

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Anticarsia*
gemmatalis (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES RAPD**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 91

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA
POPULAÇÃO DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES RAPD

E. S. Martins
P. R. Queiroz
L. H. C. Lima
R.G. Monnerat

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)
3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Mariante*
Maria Alice Bianchi
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

A 532 Análise da variabilidade genética de uma população de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD / E. S. Martins ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
17 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 91)

1. *Anticarsia gemmatalis* – Insecta – RAPD - caracterização molecular. I. Martins, E. S. II. Série.

595.78 – CDD 21.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVO	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
INSETOS PARA ANÁLISE MOLECULAR	9
OBTENÇÃO DE DNA	9
REAÇÕES DE RAPD-PCR.....	9
OBTENÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS.....	10
ANÁLISE DOS DADOS	10
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	11
CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	16

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

E. S. Martins¹

P. R. Queiroz²

L. H. C. Lima³

R.G. Monnerat⁴

RESUMO

Anticarsia gemmatalis é uma das principais lagartas da cultura da soja no Brasil e está presente em todas as regiões onde este produto é cultivado. Neste trabalho indivíduos de uma população de *A. gemmatalis* foram caracterizados geneticamente por meio da técnica de RAPD utilizando-se os primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 a partir de uma metodologia modificada para extração de DNA. Observou-se que o emprego desses primers produziu diferentes perfis eletroforéticos entre os indivíduos analisados sendo encontrada alta variabilidade genética, indicada por um coeficiente de similaridade inferior a 80 %. Uma futura aplicação dessa metodologia poderá ser o desenvolvimento de um banco de marcadores moleculares para o monitoramento dessa espécie em campo.

¹ Bióloga – MSc. Patologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Biólogo – Doutorando em Biologia Animal – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*, Insecta, RAPD, Caracterização molecular.

ABSTRACT

Anticarsia gemmatalis is one of the most important pests of soybeans in Brazil and it is present in all places in where this product is cultivated. In this work samples of a laboratory population of *A. gemmatalis* were genetically characterized by RAPD-PCR using primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 and OPA-13 obtained according a new method of DNA extraction. These primers produced different profiles among the samples and a high genetic variability it was found, as indicated by a rate of genetic similarity lower than 80 %.

INTRODUÇÃO

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), costuma atacar as lavouras nas regiões setentrionais e a partir de janeiro no extremo sul do País e chega a ocasionar 100% de destruição foliar (HOFFMANN et al., 1979; GAZZONI e YORINIORI, 1995), sendo, portanto, de grande importância conhecer o comportamento desta praga e os métodos utilizados para o seu controle. Esta lagarta é a praga-chave da cultura da soja, atuando como desfolhadora, e sendo abundante em todas as regiões onde se cultiva a soja no País. Seu controle demanda, em média, duas aplicações de inseticidas em cada safra, havendo casos de quatro ou mais aplicações (MOSCARDI, 1993).

Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características genotípicas. Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético dos insetos e na identificação de marcadores que apontem para populações resistentes a inseticidas ou potencialmente transmissoras de doenças.

A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) tem sido muito utilizada por apresentar características que permitem a obtenção de um grande número de informações para a análise de genomas onde pouco se conhece a respeito de sua composição, uma vez que, emprega a utilização de um único primer de sequência arbitrária com potencial de reconhecer desconhecidas do DNA alvo.

Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação do DNA, gerando informações com simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo na forma de segmentos de DNA podem ser obtidos em curto espaço de tempo. Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD duas seqüências de DNA complementares ao primer devem estar adjacentes (a menos de 4 kb) e em orientação oposta, para permitir a amplificação pela *Taq* DNA polimerase (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma característica deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante. Lembrando que a dominância, neste caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (CIAMPI e MAGALHÃES, 2001).

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivos estabelecer uma metodologia simplificada de extração de DNA e determinar a variabilidade genética entre indivíduos de uma população de *A. gemmatalis* por meio de marcadores moleculares RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

INSETOS PARA ANÁLISE MOLECULAR

Os indivíduos de *A. gemmatalis* de terceiro ínstar foram coletados aleatoriamente de uma colônia mantida no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e mantidos em etanol 100 % a – 20 °C.

OBTENÇÃO DE DNA

Para os estudos de caracterização molecular, o DNA de vinte indivíduos de terceiro ínstar foi extraído a partir de um método previamente estabelecido (QUEIROZ et al., 2004) seguindo-se adaptações dos protocolos de Agusti et al. (1999) e Monnerat et al. (2004).

Submeteu-se um inseto inteiro à maceração e, a seguir, adicionou-se 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 120 µg.mL⁻¹), incubando-se por 30 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e a 10 °C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita. O DNA foi precipitado pela adição de 30 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a – 20

°C. Após centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a – 20 °C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído 10 X em TE 0,1 X.

REAÇÕES DE RAPD-PCR

Para os estudos de caracterização molecular, O DNA extraído a partir dos vinte indivíduos da população foi utilizado em 30 µL de uma reação de RAPD-PCR, contendo tampão Tris-HCl 6 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0,2 mM, 0,4 µM de um primer de sequência aleatória da Operon Technologies, Inc. (Tabela 1), 2,5 U.µL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 5 µL de DNA.

Tabela 1 – Primers usados nas reações de RAPD-PCR.

Primer	Seqüência (5' → 3')
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-13	CAG CAC CCA C

OBTENÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM), fotografados e arquivados no sistema Eagleeye. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

ANÁLISE DOS DADOS

As fotos das amplificações realizadas com os primers selecionados foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos da população. As bandas presentes nos géis foram consideradas como marcadores RAPD. Foi gerada então uma matriz de similaridade levando-se em consideração as relações entre indivíduos, primers e massas moleculares das bandas obtidas com um dado primer. Utilizou-se o valor 1 para a presença de um marcador e 0 para a ausência. No caso de dúvida o número 9 foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard, após, o que, através da análise por UPGMA produziu-se um dendograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS versão 2.02 pc (RHOLF, 1993).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

A partir da metodologia de extração de DNA estabelecida, foi possível obter marcadores de RAPD a partir dos indivíduos de uma população de *A. gemmatalis*. A preservação dos indivíduos em etanol, a conservação em baixa temperatura, a associação com uma estratégia simplificada de obtenção de ácidos nucleicos em quantidade e em qualidade, produziram diferentes perfis eletroforéticos entre os indivíduos analisados quando utilizou-se os primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 (Figura 1).

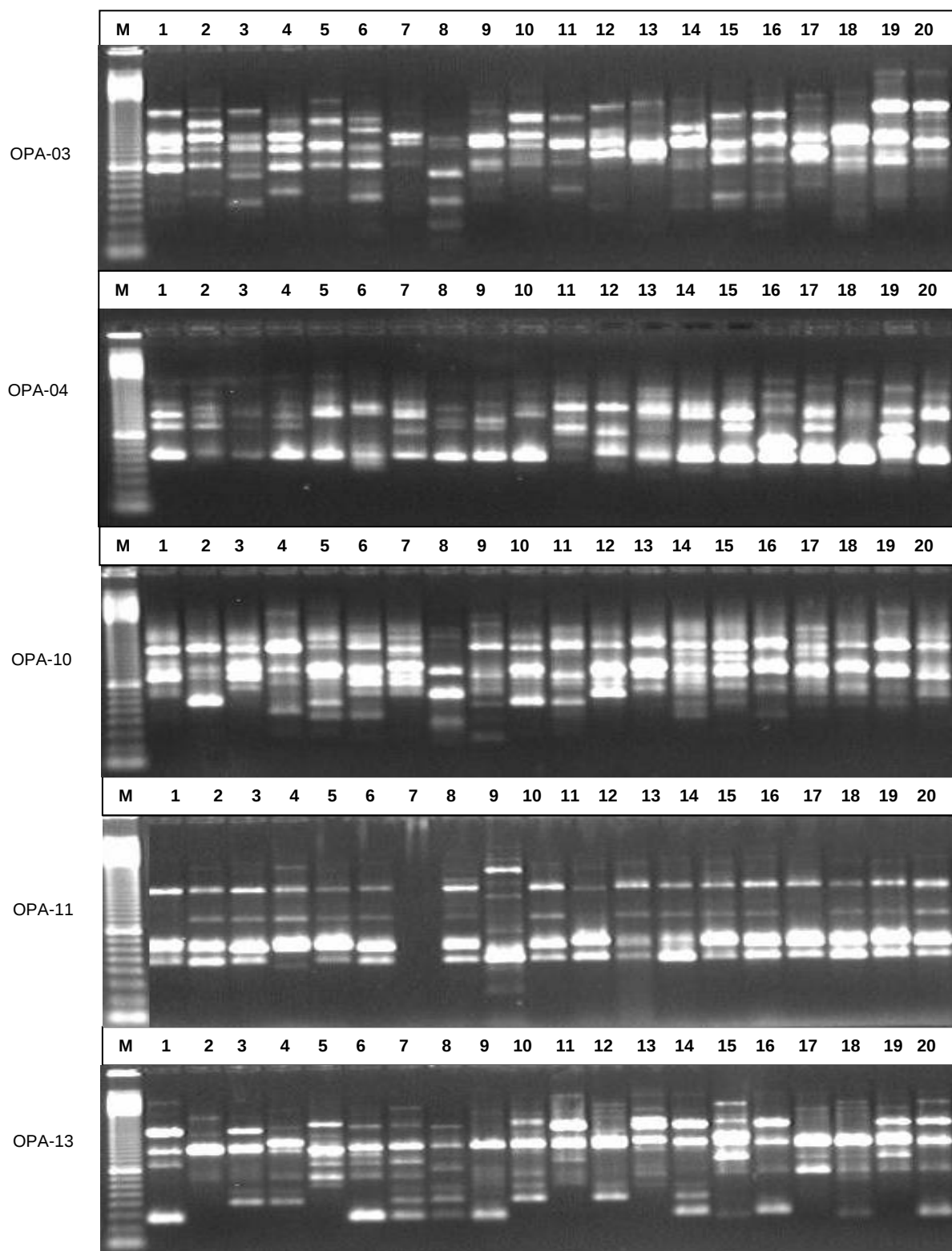


Figura 1 – Perfis eletroforéticos de vinte indivíduos de *A. gemmatilis* produzido por cinco primers de RAPD. A letra M representa o marcador 100 pb ladder. Os números de 1 a 20 representam o número de indivíduos analisados na população.

O primer OPA-03 produziu polimorfismo variando de 3 a 6 bandas entre os indivíduos analisados na população. Com esse primer observou-se variação nos perfis eletroforéticos na faixa de 350 pb a 1200 pb. Alternativamente, o primer OPA-04 produziu uma banda monomórfica de 500 pb na maioria dos indivíduos analisados. As exceções ficaram com os indivíduos 11 e 12. Posteriormente, maiores estudos poderão ser realizados visando utilizá-lo como marcador dessa espécie de lepidóptero. Utilizando-se o primer OPA-10, observou-se uma banda monomórfica de 1300 pb presente nos indivíduos analisados. Contudo, as amostras 7 e 8 não apresentaram esse marcador. Empregando-se o primer OPA-11 nas reações de RAPD foram obtidos marcadores de 550 pb, 700 pb e 1500 pb. Esses fragmentos poderão ser estudados em detalhes posteriormente buscando-se aplicações desses marcadores na identificação molecular dessa espécie de lepidóptero.

Os dados binários produzidos por cada organismo quando da utilização dos cinco primers de seqüência aleatória foram então utilizados para a determinação da matriz de distância pelo programa NTSYS (Tabela 1).

Tabela 1 - Matriz de distância genética produzida por 20 indivíduos de uma população de *A. gemmatilis*.

	AG1	AG2	AG3	AG4	AG5	AG6	AG7	AG8	AG9	AG10	AG11	AG12	AG13	AG14	AG15	AG16	AG17	AG18	AG19	AG20
AG1	0.00																			
AG2	0.24	0.00																		
AG3	0.28	0.20	0.00																	
AG4	0.30	0.09	0.19	0.00																
AG5	0.33	0.22	0.24	0.30	0.00															
AG6	0.38	0.35	0.32	0.34	0.17	0.00														
AG7	0.32	0.28	0.21	0.28	0.24	0.23	0.00													
AG8	0.33	0.38	0.36	0.33	0.43	0.33	0.31	0.00												
AG9	0.36	0.20	0.30	0.28	0.33	0.32	0.30	0.26	0.00											
AG10	0.27	0.23	0.24	0.27	0.23	0.40	0.24	0.31	0.29	0.00										
AG11	0.40	0.24	0.30	0.32	0.28	0.32	0.38	0.45	0.21	0.33	0.00									
AG12	0.38	0.40	0.29	0.40	0.36	0.36	0.33	0.44	0.38	0.42	0.42	0.00								
AG13	0.40	0.33	0.21	0.36	0.28	0.40	0.38	0.45	0.34	0.33	0.34	0.24	0.00							
AG14	0.38	0.30	0.28	0.34	0.22	0.26	0.23	0.33	0.28	0.27	0.36	0.31	0.36	0.00						
AG15	0.51	0.30	0.40	0.30	0.35	0.34	0.36	0.43	0.32	0.40	0.32	0.53	0.36	0.30	0.00					
AG16	0.43	0.39	0.40	0.38	0.43	0.34	0.36	0.38	0.40	0.44	0.36	0.44	0.36	0.38	0.30	0.00				
AG17	0.37	0.35	0.37	0.35	0.36	0.39	0.33	0.43	0.41	0.41	0.37	0.44	0.33	0.39	0.30	0.26	0.00			
AG18	0.34	0.26	0.28	0.30	0.30	0.34	0.23	0.33	0.28	0.31	0.32	0.44	0.28	0.30	0.26	0.21	0.22	0.00		
AG19	0.45	0.33	0.34	0.36	0.33	0.40	0.34	0.45	0.38	0.38	0.38	0.38	0.26	0.40	0.28	0.28	0.15	0.19	0.00	
AG20	0.38	0.30	0.36	0.38	0.35	0.34	0.32	0.33	0.19	0.31	0.36	0.36	0.28	0.21	0.26	0.34	0.39	0.26	0.28	0.00

Pela determinação da matriz de similaridade, foi possível observar que a distância genética entre os indivíduos analisados variou de 15 % a 53 %. Essa informação sugere uma elevada variabilidade genética dentro do grupo em estudo.

Após a análise do perfil eletroforético, foram gerados dados binários correspondentes aos vários indivíduos da população de *A. gemmatalis* em estudo para a determinação de um dendrograma para o estabelecimento das similaridades filogenéticas (Figura 2).

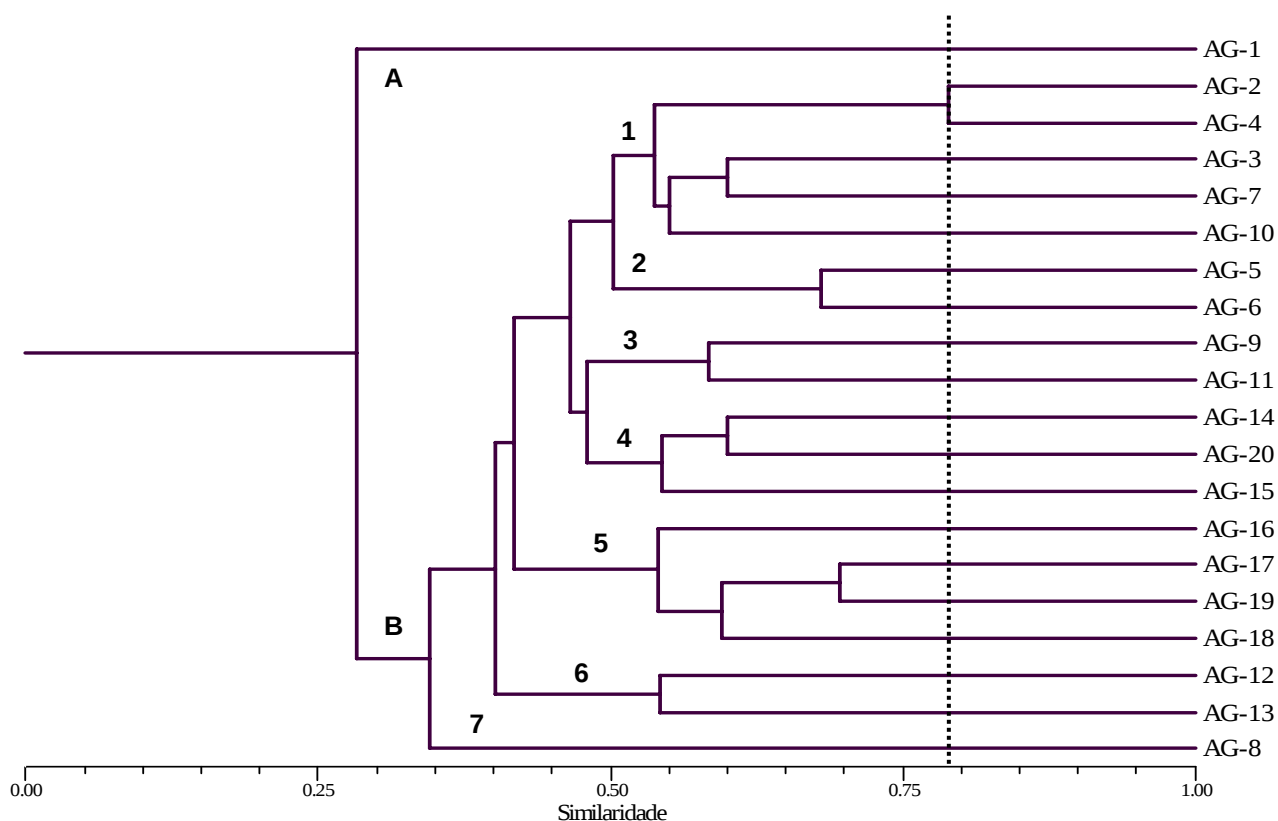


Figura 2 – Dendrograma construído a partir de dados obtidos de RAPD de uma população de 20 indivíduos de *A. gemmatalis* mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As letras indicam a formação de duas divisões principais dentro da população e os números indicam o número de sub-divisões. A linha pontilhada indica o limite máximo de similaridade do grupo.

A análise pelo programa NTSYS-pc utilizando-se os cinco primers de RAPD permitiu observar um elevado grau de variabilidade genética entre os indivíduos constituintes da população, que foi expressa em um índice de similaridade genética

inferior a 80 %. Observou-se a formação de duas divisões principais, sendo a divisão A composta apenas pelo indivíduo AG-1 apresentando 23 % de similaridade em relação aos demais indivíduos da população. Para a divisão B observou-se uma grande variabilidade com a formação de 7 subdivisões. Cada sub-divisão apresentou um agrupamento de 1 a 5 indivíduos. A partir dessas informações, observa-se uma elevada variabilidade genética dessa população o que sugere uma utilização mais extensa de primers de RAPD na busca de marcas genéticas que possam ser usadas para o monitoramento e identificação dessa espécie de lepidóptera.

Em virtude de seu amplo espectro de uso, a técnica de RAPD tem sido aplicada em diferentes níveis de estudo na caracterização molecular tanto de populações de insetos-praga quanto das possíveis espécies relacionadas. Monnerat et al. (2004), por exemplo, demonstraram que não havia variabilidade genética intra-populacional em três espécies de *Diadegma* (Himenoptera: Ichneumonidae), um importante parasitóide de larvas das traças das crucíferas *Plutella xylostella*. Além disso, a partir dos marcadores moleculares gerados por RAPD é possível o desenvolvimento de primers específicos para as espécies de lepidópteros. Essa estratégia foi aplicada por Agusti et al. (1999) que desenvolveram primers específicos para a detecção de *H. armigera* no intestino de possíveis predadores dessa espécie. Usando a técnica de RAPD gerou-se um fragmento de 1200 pb - presente apenas em *H. armigera* e ausente no predador *Dicyphus tamaninii* - que foi então usado para a obtenção de um par de primers específico para essa região em *H. armigera*. Com essa estratégia foi possível detectar o inseto no intestino do respectivo predador. Dessa forma, os marcadores moleculares obtidos por RAPD mostram-se úteis para o desenvolvimento de várias estratégias para o estudo da dinâmica das populações de lepidópteros, assim como, para a caracterização de potenciais agentes de biocontrole.

Contudo, o sucesso na obtenção de marcadores moleculares via RAPD é dependente da qualidade do DNA obtido a partir dos tecidos do inseto. A técnica de extração utilizada nesse trabalho, forneceu DNA com qualidade para analisar a variabilidade genética de uma população de *A. gemmatilis* utilizando-se primers de RAPD. O uso de apenas 5 primers permitiu analisar a variabilidade genética de uma colônia. Essa estratégia poderá ser utilizada para se estudar futuras modificações de marcadores moleculares quando novos indivíduos forem introduzidos na colônia. Além disso, com a técnica de extração de DNA foi possível obter DNA a partir de

indivíduos de terceiro instar, permitindo analisar os marcadores moleculares em estágios iniciais do desenvolvimento desses insetos. Uma futura aplicação poderá ser o desenvolvimento de um banco de marcadores moleculares de RAPD para o monitoramento dessa espécie em campo.

CONCLUSÃO

O protocolo de extração modificado para uso nesse trabalho produziu DNA em quantidade e em qualidade para as reações de amplificação usando primers de RAPD. Esses primers produziram perfis eletroforéticos para a caracterização e a análise da variabilidade genética dos indivíduos de uma população de *A. gemmatilis*, fornecendo bandas de DNA com potencial de uso para o desenvolvimento de marcadores específicos para a identificação dessa espécie de lepidóptera em campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUSTI, N.; DE VICENTE, M. C.; GABARRA, R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1467-1474, 1999.

CIAMPI, A. Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. **Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 60).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

GAZZONI, D. L.; YORINIORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995. 128p.

HOFFMANN, C. B.; FOERSTER, L. A.; NEWMAN, G. G. Incidência estacional de *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson em *Anticarsia gemmatalis* Hubner 1818 e *Plusia* spp. Relacionados com fatores climáticos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 1., 1979, Londrina. **Anais...** Londrina: Centro Nacional de Pesquisa da Soja, 1979. v. 2. p. 11-15.

MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S.; BERTIOLI, D.; BUTT, T.; BORDAT, D. Variabilidade Genética do Parasitóide *Diadegma* sp. através de RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 90-92, 2004.

MOSCARDI, F., CARVALHO, R. C. Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v. 22, p. 267-80, 1993.

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; LIMA, L. H. C. **Análise da variabilidade genética de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 75).

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: Numerical Taxonomy and Multivariate System. Version 2.9. New York: Applied Biostatistics, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.