,98	0,93	0,95	0,87	0,77	0,97	0,97	0,97	0,98										
31. B-973	0,73	0,74	0,80	0,78	0,73	0,73	0,59	0,75	0,72	0,74	0,71	0,70	0,77	0,69	0,75	0,75	0,82	0,80	0,75	0,81	0,81	0,83	0,78	0,77	0,82	0,81	0,86	0,79	0,79	0,82								
32. B-991	0,74	0,74	0,82	0,73	0,73	0,72	0,59	0,74	0,72	0,72	0,69	0,72	0,76	0,72	0,74	0,74	0,77	0,84	0,78	0,85	0,86	0,85	0,82	0,77	0,85	0,85	0,86	0,83	0,83	0,86	0,81							
33. <i>N.rustica</i>	0,19	0,19	0,20	0,20	0,19	0,16	0,20	0,18	0,17	0,18	0,20	0,24	0,19	0,18	0,17	0,17	0,22	0,20	0,20	0,19	0,19	0,20	0,20	0,19	0,19	0,17	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20		
34. <i>N.debneyi</i>	0,18	0,17	0,19	0,19	0,17	0,16	0,18	0,16	0,18	0,16	0,18	0,21	0,20	0,19	0,18	0,18	0,20	0,19	0,20	0,19	0,19	0,20	0,21	0,21	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,22	0,16	
35. <i>N.longiflora</i>	0,20	0,20	0,22	0,22	0,20	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,20	0,19	0,20	0,18	0,19	0,19	0,20	0,18	0,20	0,17	0,17	0,18	0,19	0,18	0,18	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,25	0,34
36. <i>N.alata</i>	0,16	0,15	0,17	0,17	0,16	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,16	0,15	0,14	0,15	0,15	0,18	0,16	0,17	0,16	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,14	0,17	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,23	0,19	0,28	

TABELA 2.8. Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada em marcadores microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
1. K-326																																							
2. K-149b	0,96																																						
3. RG-08	1,00	0,96																																					
4. C-176	1,00	0,96	1,00																																				
5. DM-465	1,00	0,96	1,00	1,00																																			
6. NC-55	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18																																		
7. NC-95	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18																																	
8. NC-2326	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,17	0,96																																
9. K-326LF	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96																															
10. GLA-3	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96	1,00																														
11. LINC-95	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96	1,00	1,00																													
12. HINC-95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,16	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00																												
13. MSV17	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,96	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,16																											
14. V-961	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,96	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,16	1,00																										
15. V-991	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	1,00	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	0,16	0,96	0,96																									
16. V-201	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	1,00	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	0,16	0,96	0,96	1,00																								
17. TN-90	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,17	0,17	0,18	0,18																							
18. TN-86	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,17	0,17	0,18	0,18	1,00																						
19. KY-907	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,17	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,17	0,17	0,96	0,96																					
20. MBN-2	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,17	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,17	0,17	0,96	0,96	1,00																				
21. BY-21	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,17	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,17	0,17	0,96	0,96	1,00	1,00																			
22. BY-37	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,17	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,17	0,17	0,96	0,96	1,00	1,00	1,00																		
23. BY-64	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,17	0,17	0,18	0,18	1,00	1,00	0,96	0,96	0,96	0,96																	
24. CSC-223	0,16	0,19	0,16	0,16	0,16	0,96	0,16	0,19	0,16	0,16	0,16	0,15	1,00	1,00	0,96	0,96	0,16	0,16	0,19	0,19	0,19	0,19	0,16																
25. HIBY-21	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,18	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,18	0,18	0,96	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,20															
26. LIBY-21	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,18	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,17	0,17	0,18	0,18	1,00	1,00	0,96	0,96	0,96	0,96	1,00	0,16	0,96														
27. LABY-21	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,17	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,17	0,17	0,96	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,19	1,00	0,96													
28. BYVA-509	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,18	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,18	0,18	0,96	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,20	1,00	0,96	1,00												
29. KY-14	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	0,18	0,96	1,00	0,96	0,96	0,96	1,00	0,20	0,20	0,18	0,18	0,96	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,20	1,00	0,96	1,00	1,00											
30. B-972	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,96	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,16	1,00	1,00	0,96	0,96	0,17	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,17	1,00	0,20	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
31. B-973	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,96	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,16	1,00	1,00	0,96	0,96	0,17	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,17	1,00	0,20	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
32. B-991	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,96	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17	0,16	1,00	1,00	0,96	0,96	0,17	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,17	1,00	0,20	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	
33. <i>N.rustica</i>	0,23	0,22	0,23	0,23	0,23	0,15	0,23	0,22	0,23	0,23	0,23	0,24	0,15	0,15	0,15	0,15	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	0,23	0,14	0,23	0,23	0,22	0,23	0,23	0,15	0,15	0,15								
34. <i>N.debneyi</i>	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,11	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,31	0,10	0,10	0,11	0,11	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,09	0,30	0,29	0,29	0,30	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,13				
35. <i>N.longiflora</i>	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,19	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,19	0,19	0,19	0,19	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,19	0,19	0,19	0,21	0,21				
36. <i>N.alata</i>	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,27	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,27	0,27	0,27	0,27	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,26	0,21	0,23	0,23	0,21	0,21	0,27	0,27	0,27	0,21	0,17	0,32				

TABELA 2.9. Similaridade genética entre os genótipos de fumo baseada em marcadores AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
1. K-326																																							
2. K-149b	0,96																																						
3. RG-08	0,97	0,96																																					
4. C-176	0,97	0,94	0,94																																				
5. DM-465	0,93	0,91	0,91	0,94																																			
6. NC-55	0,93	0,92	0,91	0,93	0,92																																		
7. NC-95	0,83	0,86	0,83	0,83	0,86	0,88																																	
8. NC-2326	0,86	0,85	0,84	0,86	0,87	0,89	0,92																																
9. K-326LF	0,93	0,94	0,93	0,94	0,91	0,93	0,85	0,87																															
10. GLA-3	0,89	0,89	0,89	0,88	0,89	0,87	0,86	0,85	0,89																														
11. LINC-95	0,90	0,89	0,88	0,89	0,92	0,90	0,82	0,83	0,91	0,91																													
12. HINC-95	0,91	0,92	0,90	0,91	0,89	0,90	0,83	0,85	0,95	0,86	0,91																												
13. MSV17	0,35	0,36	0,35	0,35	0,31	0,36	0,32	0,34	0,36	0,30	0,32	0,35																											
14. V-961	0,54	0,53	0,52	0,54	0,50	0,52	0,48	0,50	0,53	0,46	0,49	0,51	0,23																										
15. V-991	0,93	0,89	0,89	0,90	0,88	0,91	0,79	0,82	0,89	0,85	0,90	0,88	0,35	0,51																									
16. V-201	0,92	0,91	0,90	0,91	0,90	0,95	0,83	0,88	0,93	0,85	0,90	0,92	0,36	0,52	0,93																								
17. TN-90	0,82	0,82	0,81	0,81	0,83	0,84	0,83	0,87	0,82	0,81	0,81	0,79	0,32	0,49	0,81	0,83																							
18. TN-86	0,82	0,81	0,80	0,80	0,83	0,85	0,82	0,86	0,81	0,82	0,83	0,79	0,33	0,48	0,81	0,84	0,94																						
19. KY-907	0,84	0,81	0,82	0,82	0,83	0,81	0,78	0,79	0,80	0,87	0,83	0,78	0,29	0,47	0,83	0,80	0,89	0,90																					
20. MBN-2	0,87	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,79	0,80	0,83	0,89	0,87	0,81	0,29	0,48	0,85	0,84	0,86	0,88	0,96																				
21. BY-21	0,86	0,84	0,84	0,84	0,85	0,84	0,80	0,82	0,82	0,87	0,85	0,81	0,31	0,48	0,84	0,83	0,88	0,89	0,94	0,97																			
22. BY-37	0,87	0,83	0,84	0,85	0,85	0,88	0,81	0,87	0,86	0,85	0,83	0,83	0,34	0,49	0,86	0,87	0,89	0,91	0,92	0,92	0,94																		
23. BY-64	0,85	0,81	0,83	0,84	0,83	0,84	0,76	0,80	0,81	0,83	0,82	0,79	0,31	0,49	0,83	0,81	0,90	0,90	0,95	0,93	0,92	0,92																	
24. CSC-223	0,85	0,87	0,85	0,87	0,86	0,90	0,80	0,87	0,86	0,80	0,83	0,85	0,34	0,52	0,82	0,88	0,86	0,84	0,82	0,85	0,86	0,86	0,84																
25. HIBY-21	0,81	0,82	0,80	0,82	0,81	0,86	0,84	0,89	0,83	0,79	0,78	0,81	0,33	0,50	0,77	0,83	0,88	0,89	0,85	0,86	0,88	0,89	0,86	0,92															
26. LIBY-21	0,85	0,85	0,84	0,84	0,81	0,85	0,80	0,84	0,83	0,84	0,81	0,81	0,33	0,50	0,80	0,82	0,85	0,86	0,89	0,91	0,91	0,90	0,89	0,87	0,90														
27. LABY-21	0,88	0,87	0,86	0,88	0,88	0,88	0,87	0,91	0,87	0,84	0,84	0,84	0,33	0,52	0,82	0,88	0,92	0,93	0,90	0,90	0,91	0,93	0,90	0,93	0,90	0,93	0,96	0,94											
28. BYVA-509	0,86	0,84	0,83	0,84	0,83	0,86	0,82	0,85	0,83	0,87	0,85	0,81	0,32	0,50	0,86	0,84	0,88	0,91	0,93	0,95	0,95	0,94	0,93	0,85	0,89	0,94	0,93												
29. KY-14	0,89	0,86	0,86	0,87	0,85	0,88	0,83	0,88	0,87	0,86	0,84	0,86	0,34	0,51	0,84	0,86	0,87	0,87	0,89	0,90	0,91	0,92	0,88	0,87	0,89	0,91	0,93	0,94											
30. B-972	0,86	0,84	0,83	0,85	0,83	0,84	0,81	0,85	0,84	0,84	0,83	0,83	0,35	0,52	0,84	0,85	0,90	0,92	0,94	0,92	0,93	0,94	0,93	0,85	0,90	0,91	0,96	0,95	0,94										
31. B-973	0,82	0,81	0,81	0,81	0,81	0,80	0,77	0,79	0,79	0,83	0,82	0,77	0,29	0,47	0,81	0,80	0,88	0,90	0,94	0,91	0,91	0,88	0,92	0,81	0,85	0,87	0,89	0,92	0,88	0,94									
32. B-991	0,66	0,67	0,66	0,67	0,65	0,66	0,65	0,68	0,65	0,64	0,62	0,62	0,28	0,41	0,61	0,65	0,69	0,70	0,69	0,69	0,69	0,71	0,70	0,72	0,74	0,73	0,74	0,70	0,71	0,73	0,72								
33. <i>N.rustica</i>	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,05	0,07	0,04	0,07	0,07	0,07	0,07	0,04	0,04	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,05			
34. <i>N.debneyi</i>	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,03	0,14		
35. <i>N.longiflora</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,08	0,14
36. <i>N.alata</i>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,12	0,12	0,25	

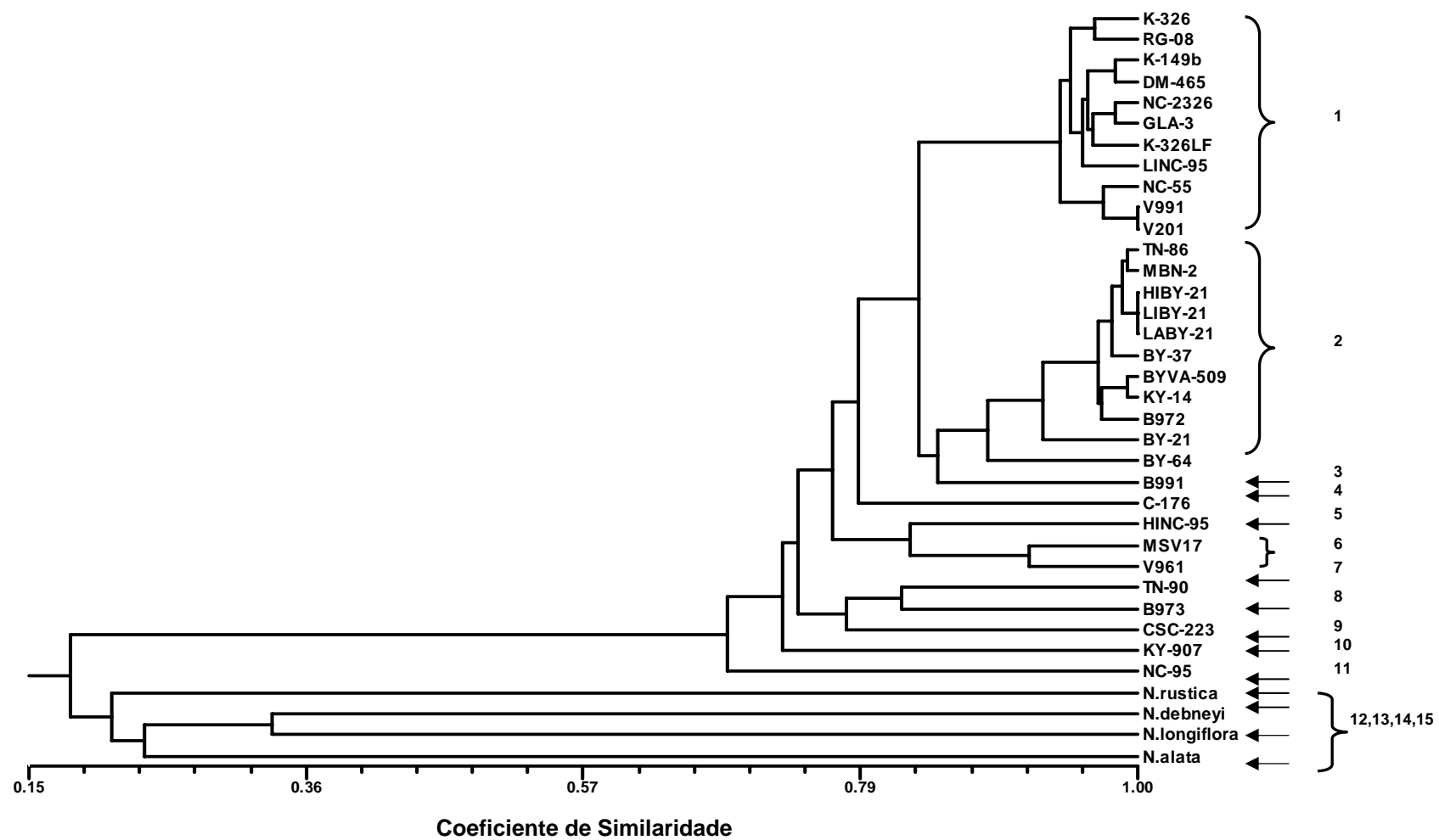


FIGURA 2.4. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores RAPD. A SG média de genótipos tipo Burlei ($0,86 \pm 0,09$) foi utilizada para a separação dos grupos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

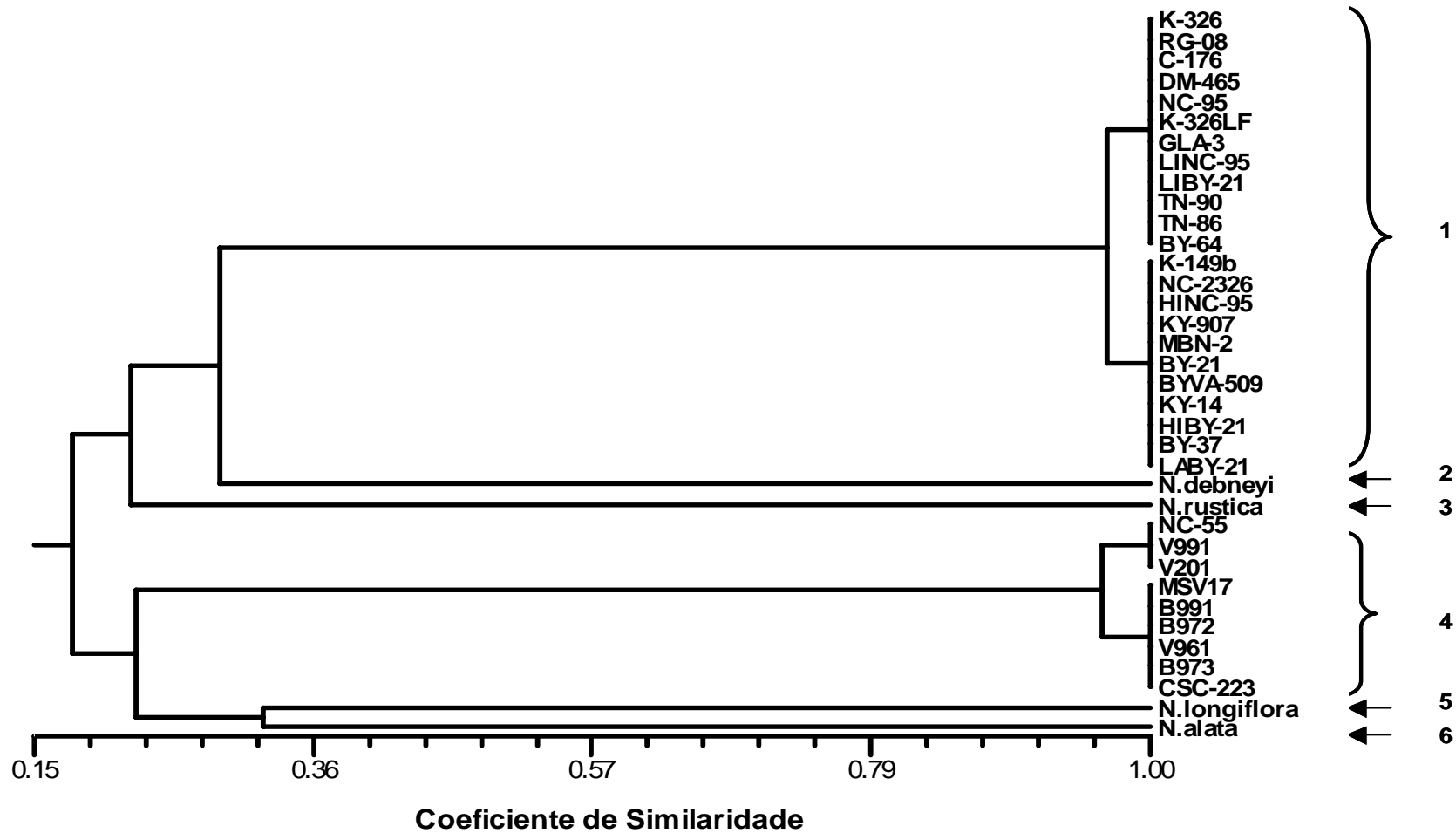


FIGURA 2.5. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores microsatélites. A SG média de genótipos tipo Burlei ($0,66 \pm 0,39$) foi utilizada para a separação dos grupos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

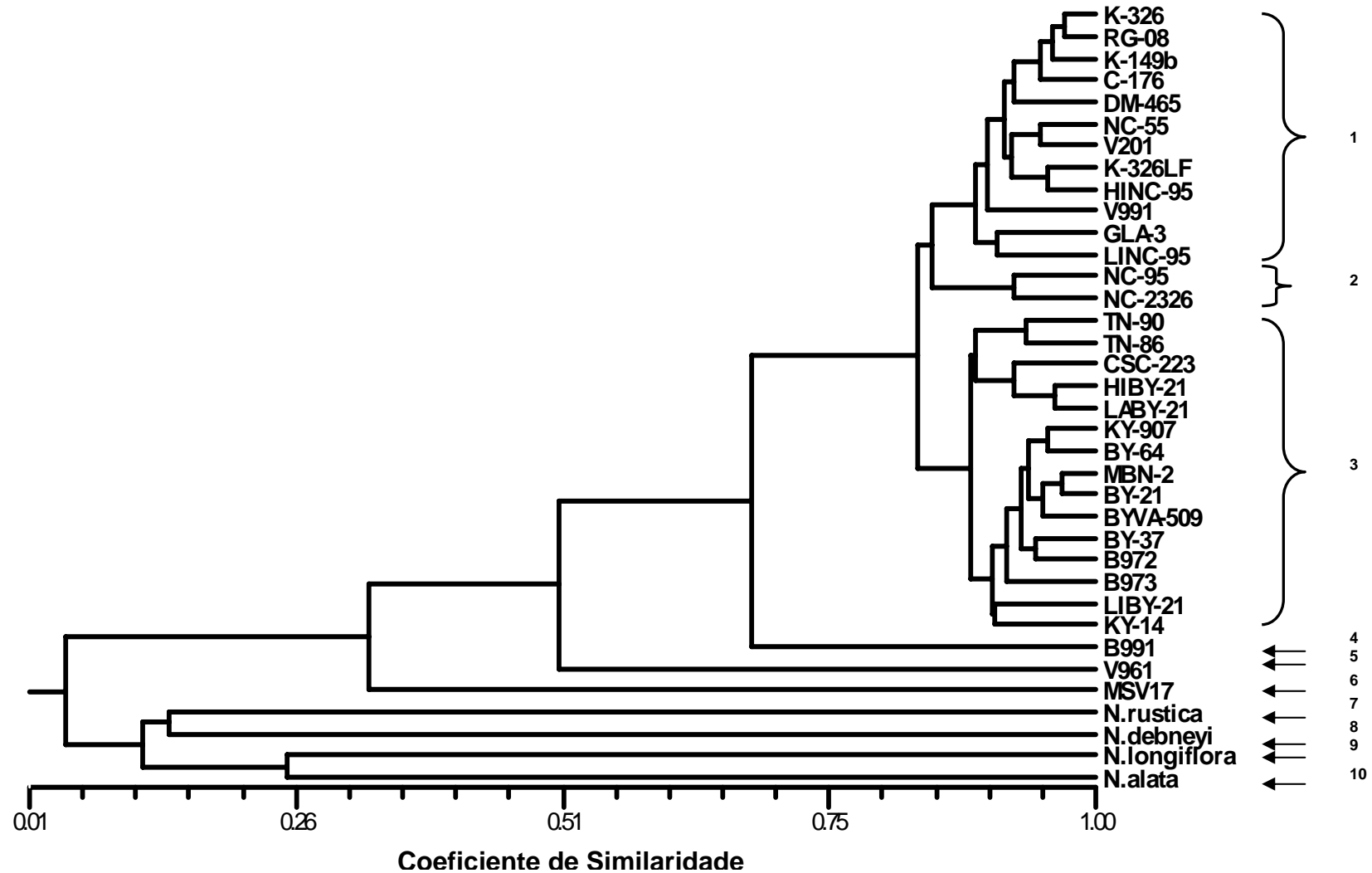


FIGURA 2.6. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores AFLP. A SG média de genótipos tipo Burlei ($0,88 \pm 0,07$) foi utilizada para a separação dos grupos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

CAPÍTULO III

Comparação entre marcadores fenotípicos e moleculares na estimativa de variabilidade genética no germoplasma de fumo utilizado pelos programas de melhoramento no Sul do Brasil

3.1. INTRODUÇÃO

A variabilidade genética nos caracteres desejáveis é essencial para o progresso genético em um programa de melhoramento. Os meios mais utilizados para gerar variabilidade são a introdução de germoplasma e a recombinação gênica. A demanda por cultivares com elevado rendimento e por um produto final uniforme e de alta qualidade tem restringido o uso de germoplasma nos programas de melhoramento de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). No entanto, a variabilidade encontrada dentro das populações resultantes de cruzamentos entre cultivares modernos de fumo ainda é elevada (Wernsman & Rufty, 1987). Além disso, os ganhos genéticos têm sido suficientes para encorajar o contínuo melhoramento dentro de um grupo gênico estreito.

A caracterização da variabilidade genética e a estimativa do relacionamento genético entre genótipos são fundamentais para o conhecimento do germoplasma disponível e planejamento dos programas de melhoramento de fumo. O conhecimento dos genótipos permite a escolha de genitores visando a

ampliação da variância genética nas populações segregantes. O grau de relacionamento genético entre os genótipos pode ser estimado através de dados de genealogia, características morfológicas e marcadores de DNA (Melchinger et al., 1994).

Características fenotípicas têm sido utilizadas para avaliar a diversidade genética no fumo (Suen et al., 1997; Wang et al., 2001; Torrecila, 2001). As principais limitações do uso desta metodologia para a caracterização de germoplasma são os efeitos do ambiente, a ação gênica, a epistasia e a pleiotropia, que podem dificultar a avaliação.

Durante a última década, marcadores de DNA, que permitem a identificação direta do genótipo, sem a influência do ambiente (Milach, 1998), têm sido utilizados com sucesso em estudos de diversidade genética em diferentes espécies (Cao & Oard, 1997; Cao et al., 1998; Schut et al., 1997; Sun et al., 2001). Estes marcadores também têm sido empregados em estudos de diversidade genética em fumo (Coussirat, 1994; Del Piano et al., 1998; Rossi et al., 1999; Ren & Timko, 2001), porém o nível de polimorfismo encontrado é geralmente baixo quando comparado com outras espécies.

Em trabalho recente, foi estimado o grau de similaridade genética entre genótipos de fumo de diferentes origens, através de caracteres fenotípicos (Capítulo I) e marcadores moleculares (Capítulo II). A inclusão de outras espécies do gênero *Nicotiana* nestes estudos, evidenciou a grande distância genética entre os grupos cultivado e selvagem, resultando em distintos índices médios de similaridade genética entre esses dois grupos.

Para o melhoramento de *Nicotiana tabacum* L. é importante determinar a similaridade genética dentro do grupo gênico de maior utilização, ou seja para

genótipos cultivados. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar o relacionamento genético entre genótipos cultivados de fumo através de diferentes estimadores e comparar características fenotípicas e marcadores moleculares do tipo RAPD e AFLP quanto à capacidade de estimar o grau de similaridade genética e distinguir genótipos individuais no germoplasma de fumo utilizado pelos programas de melhoramento do Sul do Brasil.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram avaliados trinta e dois genótipos de fumo (Tabela 3.1), incluindo oito cultivares do Programa de Melhoramento Genético da DIMON do Brasil Tabacos Ltda. e outros vinte e quatro cultivares de diferentes procedências e instituições. A escolha foi baseada na importância para o grupo gênico de fumo brasileiro. Do total de genótipos avaliados, dezesseis pertencem ao grupo Estufa tipo Virgínia e dezesseis pertencem ao grupo Galpão tipo Burlei.

Caracteres fenotípicos

Duas linhas de cada genótipo foram transplantadas no ano de 2000, na Estação Experimental da DIMON em Vera Cruz, Rio Grande do Sul, Brasil. Trinta e dois caracteres fenotípicos foram avaliados em plantas individuais e analisados conforme definido pelo SINDIFUMO (Sindicato das Indústrias do Fumo – Sub Comissão de Sementes), com base na descrição recomendada pela UPOV (*Union pour la Protection des Obtentions Variétales*) e nas Legislações Americana

e Italiana. Esses caracteres estão em estudo para proposta ao Ministério da Agricultura como descritores mínimos do fumo.

Os seguintes caracteres quantitativos foram analisados individualmente e as médias foram utilizadas para análise estatística (SAS), sendo submetidas ao teste de Duncan: estatura; dias até o florescimento; diâmetro médio do caule; índice cilíndrico; comprimento dos internódios; número de folhas por planta; largura e comprimento da terceira folha; largura, comprimento e ângulo de inserção da décima folha.

Os genótipos foram agrupados em classes para os caracteres qualitativos: forma das plantas; coloração do caule; presença de brotos basais; forma das folhas basais e medianas centrais; coloração das folhas; curvatura da ponta da lâmina foliar; superfície da lâmina foliar; perfil transversal da décima folha; disposição das nervuras secundárias; margem e ponta da lâmina foliar; formato da aurícula; forma da inflorescência; tipo de flor; tamanho do cálice e da corola; cor da corola; formato do limbo da corola; tipo de deiscência do fruto e formato da cápsula. Tanto para caracteres quantitativos como qualitativos, as classes foram definidas pelo SINDIFUMO. Os caracteres quantitativos que não apresentavam classes definidas, foram agrupados em classes de até um desvio padrão ao redor da média de cada caráter. Os valores de presença e ausência de cada classe dos caracteres morfológicos foram utilizados para gerar uma matriz de similaridade baseada no coeficiente Simple Matching. Os genótipos foram agrupados utilizando o modelo hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), sendo gerado um dendograma a partir dos resultados obtidos, através do módulo SAHN. Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico NTSYS- pc (Rohlf, 2000).

Extração de DNA

Os genótipos foram semeados em bandejas no sistema *floating* em casa de vegetação e a coleta de folhas verdes foi realizada no estádio de plântula. A extração de DNA foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Murray & Thompson (1980), com modificações, e quantificado em espectrofotômetro.

Análise de RAPD

As reações de RAPD foram conduzidas conforme descrito por Williams et al. (1990), com modificações, e preparadas para um volume final de 13µl com os seguintes componentes: 20ng de DNA, 0,8 mM DNTPmix; 2,5 mM de MgCl₂; tampão da enzima *Taq* polimerase (20 mM Tris-HCl e 50 mM KCl); 25ng primer; 1U *Taq* DNA polimerase. Os *primers* utilizados neste estudo foram oligonucleotídeos decâmeros da OPERON Technologies. As amplificações foram realizadas em Termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Inc.). Cada reação consistiu de 4 minutos a 94°C seguido de 41 ciclos de 1 minuto a 92°C (desnaturação), 1 minuto a 35°C (anelamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), e finalmente, uma extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos RAPD foram separados por eletroforese usando gel de agarose 1,6% em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio, visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

Inicialmente, 136 *primers* foram avaliados usando-se seis genótipos. Destes, foram selecionados 19 por apresentarem polimorfismo e padrão de bandas adequado para análise da divergência genética entre os demais genótipos. Os dados foram analisados com base na presença (1) ou ausência (0)

dos produtos amplificados. O módulo SIMQUAL do programa NTSYS-pc (Rohlf, 2000) foi utilizado para estimar o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os genótipos foram agrupados utilizando o método UPGMA e, a partir dos resultados obtidos, foi gerado um dendograma.

Análise de AFLP

As análises AFLP (Zabeau, 1993; Vos et al., 1995) foram conduzidas conforme o protocolo descrito para cevada (Agriculture and Agri-Food Canada, 1997), com modificações. Utilizou-se 250ng de DNA da solução estoque para digestão com as enzimas *EcoRI* e *MseI*. Os fragmentos da restrição foram ligados a adaptadores específicos das respectivas enzimas, utilizando a enzima T4 ligase, a 20°C por 2 horas. Para a pré-amplificação, utilizou-se 5ng do DNA ligado e *primers* com seqüências específicas complementares aos adaptadores, com um nucleotídeo seletivo, e submetidos a 20 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos (1:2,5) em água e usados para amplificação seletiva. As reações seletivas foram preparadas para um volume final de 20µl com os seguintes componentes: 5µ do DNA da pré amplificação (1:2,5), 0,8 mM de DNTPmix; 1,5 mM de MgCl₂ ; tampão da enzima *Taq* polimerase (40 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 100 mM KCl); 30ng de cada primer *EcoRI* e *MseI* contendo 3 nucleotídeos arbitrários seletivos; 1U *Taq* DNA polimerase; e 8,6µl de água estéril. As amplificações seletivas foram realizadas em Termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Inc.). Cada reação consistiu de 94°C por 60 segundos; 65°C-56°C por 60 segundos (menos 1°C a cada ciclo); 72°C por 90 segundos, seguido por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos.

As amostras foram previamente desnaturadas em PCR a 94°C por 10 minutos e os produtos da amplificação foram separados em gel de polyacrilamida 6% durante 2,5 horas em cuba vertical, corados com nitrato de prata e as imagens dos géis foram capturadas utilizando Scanner.

Vinte e três combinações de *primers* foram avaliadas, sendo 13 delas selecionadas por apresentarem polimorfismo e padrão de bandas adequado para análise da divergência genética entre os genótipos. Os dados foram analisados com base na presença (1) ou ausência (0) dos produtos amplificados. O módulo SIMQUAL do programa NTSYS-pc (Rohlf, 2000) foi utilizado para estimar o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os genótipos foram agrupados utilizando o método UPGMA e, a partir dos resultados obtidos, foi gerado um dendograma.

Comparação de matrizes

As correlações entre as matrizes de similaridade de caracteres morfológicos, marcadores RAPD e AFLP foram realizadas utilizando o teste de Mantel (1967), o qual assume que as matrizes foram obtidas independentemente. Através do teste, foi calculado um valor de correlação (r) que estimou o relacionamento entre duas matrizes, e obteve-se um diagrama. Um valor de correlação (r) maior do que 0.5 será estatisticamente significativo ao nível de 0.01 de probabilidade, se o número de unidades observadas exceder 15 (Tatineni et al., 1996). Para a comparação, utilizou-se o módulo MXCOMP do programa computacional NTSYS versão 2.1 (Rohlf, 2000).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes estimativas de similaridade serão relatadas individualmente e, a seguir, uma análise comparativa será discutida.

Caracteres fenotípicos

A similaridade genética (SG) média entre os genótipos foi 0,68 (Tabela 3.2), variando de 0,42 a 1,0. Considerando os genótipos dentro de seus respectivos tipos, as estimativas de SG média não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste t.

O agrupamento dos genótipos baseado no coeficiente de similaridade revelou a formação de dois grupos principais, correspondendo ao tipo de fumo, e nove subgrupos (Figura 3.1). Para a definição dos subgrupos, utilizou-se a SG média do tipo Virgínia, que agrupou os genótipos de acordo com características importantes para o melhoramento. O grupo tipo Virgínia foi constituído de 3 subgrupos e o grupo tipo Burlei de 6 subgrupos. O subgrupo 1 caracterizou-se por apresentar genótipos com a 3ª folha estreita e o subgrupo 2 com largura mediana. O cultivar K-326 LF agrupou isoladamente no subgrupo 3, devido a maior estatura e número de folhas, menor largura da 10ª folha e forma das folhas basais e medianas centrais distintas das demais cultivares. O subgrupo 4 foi constituído apenas pelo cultivar KY-14 que se diferencia dos demais cultivares do tipo Burlei pela coloração das folhas verde normal e disposição intermediária das nervuras secundárias. O subgrupo 5 foi constituído de genótipos com a 10ª folha larga e o subgrupo 6 por genótipos com número de folhas bastante numeroso. O cultivar CSC-223 agrupou isoladamente no subgrupo 7, com curvatura da ponta da lâmina foliar côncava. O subgrupo 8 caracterizou-se por apresentar genótipos

com ângulo aberto de inserção da 10ª folha e 3ª folha estreita. O cultivar HIBY-21 agrupou isoladamente no subgrupo 9, diferenciando-se dos demais genótipos pela superfície ligeiramente enrugada da lâmina foliar.

Análise de RAPD

Dos 136 *primers* usados para avaliar seis amostras, 28 não produziram amplificações, 35 produziram amplificações fracas, 54 apresentaram-se monomórficos, restando apenas 19 que produziram bandas avaliáveis e foram polimórficos entre cultivares. Estes 19 *primers* foram usados na análise dos dados e amplificaram de quatro a quatorze fragmentos avaliáveis (média de oito por *primer*), variando em tamanho de 275 a 2200 pb. Um total de 152 fragmentos foram avaliados, dos quais 106 (69,7%) foram polimórficos entre cultivares.

A SG média para todos os possíveis pares de genótipos foi 0,79 (Tabela 3.2), variando de 0,49 a 1,0. Os valores de SG média obtidos por marcadores RAPD foram de 0,85 para ambos os tipos de fumo.

O dendograma obtido com marcadores RAPD (Figura 3.2) separou os genótipos em 11 grupos distintos, utilizando a SG média para os tipos de fumo. O grupo 1 foi constituído de genótipos tipo Virgínia de origem americana e brasileira, apresentando elevada similaridade e parentesco. O grupo 2 foi formado por genótipos tipo Burlei de origem norte americana, com exceção do B-972 do programa DIMON. Destes, apenas o genótipo BY-64 apresenta maior diversidade genética. Os grupos 3 e 8 foram constituídos de híbridos de Burlei do programa DIMON, com características de qualidade e resistência a diversas moléstias. A constituição dos grupos 4, 5 e 11 foi de genótipos americanos do tipo Virgínia, apresentando elevada tolerância à murcha bacteriana e resistência ao mosaico

(C-176). O grupo 6 foi formado por genótipos da DIMON com semelhanças fenotípicas e parentesco. O genótipo TN-90, que apresenta resistência a viroses, formou o grupo 7, diferenciando-se de TN-86, com mesma genealogia. O grupo 9 foi constituído por um genótipo Burlei da Souza Cruz e o grupo 10 por um genótipo Burlei norte americano, ambos com diferenças na morfologia.

Análise de AFLP

Treze combinações de *primers* produziram 842 fragmentos de DNA amplificados entre os 32 genótipos avaliados, sendo 202 (24%) polimórficos. O número de fragmentos polimórficos entre genótipos variou de 5 a 37, com média de 15,5 por *primer*.

A SG média para os genótipos foi 0,78 (Tabela 3.2), variando de 0,21 a 0,97. Com marcadores AFLP, não houve diferença significativa entre as estimativas de SG para genótipos do tipo Virgínia e Burlei, ao nível de 5% pelo teste t.

O dendograma, baseado em marcadores AFLP, separou os genótipos em 9 grupos distintos (Figura 3.3), utilizando a SG média para Burlei. O grupo 1 foi constituído por 11 genótipos do tipo Virgínia, com semelhanças fenotípicas e parentesco. Destes, oito são de origem americana e três do programa DIMON. O genótipo americano GLA-3, que apresenta baixo teor de alcalóides, formou o grupo 2. Os genótipos NC-95 e NC-2326, aprovados na década de 60 e que possuem em comum o genitor Hicks na genealogia, além de serem considerados padrões de qualidade, formaram o grupo 3. O grupo 4 foi constituído pelos genótipos TN-90 e TN-86, com mesma genealogia. O grupo 5 foi formado por um genótipo da Souza Cruz e dois americanos, apresentando estes últimos elevado

parentesco. A composição do grupo 6 foi heterogênea, com 10 genótipos tipo Burlei americanos e brasileiros, apresentando semelhanças fenotípicas e parentesco. Os grupos 7, 8 e 9 foram constituídos por genótipos DIMON, que agruparam isoladamente dos demais.

Análise conjunta de marcadores moleculares

Para análise conjunta, utilizou-se os 152 fragmentos RAPD e os 202 fragmentos polimórficos AFLP. A SG variou de 0,43 a 0,98, com média de 0,79 para todos os genótipos (Tabela 3.2). Esta análise não revelou diferença significativa entre as estimativas de SG para cultivares tipos Virgínia e Burlei, ao nível de 5% pelo teste t.

O dendograma obtido revelou a formação de 12 grupos distintos, utilizando a SG média para o tipo Burlei (Figura 3.4). O grupo 1 foi constituído de genótipos tipo Virgínia de origem norte americana e brasileira com elevado parentesco. Os genótipos C-176, HINC-95 e TN-90 agruparam isoladamente formando os grupos 2, 3 e 4, respectivamente. O grupo 5 apresentou genótipos do tipo Burlei, com elevada similaridade genética e parentesco. Os genótipos americanos KY-907 e BY-64 formaram o grupo 6. Os grupos 7 a 12 foram constituídos de genótipos que agruparam isoladamente, apresentando menor similaridade em relação aos demais. Destes grupos, 5 são de origem brasileira.

Comparação entre diferentes medidas de similaridade

O relacionamento entre genótipos pode ser definido em termos de similaridade genética. Diferentes estimadores foram usados neste trabalho visando medir a SG entre os genótipos de fumo (Tabela 3.2). Caracteres

fenotípicos apresentaram a menor SG média, diferenciando os genótipos com base na morfologia e performance, sob influência ambiental. Para os marcadores moleculares (RAPD e AFLP), as estimativas de SG foram elevadas e similares. Elas estimam a proporção dos genomas comparados que são idênticos. No entanto, houve diferença significativa, ao nível de 5% pelo teste t, somente para as estimativas entre caracteres fenotípicos e marcadores RAPD. Os valores médios de SG foram elevados para os genótipos de fumo, para todos os estimadores. No entanto, caracteres fenotípicos detectaram maior polimorfismo para genótipos do tipo Burlei, e marcadores AFLP para os do tipo Virgínia.

A menor estimativa da SG obtida através de caracteres fenotípicos pode ser explicada pelo genoma total de *N. tabacum* ser composto por uma pequena fração de DNA nuclear não repetitivo, que pode ser responsável pela maior parte da variação na morfologia, composição química e características qualitativas encontradas entre os acessos da espécie.

Os dendogramas obtidos através dos diferentes estimadores de SG mostraram resultados distintos considerando os grupos formados. O dendograma obtido com caracteres fenotípicos (Figura 3.1) revelou a formação de 9 grupos, enquanto os dendogramas RAPD e AFLP (Figuras 3.2 e 3.3) mostraram 11 e 9 grupos, respectivamente. Apesar de caracteres fenotípicos e AFLP revelarem o mesmo número de grupos, a constituição destes foi bastante diferenciada, o que indica que estão amostrando porções distintas do genoma do fumo. Os genótipos C-176 e GLA-3 apresentaram elevada similaridade fenotípica. No entanto, foi possível separá-los através de marcadores RAPD e AFLP. Por outro lado, os genótipos K-326 LF, KY-14 e HIBY-21 foram distinguidos apenas fenotipicamente. Cabe salientar, também, a distinguibilidade dos genótipos NC-95, HINC-95, TN-

90, KY-907 e B-973 somente com marcadores RAPD. Da mesma forma, somente os marcadores AFLP distinguiram os genótipos MSV17 e V-961. Isto mostra que estes marcadores se complementaram para a distinguibilidade dos genótipos de fumo estudados.

O nível de relacionamento entre os índices de similaridade, baseados em caracteres morfológicos, RAPD, AFLP e ambos os marcadores moleculares, foi estimado através da comparação de todas as matrizes de similaridade genética, utilizando-se o teste de Mantel. Caracteres morfológicos e marcadores RAPD (Figura 3.5) apresentaram moderada correlação ($r = 0,39$). A menor correlação ($r = 0,05$) foi entre caracteres morfológicos e marcadores AFLP (Figura 3.6). Entre os marcadores moleculares, a correlação também foi moderada ($r = 0,32$) (Figura 3.7). Por sua vez, a correlação entre caracteres morfológicos e marcadores moleculares juntos foi baixa ($0,19$) (Figura 3.8). Nenhuma das correlações foi significativa, o que pode ser explicado pelo fato de marcadores moleculares apresentarem variação aleatória, e caracteres morfológicos serem tendenciosos e influenciados pelo melhoramento. As correlações entre diferentes estimadores do relacionamento genético em outras espécies têm mostrado resultados distintos. Em arroz, Fuentes et al. (1999) relataram alta correlação entre marcadores RAPD e AFLP. Em pimenta, Lefebvre et al. (2001) relataram alta correlação entre marcadores RAPD e AFLP e destes com caracteres fenotípicos. De forma contrária, Schut et al. (1997) relataram ausência de correlação significativa entre distância morfológica e marcadores AFLP para linhagens de cevada.

Apesar das medidas usadas neste estudo não serem correlacionadas, estas podem ser utilizadas de forma complementar para distinguibilidade dos

genótipos avaliados. Além disso, estas informações são úteis para maximizar o nível de variação presente em populações segregantes, através do cruzamento entre genótipos com baixa similaridade genética. Os resultados obtidos sugerem o uso combinado de caracteres fenotípicos e marcadores RAPD e AFLP para estudos de diversidade genética e distinguibilidade de genótipos de fumo.

3.4. CONCLUSÕES

A similaridade genética dentro do grupo de genótipos de fumo utilizados pelos programas de melhoramento do Sul do Brasil é alta.

Os métodos usados neste estudo são eficientes para mensurar o grau de similaridade genética entre os genótipos de fumo estudados e para a distinguibilidade dos mesmos.

Características fenotípicas e moleculares se complementam e conjuntamente permitem a identificação de genótipos individuais presentes no germoplasma estudado.

A baixa correlação entre marcadores fenotípicos e moleculares para estimativas de similaridade genética entre pares de genótipos indica que a combinação dos diferentes métodos é recomendada para obtenção dessas estimativas médias, para distinguibilidade dos genótipos estudados e para desenvolvimento de germoplasma e de linhagens superiores de fumo.

TABELA 3.1. Genótipos de fumo utilizados no estudo e suas respectivas origens. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

Código	Genótipo	Grupo	Tipo	Origem
1	K-326	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
2	K-326NF	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
3	K-149	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
4	RG-08	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
5	C-176	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
6	DM-465	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
7	NC-55	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
8	NC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
9	NC-2326	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
10	GLA-3	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
11	LINC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
12	HINC-95	Estufa	Virgínia	Estados Unidos
13	MS V17	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
14	V-961	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
15	V-991	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
16	V-201	Estufa	Virgínia	DIMON – Brasil
17	TN-86	Galpão	Burlei	Estados Unidos
18	TN-90	Galpão	Burlei	Estados Unidos
19	KY-907	Galpão	Burlei	Estados Unidos
20	KY-14	Galpão	Burlei	Estados Unidos
21	MBN-2	Galpão	Burlei	Japão
22	BY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
23	BY-37	Galpão	Burlei	Estados Unidos
24	BY-64	Galpão	Burlei	Estados Unidos
25	BY Va-509	Galpão	Burlei	Estados Unidos
26	CSC-223	Galpão	Burlei	Souza Cruz – Brasil
27	HIBY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
28	LIBY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
29	LABY-21	Galpão	Burlei	Estados Unidos
30	B-972	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
31	B-973	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil
32	B-991	Galpão	Burlei	DIMON – Brasil

TABELA 3.2. Similaridade genética média e desvio padrão de genótipos de fumo obtidos através de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

	Total	Tipo Virgínia	Tipo Burlei
Caracteres fenotípicos	0,68 ± 0,14	0,83 ± 0,08	0,79 ± 0,07
RAPD	0,79 ± 0,11	0,85 ± 0,10	0,85 ± 0,10
AFLP	0,78 ± 0,16	0,77 ± 0,22	0,87 ± 0,07
RAPD + AFLP	0,79 ± 0,12	0,80 ± 0,15	0,86 ± 0,07

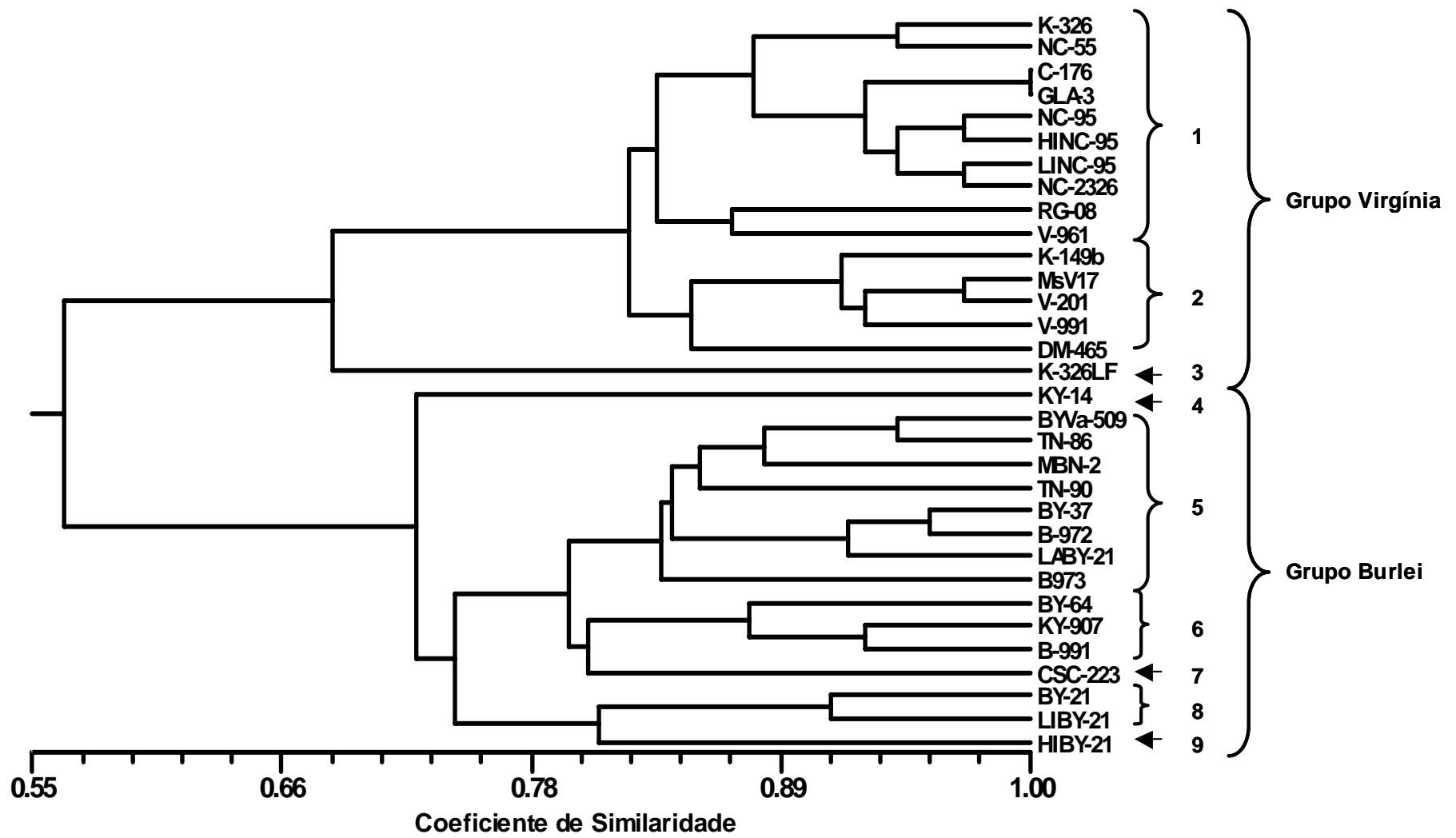


FIGURA 3.1. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em caracteres fenotípicos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

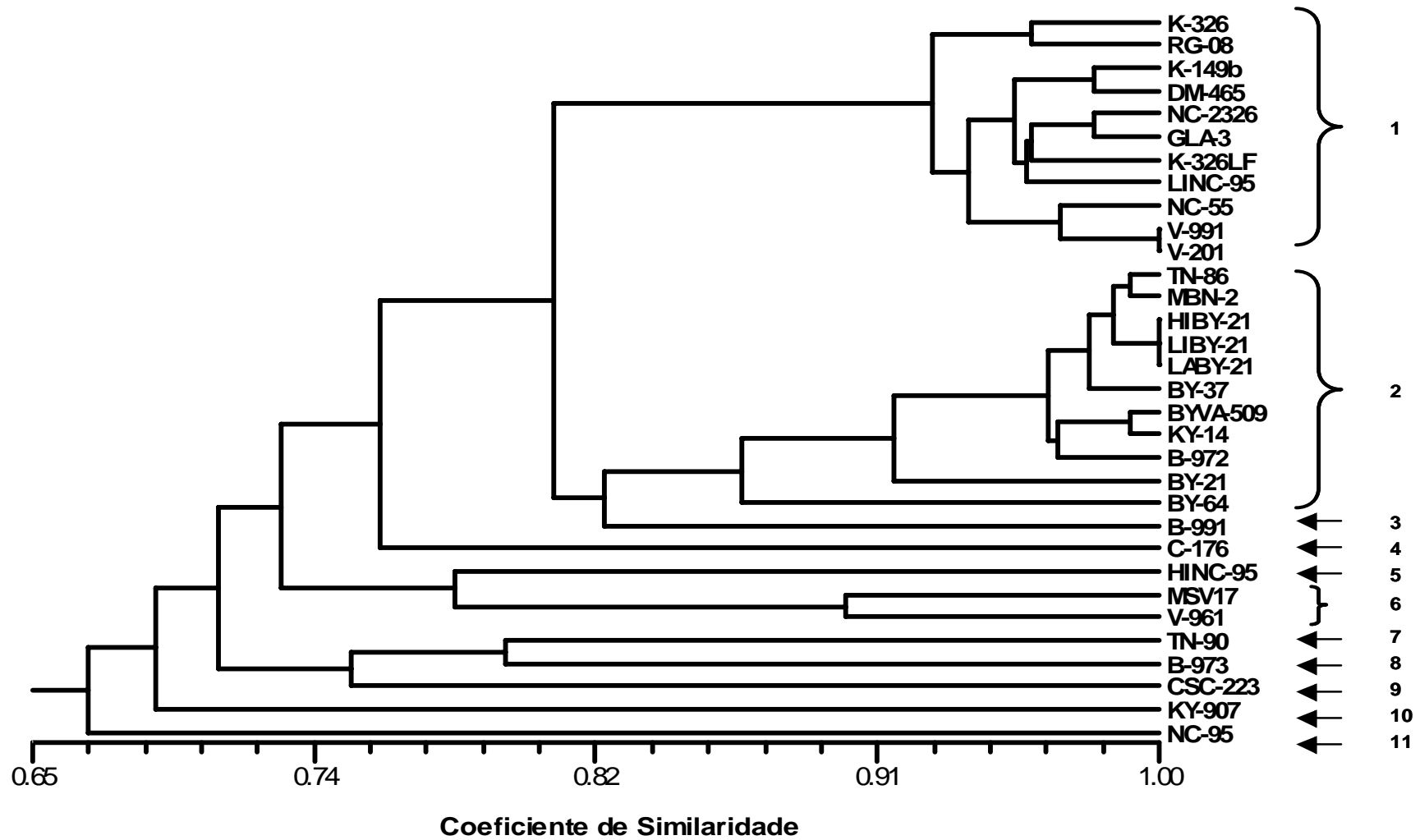


FIGURA 3.2. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores RAPD. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

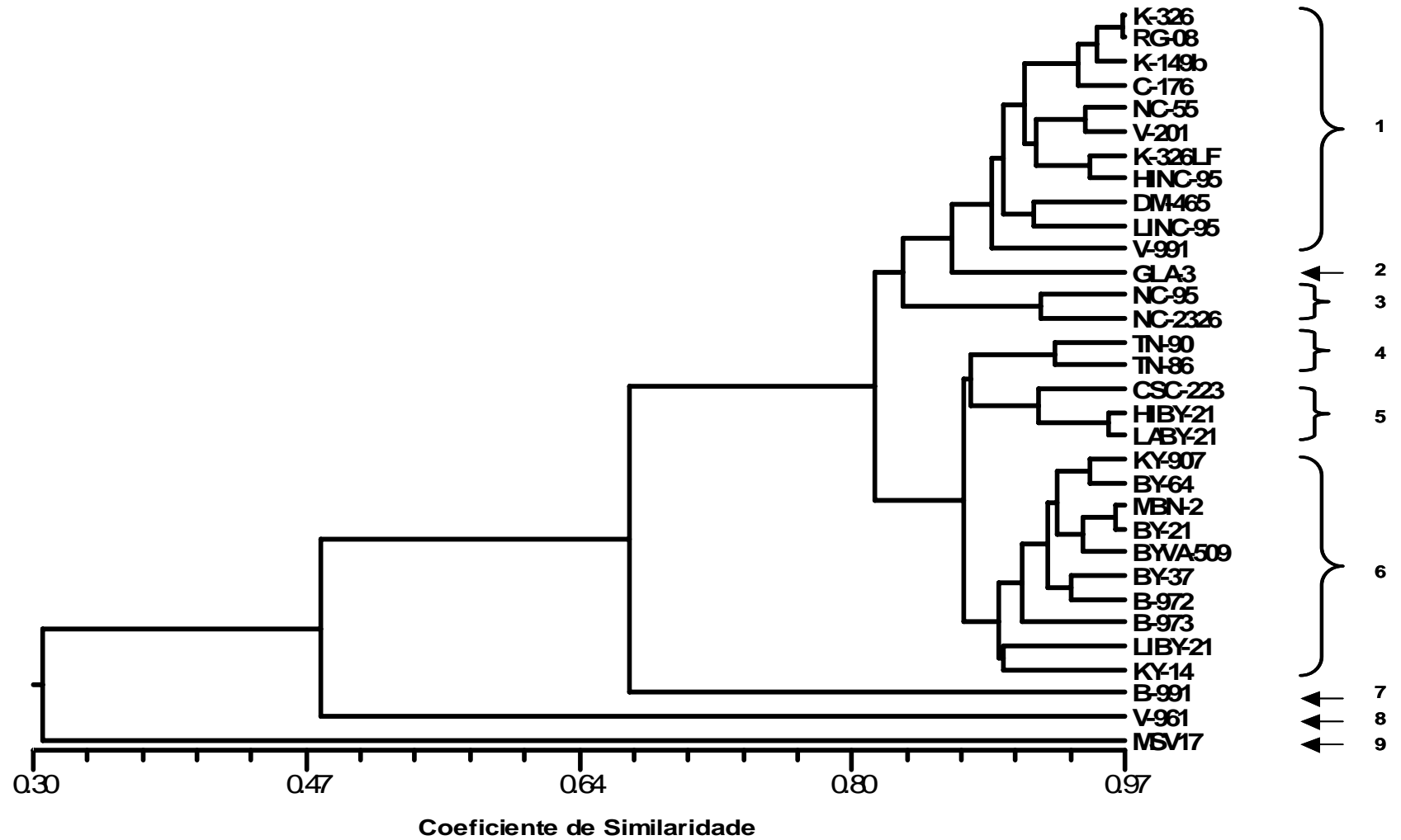


FIGURA 3.3. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

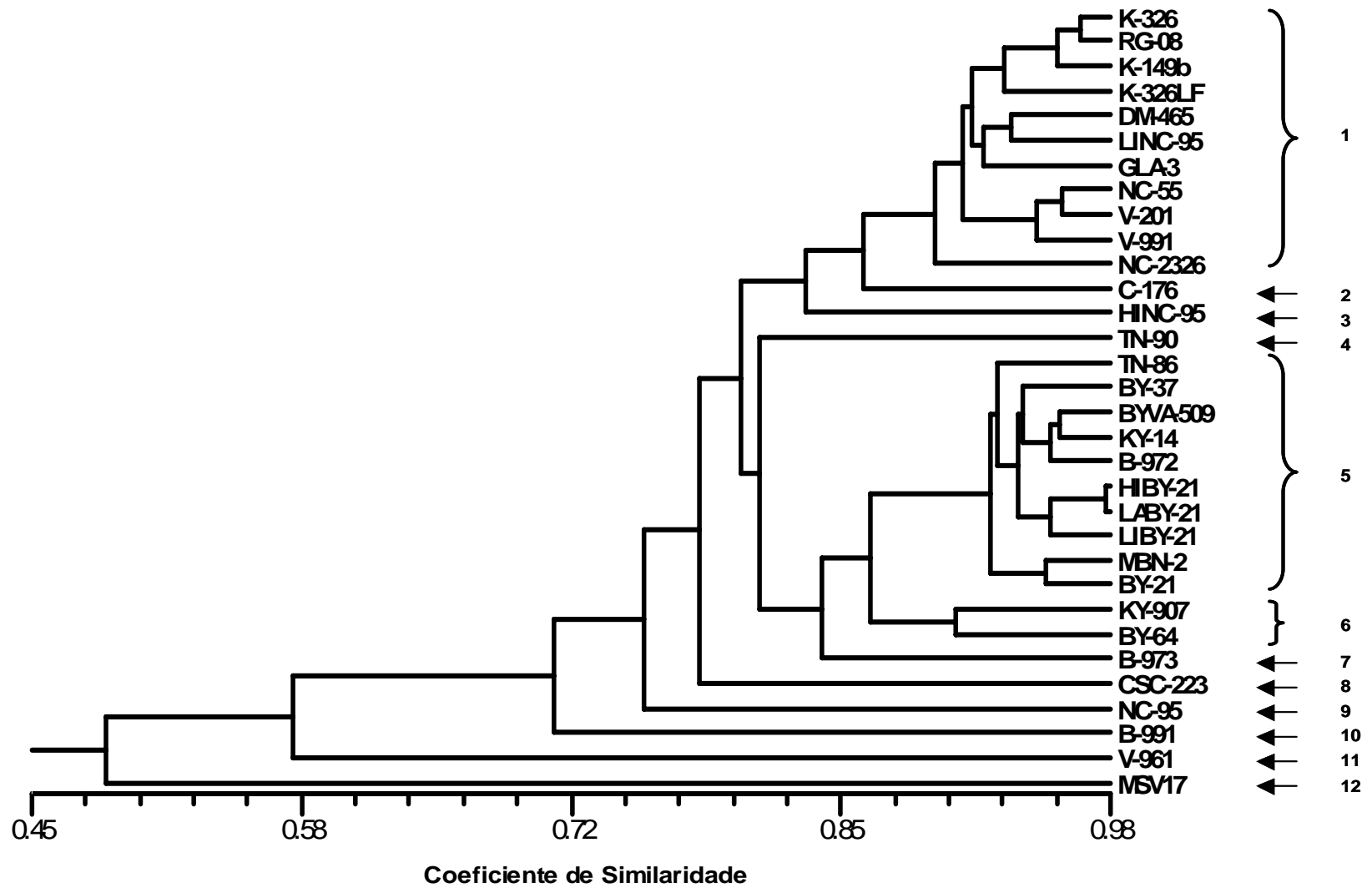


FIGURA 3.4. Agrupamento de genótipos de fumo baseado em marcadores RAPD + AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

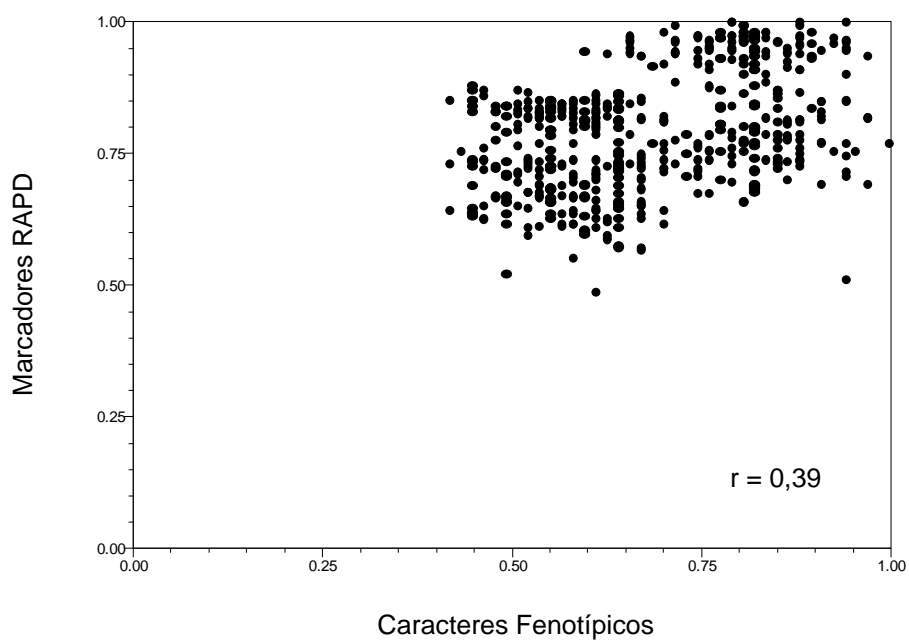


FIGURA 3.5. Correlação entre as matrizes de similaridade de caracteres fenotípicos e marcadores RAPD. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

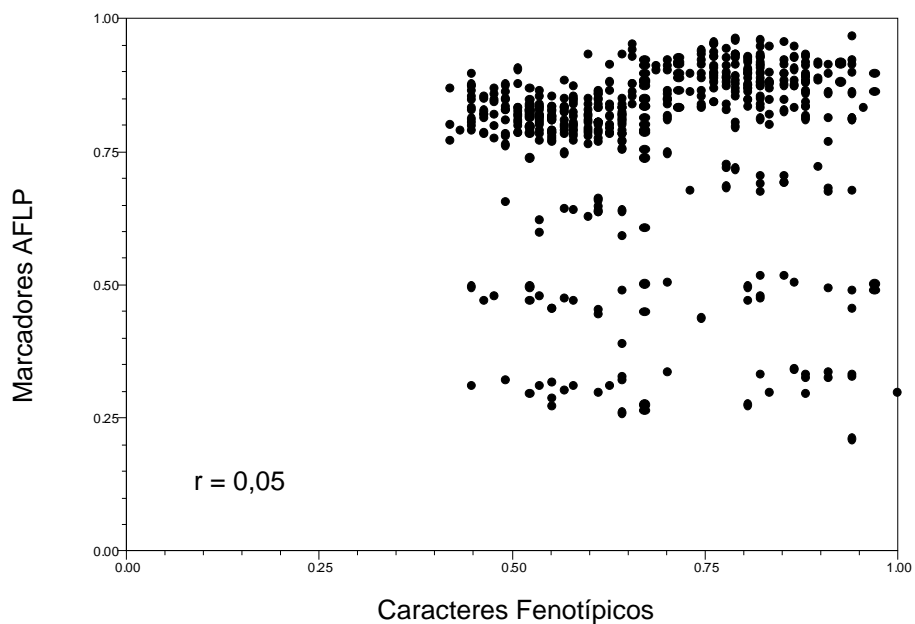


FIGURA 3.6. Correlação entre as matrizes de similaridade de caracteres fenotípicos e marcadores AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

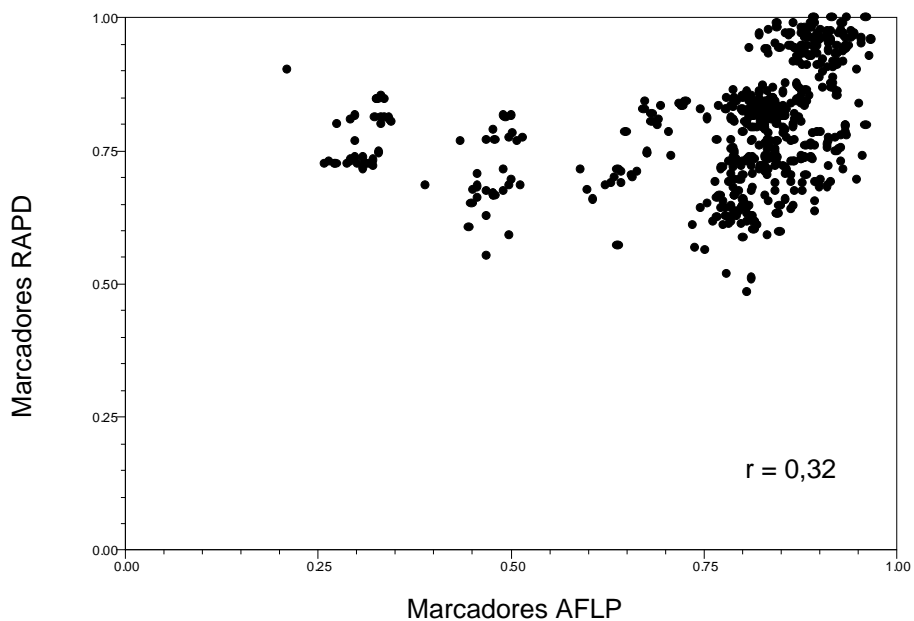


FIGURA 3.7. Correlação entre as matrizes de similaridade de marcadores RAPD e AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

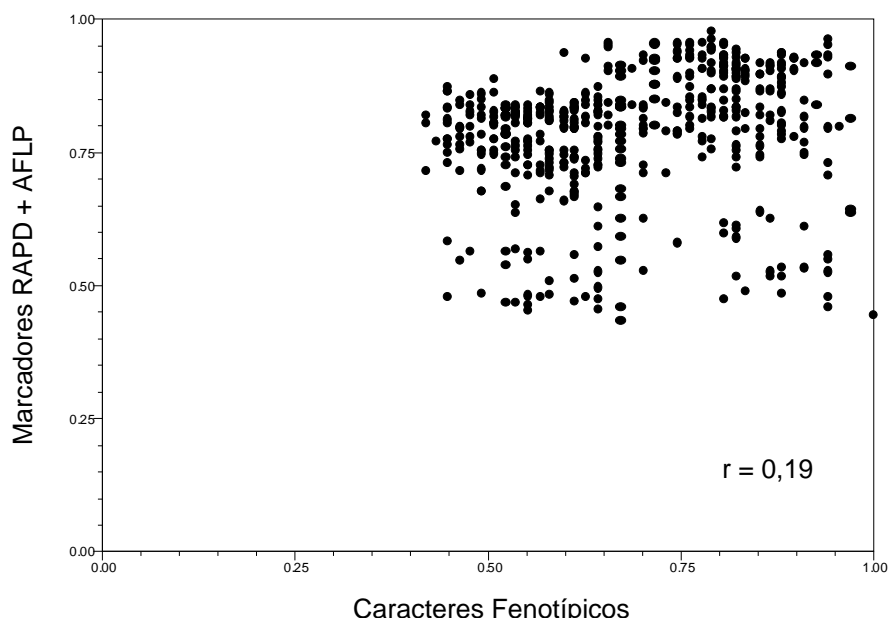


FIGURA 3.8. Correlação entre as matrizes de similaridade de caracteres fenotípicos e marcadores RAPD + AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS. 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

- A similaridade genética dentro do grupo de genótipos de fumo utilizados pelos programas de melhoramento do Sul do Brasil é moderada. Apesar da moderada similaridade genética e estreita base genética, existe variabilidade para as características fenotípicas de maior importância econômica no germoplasma de fumo utilizado nos programas de melhoramento do Sul do Brasil.
- Os genótipos K-326 LF, do tipo Virgínia, e BY-64, do tipo Burlei, divergem dos demais e destacam-se para características fenotípicas de importância econômica, sendo de grande potencial como genitores em cruzamentos elite para desenvolvimento de cultivares de fumo para o Sul do Brasil.
- As características fenotípicas e marcadores moleculares usados neste estudo são eficientes para mensurar o grau de similaridade genética entre os genótipos de fumo estudados. A baixa correlação entre marcadores fenotípicos e moleculares para estimativas de similaridade genética entre pares de genótipos indica que a combinação dos diferentes métodos é recomendada para obtenção dessas estimativas médias, para distinguibilidade dos genótipos estudados e para desenvolvimento de germoplasma e de linhagens superiores de fumo.
- A similaridade genética do grupo de espécies silvestres do gênero *Nicotiana* é significativamente menor daquela estimada para genótipos de *Nicotiana tabacum* L. Existe evidência para um grande estreitamento de

variabilidade do germoplasma cultivado para o silvestre, o que é esperado devido a introgressão através de retrocruzamentos para *N. tabacum*.

- Dos marcadores investigados, RAPD e AFLP são mais eficientes para avaliar a variabilidade genética do germoplasma de fumo incluído neste estudo. Estes diferentes marcadores se complementam na capacidade de distinguir genótipos individuais dentro do germoplasma estudado.

- Trinta e seis marcadores de RAPD ou AFLP são específicos e permitem identificar e distinguir os genótipos do programa de melhoramento da empresa DIMON dos demais incluídos no estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIFUMO. **Perfil da Indústria Brasileira do Fumo**. Rio de Janeiro, 1999. 30p. Edição comemorativa 20 anos
- ABIFUMO. **Perfil da Indústria Brasileira do Fumo**. Rio de Janeiro, 2000. 32p.
- AGRICULTURE and agri-food. Winnipeg : Cereal Research Centre, 1997.
- AJMONE MARSAN, P.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, F.; KUIPER, M.; MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 219-227, 1998.
- ANGIOLILLO, A.; MENCUCCINI, M.; BALDONI, L. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 411-421, 1999.
- BAI, D.; REELEDER, R.; BRANDLE, J.E. Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 91, p. 1184-1189, 1995.
- BAIRD, E.; BLAND, S.C.; WAUGH, R.; DEMAINE, M.; POWELL, W. Molecular characterisation of inter-and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Molecular General Genetics**, New York, v. 233, p. 469-475, 1992.
- BARBOSA NETO, J.F. **Application of molecular markers to genetic diversity and quantitative trait loci detection studies in oat and wheat**. Ithaca, NY : Cornell University, 1995. 87f. Thesis - Cornell University, Cornell, 1995.
- BARBOSA NETO, J.F.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S.C.K (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 29-40.
- BARRETT, B.A.; KIDWELL, K.K. AFLP – based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the pacific northwest. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 1261-1271, 1998.
- BEEBE, S.; RENGIFO, J.; GAITAN, E.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 854-862, 2001.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BERED, F. **Variabilidade genética em trigo hexaplóide estimada através de caracteres morfológicos, Coeficiente de Parentesco e RAPD**. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós – Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

BLAND, M.M.; MATZINGER, D.F.; LEVINGS, C.S. Comparison of the mitochondrial genome of *Nicotiana tabacum* with its progenitor species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 69, p. 535-541, 1985.

BOWMAN, D.T.; WERNSMANN, E.A.; CORBIN, T.C.; TART, A.G. Contribution of genetics and production technology to long-term gains in flue-cures tobacco. **Tobacco Science**, Raleigh, v. 28, p. 30-35, 1984.

BRAKE, M.; RUFTY, R.C. Use of molecular marker assisted selection to screen for blue mold resistance in burley tobacco. In: CORESTA CONGRESS, 2000, Lisbon. **Anais...** Paris, 2000. CD-ROM, 10.

BRANDLE, J.D.; BAI, D. Biotechnology: Uses and applications in tobacco improvement. In: DAVIS, D.L. ; NIELSEN, M. (Ed.). **Tobacco, Production, Chemistry and Technology**. Cambridge, 1999. p. 32-48.

BRYAN, G.J.; McNICOLL, J.; RAMSAY, G.; MEYER, R.C. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 859-867, 1999.

BURSTIN, J.; DENIOT, G.; POTIER, J.; WEINACHTER, C.; AUBERT, G.; BARANGER, A. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 120, p. 311-317, 2001.

CAO, D.; OARD, J.H. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 1630-1635, 1997.

CAO, W.; HUCL, P.; SCOLES, G.; CHIBBAR, R.N. Diversity within spelta and macha wheats based on RAPD analysis. **Euphytica**, Wageningen, v. 104, p. 181-189, 1998.

CASAS, A.M.; IGARTUA, R.; BALAGUER, G.; MORENO, M.A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analysis by RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 110, p. 139-149, 1999.

CHOI, I.Y.; LIM, S.H.; KIM, D.W.; CHOI, Y.S.; SHIN, Y.S.; KIM, N.S. Classification of diverse soybean germoplas with morphological characters and molecular markers. **Korean Journal of Genetics**, Seoul, v. 22, p. 87-100, 2000.

COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; MOREIRA, M.C.P.Q.D.G.; POMPEU Jr., J. Analysis of genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 133-139, 1998.

COUSSIRAT, J.C. Empreintes génétiques du tabac par RAPD. Utilisation de marqueurs pour identifier des hybrides somatiques entre *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana rustica* L. **Annales du Tabac**, Bergerac, v. 25, p. 1-6, 1993.

COUSSIRAT, J.C. Diversité génétique et identification variétale de l' espèce *N. tabacum* par marqueurs RAPD. Première approche. **Annales du Tabac**, Bergerac, v. 26, p. 1-7, 1994.

CRUZ, R.P; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 107-116.

DAVIERWALA, A.P.; CHOWDARI, K.V.; KUMAR, S.; REDDY, A.P.K.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Use of three different marker system to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties. **Genetica**, Dordrecht, v. 108, p. 269-284, 2000.

DE FILIPPIS, L.; HOFFMANN, E.; HAMPP, R. Identification of somatic hybrids of tobacco generated by electrofusion and culture of protoplasts using RAPD-PCR. **Plant Science**, Clare, v. 121, p. 39-46, 1996.

DEL PIANO, L.; ABERT, M.; SORRENTINO, C.; ACANFORA, F.; COZZOLINO, E.; DI MURO, A. Genetic variability in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana* species as revealed by RAPD markers. In: CORESTA CONGRESS, 1998, Brighton. **Resumos...** Paris, 1998. p. 27

EGASHIRA, H.; HSHIHARA, H.; TAKASHINA, T.; IMANISHI, S. Genetic diversity of peruvianum-complex (*Lycopersicon peruvianum* (L.) Lill. and *L. chilense* Dun.) revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 23-31, 2000.

ELIAS, M.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Assesment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, Oxford, v. 85, p. 219-230, 2000.

FAHIMA, T.; RÖDER, M.S.; GRAMA, A.; NEVO, E. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum diccoides* accessions highly resistant to yellow rust. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 187-195, 1998.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 3-15.

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

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; TSAI, S.M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 381-385, 2001.

FUENTES, J.L.; ESCOBAR, F.; ALVAREZ, A; et al. Análisis of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, p. 107-115, 1999.

GARCIA-MAS, J.; OLIVER, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H., VICENTE, M.C. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 860-864, 2000.

GERSTEL, D.U. Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. I. Comparison of 6 x (*N. tabacum* x *tomentosiformis*) and 6 x (*N. tabacum* x *otophora*). **Genetics**, Baltimore, v. 45, p.1723-1734, 1960.

GERSTEL, D.U. Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. II. Discordant ratios from individual loci in 6 x (*N. tabacum* x *N. sylvestres*) **Genetics**, Baltimore, v. 48, p.677-689, 1963.

GERSTEL, D.U. Tobacco. *Nicotiana tabacum*. (Solanaceae). In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). **Evolution of Crop Plants**. New York, 1979.339p.

GOODSPEED, T.H. **The genus *Nicotiana***. Chronica Botanica Co, Waltham, Massachusetts. 1954. 536p.

HOKANSON, S.C.; LAMBOY, W.F.; SZEWC-McFADDEN, A.K.; McFERSON, J.R. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 118, p. 281-294, 2001.

HUMPHREY, A.B.; MATZINGER, D.F.; MANN, T.J. Inheritance of leaf shape in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Heredity**, Oxford, v. 19, p. 615-628, 1964.

KO, H.L.; COWAN, D.C.; HENRY, R.J.; GRAHAM, G.C.; BLAKENEY, A.B.; LEWIN, L.G. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Euphytica**, Wageningen, v. 80, p. 179-189, 1994.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 55, p. 265-344, 1995.

LEFEBVRE, V.; GOFFINET, B.; CHAUVET, J.C.; CAROMEL, B.; SIGNORET, P.; BRAND, R.; PALLOIX, A. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, p. 741-750, 2001.

LEGG, P.D.; COLLINS, G.B. Inheritance of a short-internode trait in tobacco. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 24, p. 653-659, 1982.

LEGG, P.D.; SMEETON, B.W. Breeding and genetics. In: DAVIS, D.L.; NIELSEN, M. (Ed.). **Tobacco, Production, Chemistry and Technology**. [S.l. : s.n.], 1999. p. 32-48.

LIN, T.Y.; KAO, Y.Y.; LIN, S.; CHEN, C.M.; HUANG, C.H.; WANG, Y.Z.; LIN, Y.Z.; CHEN, C.C. A genetic linkaged map of *Nicotiana plumbaginifolia/Nicotiana longiflora* based on RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 905-911, 2001.

LOMBARD, V.; BARIL, C.P.; DUBREUIL, P.; BLOUET, F.; ZHANG, D. Genetic relationships and fingerprinting of rapessed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1417-1425, 2000.

MACKILL, D.J.; ZHANG, Z.; REDONÃ, E.D.; COLOWIT, P.M. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 969-977, 1996.

MANTEL, N. The detection of disease clustering a generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v. 27, p. 209-220, 1967.

MATZINGER; D.F.; WERNSMAN, E.A. Population improvement in self-pollinated crops. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2., 1979, Boulder. **Resumos...** Boulder, 1979. p. 191.

MELCHINGER, A.E.; GRANER, A.; MAHENDRA, S. et al. Relationships among European barley germplasm: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1191-1199, 1994.

MENGONI, A.; GORI, A.; BAZZICALUPO, M. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, p. 311-317, 2000.

MILACH, S.C.K.; Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 17-28.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p. 4321-4325, 1980.

NARAYAN, R.K. Nuclear DNA changes, genoma differentiation and evolution in *Nicotiana* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v.157, p. 161-180, 1987.

NISHI, T.; TAJIMA, T.; NOGUCHI, S.; AJISAKA, H.; NEGISHI, H. Identification of DNA markers of tobacco linked with resistance to bacterial wilt. In: JOINT MEETING OF THE CORESTA AGRONOMY & PHYTOPATHOLOGY STUDY GROUPS, 2001, Cape Town. **Resumos...**Paris, 2001. p.27.

NOGUCHI, S.; TAJIMA, T.; YAMAMOTO, Y.; KUBO, T. Identification of RAPD markers linked to potato virus Y resistance gene in tobacco. *CORESTA Information Bulletin*. [S.l. : s.n.], 1996. 160p.

OKAMURO, J.; GOLDBERG, B. Tobacco single-copy DNA is highly homologous to sequences present in the genomes of its diploid progenitors. ***Molecular General Genetics***, New York, v. 198, p. 290-298, 1985.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R.K.; ROY, J.K.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. ***Theoretical and Applied Genetics***, New York, v. 100, p. 584-592, 2000.

QUAGLIARO, J.; VISCHI, M.; TYRKA, M.; OLIVIERI, A.M. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. ***Journal of Heredity***, Cary, v. 92, p. 38-42, 2001.

RASMUSSEN, D.C.; PHILLIPS, R.L.. Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. ***Crop Science***, Madison, v. 37, p. 303-310, 1997.

REN, N.; TIMKO, M.P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. ***Genome***, Ottawa, v. 44, p. 559-571, 2001.

RODRIGUEZ, J.M.; BERKE, T.; ENGLE, L.; NIENHUIS, J. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. ***Theoretical and Applied Genetics***, New York, v. 99, p. 147-156, 1999.

ROHLF, F.J. ***Numerical taxonomy and multivariate analysis system***. New York : Prentice-Hall, 1992. 470p. (Version 1.70).

ROHLF, F.J. ***Numerical taxonomy and multivariate analysis system***. New York : Exeter Software, 2000. 38p. (Version 2.1).

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

ROSSI, L.; BINDLER, G.; PIJNENBURG, H.; GADANI, F. Potential of molecular marker analysis for the assessment of genetic diversity in tobacco varieties. In: JOINT MEETING OF THE CORESTA AGRONOMY & PHYTOPATHOLOGY STUDY GROUPS, 1999, Suzhou. ***Resumos...*** Paris, 1999.

SAS Institute. ***System for identification***: Versão 8.0. Cary, 2000.

SCHUT, J.W.; QI, X.; STAM, P. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. ***Theoretical and Applied Genetics***, New York, v. 95, p. 1161-1168, 1997.

SINDIFUMO. **A agroindústria do fumo no Sul do Brasil**. Santa Cruz do Sul, 2000. 15p.

SMITH, H.H. Differential photoperiod response for interspecific gene transfer. **Journal of Heredity**, Cary, v. 41, p. 198-203, 1950.

SOUZA, E.; SORRELLS, M.E. Relationships among 70 North American oat germoplasm: I. Cluster analysis using quantitative characters. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 599-605, 1991.

SPAGNOLETTI ZEULI, P.L.S.; QUALSET, C.O. Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 235-241, 1987.

SPERISEN, C.; RYALS, J.; MEINS, F. Comparison of cloned genes provides evidence for intergenomic exchange of DNA in the evolution of a tobacco glucan endo-1,3- β -glucosidase gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 88, p. 1820-1824, 1991.

SUEN, D.F.; WANG, C.K.; LIN, R.F.; KAO, Y.Y.; LEE, F.M.; CHEN, C.C. Assignment of DNA markers to *Nicotiana glauca* chromosomes using monosomic alien addition lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 331-337, 1997.

SUN, G.L.; WILLIAM, M.; LIU, J.; KASHA, K.J.; PAULS, K.P. Microsatellite and RAPD polymorphisms in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings. **Euphytica**, Wageningen, v. 7, p. 13-24, 2001.

TATINENI, V.; CANTRELL, R.G.; DAVIS, D.D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 186-192, 1996.

TORRECILLA, G.G. Cuban tobacco collection (*Nicotiana glauca* L.): its composition and more significant contributions. In: CORESTA CONGRESS, 2001, Cape Town. **Resumos...** Paris, 2001. p.65.

VAN BEUNINGEN, L.T.; BUSCH, R.H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: II. Ancestor contributions to gene pools of different eras and regions. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 580-595, 1997.

VOLKOV, R.A.; BORISJUK, N.V.; PANCHUK, B.I.; SCHWEIZER, D.; HEMLEBEN, V. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana glauca*. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 16, p. 311-320, 1999.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

- WANG, Z.; JIANG, Y.; DAI, P.; MU, J. Establishment and evaluation of tobacco core germ plasm in China. . In: CORESTA CONGRESS, 2001, Cape Town. **Resumos...** Paris, 2001. p.65.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; LU, J. Identifying mapping genes of economic significance. **Euphytica**, Wageningen, v. 73, p. 191-198, 1994.
- WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 1, p. 9-19, 1999.
- WERNSMAN, E.A.; RUFTY, R.C. Tobacco. In: FEHR, W.R. (Ed.). **Principles of cultivar development**. [S.l. : s.n.], 1987. p. 669-698.
- WERNSMAN, E. An overview of tobacco breeding. Past, present and future. CONFERENCE OF THE TOBACCO SCIENCE RESEARCH, 53., 1999, [Montreal]. [Montreal : s.n.], 1999. p. 5-35.
- WILLIAMS, J.G.K; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- YI, Y.H.; RUFTY, R.C. RAPD markers elucidate the origin of the root-knot nematode resistance gene (RK) in tobacco. **Tobacco Science**, Raleigh ,v. 42, p. 58-63, 1998.
- YI, Y.H.; RUFTY, R.C.; WERNSMANN, E.A. Identification of RAPD markers linked to the wildfire resistance gene in tobacco. **Tobacco Science**, Raleigh , v. 42, p. 52-57, 1998a.
- YI, Y.H.; RUFTY, R.C.; WERNSMANN, E.A.; CONKLING, M.C. Mapping the root-knot nematode resistance gene (RK) in tobacco with RAPD markers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 12, p. 1319-1322, 1998b.
- YU, Y.-L.; LIN, T.-Y. Construction of phylogenetic tree for *Nicotiana* species based on RAPD markers. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 110, p. 187-193, 1997.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting.1993. [S.l. : s.n.], [1993?] .European Patent Application, 0534858A1.
- ZHANG, L.-H.; OZIAS-AKINS, P.; KOCHERT, G.; KRESOVICH, S.; DEAN, R.; HANNA, W. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 895-902, 1999.
- ZHU, J.; GALE, M.D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M.T.; BRYAN, G.J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 602-611, 1998.