

Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético

GUIMARÃES

C.T.

2000

Marcelo Abreu Lanza¹
Cláudia Teixeira Guimarães²
Ivan Schuster³

Resumo - O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, quer pela maior produtividade, quer pela melhor adaptação aos ambientes adversos. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente de algumas etapas como a escolha de genitores que produzam indivíduos com a melhor combinação de alelos favoráveis e a seleção de genótipos superiores em populações segregantes. Uma potente ferramenta para auxiliar o melhoramento são os marcadores moleculares, que fornecem um número ilimitado de polimorfismos com base no DNA e são independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis. Os avanços nas técnicas moleculares, na bioinformática e na genética quantitativa têm contribuído de forma sinérgica para o atual nível de conhecimentos sobre a estrutura genética de várias espécies cultivadas e silvestres. Assim, várias são as aplicações dos marcadores moleculares, tanto para auxiliar programas de melhoramento, quanto em estudos de variabilidade genética, identificação de cultivares, proteção dos direitos do melhorista, avaliação da pureza genética de sementes, mapeamento genético e ampliação dos conhecimentos na organização dos genomas.

Palavras-chave: Variabilidade genética; Genoma; Alelos; Polimorfismo.

INTRODUÇÃO

No início, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos determinados por mutações simples em um gene particular, gerando alterações fenotípicas de fácil identificação no organismo. Os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica. No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações limitaram sua utilização (Guimarães & Moreira, 1999).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente. Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos por fornecer um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e por ser independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa dos genótipos em estágios iniciais do desenvolvimento. O avanço das técnicas moleculares tem sido acompanhado de perto pelo grande desenvolvimento nas

áreas da bioinformática e da genética quantitativa. A aplicação dessas técnicas para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem como consequência grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas.

MARCADORES MOLECULARES

RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) foi o primeiro marcador de DNA a ser utilizado na construção de mapas genéticos na espécie humana (Botstein et al., 1980). Em pouco tempo, os marcadores RFLPs estavam entre os mais utilizados em várias áreas da genética vegetal. A técnica

¹Eng^a Agr^a, M.Sc., Pesq. EPAMIG-CTTP, Caixa Postal 351, CEP 38001-970 Uberaba-MG.

²Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. EMBRAPA Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas-MG. E-mail: claudia@cnpms.embrapa.br

³Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. UFV-BIOAGRO, CEP 36571-000 Viçosa-MG.

do RFLP baseia-se na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição.

Os fragmentos gerados de DNA são separados em gel de agarose e transferidos para membranas de nylon ou nitrocelulose, onde são hibridizados com sondas de DNA, detectando seqüências genômicas homólogas a elas. As sondas são seqüências de DNA marcadas com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes. Após cada hibridização, as membranas contendo os fragmentos de DNA fixados são expostas a um filme de raios X e submetidas ao processo de revelação.

O polimorfismo é obtido, quando ocorre perda ou surgimento de sítios de restrição, que são seqüências específicas de quatro a seis nucleotídeos reconhecidas pelas enzimas de restrição utilizadas na digestão do DNA. Inserções, deleções ou outros rearranjos, quando ocorrem entre dois sítios de restrição, também alteram o tamanho dos fragmentos, que são detectados por possuir uma região homóloga à sonda de DNA. Esses fragmentos serão polimórficos, quando apresentar qualquer um dos rearranjos genéticos já citados, sendo então utilizados na caracterização de indivíduos geneticamente diferentes. Os marcadores RFLPs apresentam herança co-dominante, sendo possível a identificação de genótipos homozigotos e heterozigotos. Essa característica é uma das vantagens do RFLP, uma vez que permite uma análise mais detalhada da ação gênica e da interação entre alelos em estudos de mapeamento de características quantitativas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Outra importante vantagem dos RFLPs é o fato de representarem locos únicos em cada genoma e de possibilitar a utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre espécies correlacionadas. A Figura 34 ilustra as bases moleculares dos diferentes marcadores moleculares e indica quando estes são dominante ou co-dominante.

Uma grande limitação da técnica de RFLP é a necessidade de construir bibliotecas genômicas para a obtenção das sondas. Tal limitação é, em parte, superada na maioria das culturas de interesse econômico, para as quais existe uma grande

disponibilidade de sondas de DNA, que podem ser obtidas gratuitamente de instituições públicas internacionais. Sondas heterólogas também podem ser utilizadas entre espécies ou gêneros afins. Outra limitação é a sua complexidade técnica, o que requer laboratórios bem equipados e mão-de-obra especializada.

RAPD

O advento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mullis & Faloona, 1987) e seus posteriores avanços, utilizando uma enzima *DNA polimerase* termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento, imprimiram grande automatização à síntese *in vitro* de DNA. A técnica de PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA, delimitado por um par de *primers* de seqüências específicas de nucleotídeos de fita simples. *Primers* são seqüências curtas de DNA, que pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA. As reações ocorrem em ciclos alternados de temperatura, sendo que cada ciclo do PCR envolve três etapas. Na primeira, ocorre a desnaturação da fita dupla de DNA, posteriormente, os *primers* pareiam-se com as seqüências complementares específicas que flanqueiam o sítio-alvo, e então a nova fita de DNA é sintetizada a partir das extremidades 3'-OH livres

dos *primers* por meio da enzima *DNA polimerase*. Como cada ciclo é repetido várias vezes, a amplificação do DNA-alvo ocorre em progressão geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de DNA-molde.

A facilidade, a rapidez e a sensibilidade dessa técnica possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares com base em PCR. O primeiro deles foi o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Williams et al., 1990) ou *Arbitrarily Primed-PCR* (AP-PCR) (Welsh & McClelland, 1990). O RAPD é uma variação da técnica de PCR que utiliza um único *primer* de dez nucleotídeos e com seqüência arbitrária. Portanto, para que um fragmento de DNA seja amplificado, duas regiões complementares ao *primer* devem estar separadas por até 2.000 pb e em orientações opostas. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA, distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência do DNA. A detecção dos produtos de amplificação é feita em gel de agarose tratado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. As bases moleculares do polimorfismo de RAPD são mutações de ponto, ou deleções no sítio de pareamento do *primer*, ou inserções entre os sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal que impossibilita a sua amplificação. O RAPD é uma técnica de fácil execução de custo

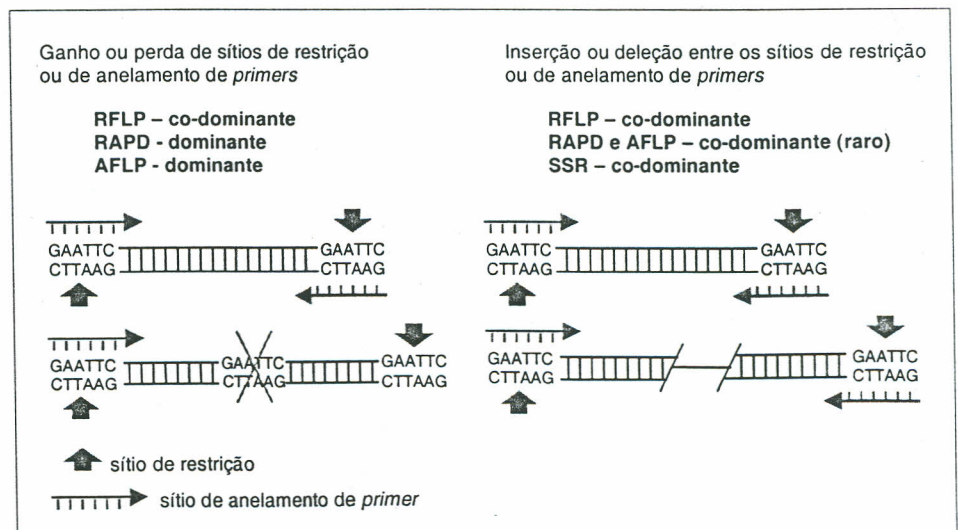


Figura 34 - Bases moleculares dos marcadores de DNA

FONTE: Dados básicos: Paterson (1996).

reduzido e aplicável a qualquer tipo de organismo. No entanto, existem problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que são marcadores dominantes. Este tipo de marcador possibilita a detecção de apenas um alelo por locos, sendo que a presença de uma banda no gel identifica indivíduos homocigotos dominantes (AA) e heterocigotos (Aa), não permitindo a distinção entre eles. O homocigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda.

Os avanços no processo de seqüenciamento de DNA e os projetos de seqüenciamento de genomas eucariotos têm possibilitado um grande acúmulo de informações no nível das seqüências de DNA. Com isso, marcadores RFLP, RAPD e informações de seqüências gênicas podem ser convertidos em *primers* específicos para ser utilizados em análises genéticas detalhadas por meio da técnica de PCR. Sondas genômicas de RFLP, utilizadas no mapeamento do genoma humano, foram os primeiros marcadores a serem seqüenciados e amplificados com *primers* específicos, sendo denominados *Sequence Tagged Site* (STS) (Olson et al., 1989). Quando as sondas a serem seqüenciadas são obtidas de bibliotecas de cDNA, elas passam a ser denominadas *Expressed Sequence Tags* (EST). Os fragmentos de DNA obtidos pela amplificação específica das sondas de RFLP podem ser clivados com enzimas de restrição, revelando um tipo de marcador molecular conhecido como *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPS) (Konieczny & Ausubel, 1993 e Jarvis et al., 1994). Esses marcadores apresentam as vantagens práticas do PCR, mantendo a natureza co-dominante e alélica do RFLP. Marcadores RAPD também podem ser seqüenciados e convertidos em *primers* específicos para amplificação por PCR. Tais marcadores são denominados *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) (Paran & Michelmore, 1993) e apresentam uma vantagem sobre o RAPD que é a elevada especificidade da amplificação, embora mantenham a sua natureza dominante.

Microssatélites ou SSR

Os genomas eucarióticos apresentam várias classes de seqüências repetidas e uma delas consiste em tandem de um a quatro nucleotídeos, sendo denominadas microssatélites (Litt & Luty, 1989) ou *Simple Sequence Repeats* (SSR). A seqüência de DNA que flanqueia estas regiões contendo repetições curtas são conservadas dentro de uma espécie, permitindo a seleção de *primers* de PCR que podem ser utilizados para amplificar os SSRs. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos obtidos é devido ao número diferente de repetições das seqüências simples. Os marcadores microssatélites tornaram-se rapidamente os mais utilizados pelos geneticistas de humanos,

para o desenvolvimento de mapas de ligação e para a identificação de indivíduos. Em plantas, os microssatélites são muito frequentes e distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sendo amplamente utilizados na construção de mapas genéticos. Os microssatélites apresentam-se como uma das classes de marcadores mais promissoras para a ampla utilização nos programas de melhoramento, uma vez que são marcadores co-dominantes e multialélicos (Fig. 35), fornecendo um elevado nível de informação genética por loco. Rongwen et al. (1995), utilizando sete *primers* microssatélites para caracterizar 96 genótipos de soja, encontraram de 11 a 26 alelos por loco. Para marcadores RFLP, Keim et al. (1989, 1992)

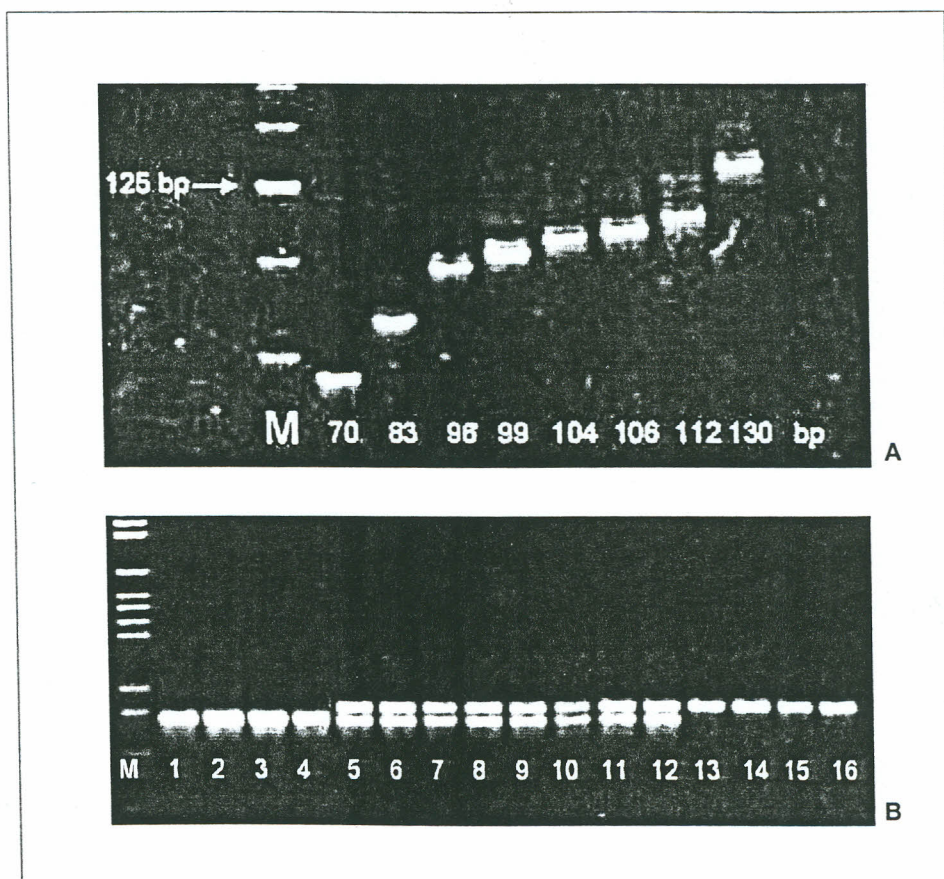


Figura 35 - Padrões de amplificação de microssatélite

NOTA: Figura 33A - Padrão de amplificação do microssatélite SSR7 em oito linhagens elites de milho resolvidos em gel 8% de poliácridamida não denaturante discriminando oito alelos diferentes. M é o marcador de peso molecular 25 bp ladder e o tamanho de cada um dos alelos está descrito abaixo em pares de base (bp); Figura 33B - Padrão de amplificação do microssatélite Sat038 em uma população F_2 de soja, segregando para resistência à raça 3 do Nematóide de Cisto da Soja, resolvido em gel de agarose 3%. Canaletas 1-4, plantas homocigotas resistentes, 5-12 plantas heterocigotas, 13-16 plantas homocigotas suscetíveis. M é o marcador de peso molecular (DNA do fago Lambda digerido com *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*).

utilizaram de início 17 sondas de RFLP para caracterizar 58 genótipos de soja e, posteriormente, 132 sondas de RFLP para caracterizar 38 genótipos de soja. Apenas duas sondas no primeiro experimento e três no segundo apresentaram mais de dois alelos.

Pelo fato de serem co-dominantes, marcadores microsatélites, quando ligados a locos de interesse, permitem obter informações sobre o tipo de ação gênica de interações entre diferentes locos. Marcadores SSRs são altamente reproduzíveis e estáveis dentro de uma determinada espécie, permitindo o intercâmbio de informações entre diferentes grupos de pesquisa, o que facilita grandemente sua utilização na seleção assistida e na integração de mapas genéticos.

A técnica de SSR é de fácil execução e pode ser amplamente automatizada pelo fato de se basear em PCR. No entanto, o polimorfismo deve ser detectado em géis de alta resolução, em função das pequenas diferenças de tamanho entre os segmentos amplificados, em termos de pares de base. A maior limitação do método é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam as regiões altamente repetitivas ou os microsatélites. Esta etapa requer a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com os microsatélites de interesse, metodologias eficientes para o *screening* das bibliotecas e seqüenciamento de DNA em larga escala, necessitando de laboratórios com uma infra-estrutura bastante especializada. Esta limitação está sendo vencida rapidamente, sendo que, para diversas espécies de importância econômica, já existe no mercado um grande número de *primers* SSR, o que possibilita a utilização da técnica com a mesma infra-estrutura utilizada para o RAPD ou PCR convencional, necessitando apenas de cubas adicionais para eletroforese em géis de acrilamida. Com isso, a técnica de SSR torna-se compatível com RAPD ou PCR convencional, em termos de custo. Além disso, como apenas um loco é amplificado em cada indivíduo, é possível utilizar *primers multiplex* no mapeamento genético, tornando a técnica ainda mais barata. Esta estratégia consiste na utilização de dois ou mais pares de *primers*

na mesma reação de PCR. Os *primers* componentes do *multiplex* não podem possuir homologia cruzada e devem amplificar alelos de tamanhos diferentes.

AFLP

O *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP) é uma classe recente de marcadores, que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade da amplificação do PCR, apresentando-se como uma ferramenta poderosa na caracterização de genomas e no mapeamento genético (Vos et al., 1995). A técnica baseia-se na digestão simultânea do DNA genômico com duas enzimas de restrição, sendo *EcoRI* e *MseI* as mais usadas. Adaptadores específicos, com terminais complementares às extremidades coesivas dos sítios de restrição, são ligados aos fragmentos de DNA digeridos. São utilizados dois adaptadores específicos, sendo um para cada sítio de restrição. Os fragmentos digeridos e com os adaptadores ligados a eles são submetidos a uma reação de PCR com *primers* pré-seletivos, cuja seqüência é complementar à dos adaptadores, acrescidos de um nucleotídeo arbitrário na sua extremidade 3'. A amplificação pré-seletiva é realizada com o objetivo de aumentar a proporção dos fragmentos de interesse, com os sítios de restrição de *EcoRI* e *MseI*, e de fazer uma seleção inicial desses fragmentos. Os fragmentos pré-amplificados são então submetidos às reações de amplificação seletiva, utilizando *primers* com a mesma seqüência dos *primers* pré-seletivos acrescida de dois nucleotídeos arbitrários na sua extremidade 3'. A detecção dos fragmentos polimórficos é feita em gel de seqüenciamento, utilizando um dos *primers* seletivos marcados com radioatividade ou com fluorescência. A Figura 36 (p.65) exemplifica um resultado de AFLP em uma população F₂ de cacau, utilizando *primers* fluorescentes, analisados por meio do seqüenciador automático ABI377 (Queiroz, 1999).

Uma das vantagens do AFLP é o grande poder de detecção de variabilidade genética, uma vez que a técnica explora polimorfismos de restrição e de amplificação. Dessa forma, é resolvido um grande

número de fragmentos polimórficos em um único gel de seqüenciamento. Como os *primers* utilizados nas etapas de amplificação são longos, em torno de 20 pb, a especificidade das reações é aumentada significativamente, quando comparada com o RAPD. Assim, o AFLP alia a vantagem de explorar regiões genômicas arbitrárias, sem a necessidade do conhecimento prévio das seqüências do DNA, com a elevada especificidade da técnica de PCR. Uma das limitações do AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco que, à semelhança do RAPD, também são marcadores essencialmente dominantes. Como o AFLP é realizado em várias etapas, incluindo a digestão do DNA com enzimas de restrição, é uma técnica trabalhosa, que necessita de DNAs genômicos de alta qualidade e de um maior número de reagentes, tornando-a também mais cara. Outro fato que contribui para aumentar a complexidade do AFLP é que a resolução dos polimorfismos precisa ser realizada em géis de seqüenciamento, utilizando radioatividade ou fluorescência, e nem todos os laboratórios estão capacitados para trabalhar com tais metodologias.

APLICAÇÕES DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético.

Diversidade genética e seleção de genitores

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam uma ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para a avaliação da diversidade genética, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos em programas de melhoramento genético e na manutenção de bancos de germoplasma. Os genótipos são avaliados por meio dos marcadores e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas, e as não-comuns, como diferenças genéticas. Os resultados são codificados

de forma que gere uma matriz de similaridade (ou dissimilaridade), que pode ser graficamente interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada.

A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos são etapas de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento (Borém, 1997). Estas etapas podem ser auxiliadas por meio dos marcadores moleculares, que fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos, aumentando a probabilidade de obtenção de cultivares superiores. A identificação e seleção de genitores superiores são críticas em espécies perenes, como frutíferas e essências florestais, uma vez que o tempo para obtenção de uma cultivar melhorada é bastante longo.

A caracterização molecular da diversidade genética entre 38 cultivares de soja brasileiras, por meio de marcadores RAPD, foi estreitamente correlacionada com dados genealógicos, tendo grande utilidade na seleção de genitores para o Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja para a Agroindústria da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Abdelnoor et al., 1995). O estudo da diversidade genética entre genitores de feijoeiro, utilizando marcadores RAPD e proteínas de reserva, agrupou corretamente as cultivares em dois grupos de acordo com a origem evolutiva, permitindo uma caracterização mais detalhada dos genótipos dentro de cada grupo (Vasconcelos et al., 1996). A escolha de genitores mais divergentes, dentro de um grupo de linhagens-elite de soja, com base em marcadores moleculares, gerou híbridos F_1 mais produtivos (Miranda, 1998). Em programas de retrocruzamento, a seleção de genitores doadores de genes de interesse que sejam geneticamente mais similares aos genitores recorrentes permite a recuperação mais rápida do genoma destes. Desse modo, o estudo da diversidade genética auxiliado por marcadores moleculares pode direcionar cruzamentos, favorecendo a obtenção de cultivares superiores.

O estudo da diversidade genética dentro dos bancos de germoplasma gera informações que têm como objetivo otimizar a manutenção e o manejo das coleções bá-

sicas, além de facilitar o acesso dos melhoristas às coleções. A caracterização de linhagens de milho em grupos heteróticos é de fundamental importância na escolha dos genitores para a obtenção de híbridos com elevada performance agrônômica. Medidas de distância genética por meio de RFLP têm sido utilizadas na classificação de linhagens de milho em grupos heteróticos, bem como a alocação de novas linhagens de origem desconhecida nos diferentes grupos (Dudley et al., 1992 e Livini et al., 1992). O monitoramento de cruzamentos em pomares de sementes de espécies florestais tem garantido uma combinação genética favorável entre indivíduos selecionados (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Fingerprinting e proteção de cultivares

A caracterização de variedades, linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países em que já vigoram as leis de proteção de cultivares. Com a aprovação, no Brasil, da Lei de Proteção de Cultivares, Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997 (Brasil..., 1997), o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), órgão vinculado ao Ministério da Agricultura, ficou responsável pelo registro e proteção de novas variedades. Para que uma variedade seja protegida, é necessário demonstrar que ela é diferente de qualquer outra da mesma espécie. Atualmente, a proteção de cultivares é feita com base em descritores morfológicos, tais como, coloração de flor e pubescência, hábito de crescimento, forma da folha, ciclo, resistência a doenças, entre outras. Em espécies que possuem uma base genética estreita, como é o caso da soja, em que as variedades são obtidas pela hibridação entre um grupo elite de parentais geneticamente semelhantes, as novas variedades tendem a ser muito semelhantes e muitas vezes indistinguíveis com base nestas características. Além disso, com o aumento do número de variedades protegidas no banco de dados do SNPC, torna-se cada vez mais difícil distinguir uma nova variedade daquelas já

existentes. Então, um sistema com base em marcadores de DNA e que possa identificar um padrão único de combinação destes marcadores, como uma "impressão digital" (*fingerprint*), para cada variedade, torna-se necessário para facilitar a proteção de novas variedades, e assegurar os direitos de propriedade intelectual dos melhoristas. Com a utilização de marcadores multialélicos e altamente conservados, como os SSR, é possível obter um padrão único para cada variedade. Rongwen et al. (1995), utilizando sete marcadores de microssatélite, conseguiram distinguir 95 entre 96 genótipos de soja. Os dois únicos genótipos que possuíam alelos idênticos nos sete locos eram estreitamente aparentados (93,4% de similaridade com base na genealogia). Russell et al. (1997), estudando 11 locos de SSR em 24 genótipos de cevada, encontraram três combinações de quatro SSR, que identificaram todos os genótipos avaliados. Estes autores conseguiram distinguir inclusive duas linhas irmãs, que possuíam distância nula, com base na genealogia.

Marcadores moleculares, pelo fato de discriminarem a contribuição genética de cada genitor na sua descendência, podem ser utilizados para o controle da pureza genética de sementes híbridas ou de linhagens, para a determinação da taxa de polinização cruzada em espécies autógamas e para a avaliação do tipo de fecundação predominante em espécies ainda pouco estudadas. A capacidade de discriminação dos métodos de *fingerprinting* molecular depende do número de marcadores utilizados e da frequência de cada loco dentro da espécie (Ferreira & Grattapaglia, 1998), sendo necessário um estudo prévio da variabilidade genética dos locos para cada espécie a ser avaliada.

Análise de pureza genética de sementes

Da mesma forma como os marcadores com base no DNA são úteis na identificação de cultivares, tornam-se também uma importante ferramenta na identificação das misturas varietais em análises de pureza genética de sementes, com a finalidade de certificação ou fiscalização de sementes.

Comumente, misturas varietais são identificadas com base em características observadas na semente, na plântula e, em alguns casos, com auxílio de eletroforese de proteínas da semente. Em soja, por exemplo, a análise de pureza genética de sementes é feita comumente pela cor do hilo e do hipocótilo e reação à peroxidase. Estes caracteres são pouco informativos, pois tanto a cor do hipocótilo, quanto a reação à peroxidase só permitem dois resultados possíveis, sendo que a combinação de ambos classifica as variedades em quatro grupos distintos. Cor de hilo apresenta um número maior de resultados possíveis, representados pelas diversas cores e tonalidades de hilo existentes. Entretanto, algumas variedades, em função de condições ambientais particulares, podem apresentar tonalidades diferentes da cor de hilo e, com isso, confundir a discriminação entre variedades com cores parecidas. É o caso de variedades com hilo preto imperfeito, que podem ser confundidas com as que possuem hilo preto, ou mesmo hilo marrom.

O laboratório de Genética Molecular de Plantas, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGROBIOMOL) da UFV tem realizado, a pedido da Delegacia Regional do Ministério da Agricultura e do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), análises com base no DNA, para investigação de pureza genética em sementes de soja. Sementes consideradas atípicas por possuírem hilo de coloração diferente do padrão definido para a variedade são submetidas à análise de DNA, com marcadores SSR e sementes da variedade da qual as sementes atípicas foram obtidas. Os resultados têm demonstrado que nem sempre a diferença na cor do hilo significa mistura varietal. Em alguns casos, sementes de hilo preto imperfeito encontradas em lotes de sementes de hilo marrom são geneticamente idênticas às sementes do lote. O uso de marcadores com base no DNA constitui-se uma ferramenta auxiliar muito poderosa na análise de pureza genética de sementes, aplicável sempre que a caracterização visual permitir dúvidas. Até o momento, este tipo de análise tem sido feita, explorando-se ao máximo a representatividade do genoma, pela utilização de

primers bem distribuídos no mapa genético da cultura. Além das sementes atípicas, são também analisadas várias sementes do lote avaliado, para determinar a variabilidade intra-varietal, e ainda sementes de outras variedades, que são utilizadas como controle, principalmente quando as atípicas e as do lote são idênticas. Tal estratégia, que utiliza vários controles e uma amostragem dentro do lote de sementes, contribui para o aumento no tempo e no custo das análises. Assim, surge a necessidade de obter uma caracterização molecular das variedades das diversas culturas economicamente importantes, por meio de marcadores com base no DNA. Além de acelerar e reduzir os custos das análises de pureza genética de sementes, este *fingerprinting* molecular será de grande utilidade nos processos de proteção de cultivares. Dessa forma, bastará analisar as sementes atípicas com os *primers* que caracterizam a variedade e comparar os alelos obtidos com aqueles característicos da variedade. Além disso, com a utilização de DNA extraído da própria semente (McDonald et al., 1994), os resultados podem ser obtidos em um espaço de tempo ainda mais curto, compatibilizando seu uso com a análise para certificação de sementes.

Melhoramento genético auxiliado por marcadores moleculares

Retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de genes por meio de retrocruzamento é o exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores. Germoplasmas não-adaptados têm sido utilizados em programas de melhoramento com o objetivo de introduzir características de herança simples, como resistência a doenças. O uso de marcadores moleculares ligados a genes de interesse é de grande importância na seleção de genótipos resistentes, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo introduzir dois ou mais genes de resistência, quando o fenótipo é de determinação complexa, ou quando o processo de avaliação requer a

destruição da planta, como é o caso de nematóide do cisto em soja.

Além de monitorar a presença do gene de interesse, a genotipagem molecular dos indivíduos permite a seleção daqueles mais semelhantes ao genótipo recorrente e com melhor conversão na região próxima ao gene introduzido. Desse modo, o número de ciclos de retrocruzamentos necessários para a recuperação do genótipo recorrente é reduzido de forma acentuada, acelerando o desenvolvimento de variedades melhoradas (Openshaw et al., 1994).

Identificação de marcadores associados a caracteres de interesse

Grande parte desses trabalhos tem sido desenvolvida associando-se marcadores moleculares a caracteres de herança simples, uma vez que as variações fenotípicas são de fácil mensuração e análise. Linhagens isogênicas são aquelas geneticamente semelhantes (exceto na região genômica onde um gene de interesse foi introduzido), desenvolvidas por meio de ciclos sucessivos de retrocruzamentos. Pelo fato de essas linhagens apresentarem diferenças genéticas apenas na região de interesse, elas têm sido utilizadas com bastante sucesso na identificação de marcadores ligados a genes de resistência em várias espécies de importância econômica, como ao vírus TMV em tomate (Young et al., 1988), a *Pseudomonas* em tomate (Martin et al., 1991) e a *Phytophthora megasperma* em soja (Diers et al., 1992).

Outra estratégia que tem revolucionado a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres de herança simples é a técnica de *bulks* segregantes, *Bulked Segregant Analysis* (BSA), proposta por Michelmore et al. (1991). Essa metodologia baseia-se na construção de dois *bulks* de DNA contrastantes para uma característica fenotípica entre os indivíduos de uma população segregante. Cada *bulk* é constituído de uma mistura de DNAs de indivíduos de uma população segregante com fenótipo semelhante para a característica de interesse. Dessa forma todos os indivíduos que compõem um *bulk* compartilham uma mesma região genômica que contém o gene

de interesse e segregam para as demais regiões. Assim, o marcador que co-segregar com os *bulks* tem uma grande probabilidade de estar ligado à característica avaliada, sem necessitar da genotipagem de um grande número de indivíduos nem da construção de um mapa genético saturado.

Vários exemplos demonstram o sucesso da técnica de BSA, como a identificação de marcadores RAPD e RFLP ligados a genes de resistência ao míldio em alface (Michelmore et al., 1991, Paran et al., 1991 e Paran & Michelmore, 1993). Alzate-Marin (1996), utilizando a análise de *bulks* segregantes, identificou marcadores RAPD ligados em fase de acoplamento e de repulsão a genes de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro. De forma similar, foi identificado um marcador RAPD co-dominante, ligado ao gene que confere resistência ao cancro da haste da soja (Carvalho, 1995). Regiões genômicas que controlam outras características importantes como amadurecimento do fruto e abscisão do pedicelo em tomate, foram também detectadas utilizando essa estratégia (Giovannoni et al., 1991). A estratégia de BSA também pode ser utilizada na identificação de locos controladores de caracteres quantitativos - *Quantitative Trait Loci* (QTLs), que possuam grande efeito sobre a característica de interesse (QTLs) de efeito maior. Utilizando esta estratégia, Schuster (1999) identificou seis marcadores moleculares (quatro RAPD e dois SSR) associados à resistência da soja ao nematóide de cisto (soja (NCS). Estes seis marcadores moleculares formaram um grupo de ligação contendo um QTL responsável por 56% da resistência à raça 9 e 39% da resistência à raça 14 do NCS. Cervigni (1999) identificou dois marcadores SSR, flanqueando um QTL que responde por 30% da resistência da soja à raça 3 do NCS (Fig. 35B).

A identificação de marcadores ligados a genes que conferem resistência a vários patógenos permite monitorar e acelerar a introgressão destes genes em cultivares comerciais, além de possibilitar a piramidação de dois ou mais genes de resistência em uma cultivar comercial. Marcadores

ligados a genes de interesse fornecem um ponto de partida para a clonagem de genes que se baseia em mapa.

Mapeamento de caracteres complexos

A maioria dos caracteres de importância econômica está sob controle genético complexo, envolvendo a ação de vários genes, o que torna difícil sua manipulação e compreensão. Regiões genômicas contendo locos gênicos associados a tais caracteres quantitativos são denominados QTLs. Marcadores moleculares analisados por metodologias estatísticas implementadas em programas de mapeamento de QTLs têm possibilitado a dissecação dos caracteres complexos em fatores mendelianos simples. O mapeamento de QTLs possibilita estimar o número e a localização de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude dos seus efeitos e as interações com outros QTLs. A habilidade de detectar QTLs por meio de marcadores moleculares é função da magnitude do efeito do QTL, do tamanho da população em estudo e do nível de saturação do mapa genético.

O mapeamento de QTLs baseia-se em testes de associação entre marcadores moleculares e os dados fenotípicos por meio de várias metodologias estatísticas. Os procedimentos mais simples para a detecção de tais associações são os modelos de regressão linear e análise de variância, que analisam a distribuição dos valores fenotípicos para cada marcador, separadamente. Esta metodologia é de execução simples, bastante flexível e não requer a construção de mapas genéticos. Uma limitação dessa metodologia é não permitir a identificação da posição do QTL e não estimar a magnitude do seu efeito.

Uma alternativa para aumentar o poder de detecção das associações e para estimar o efeito e a posição dos QTLs tem sido o mapeamento por intervalo, proposto por Lander & Botstein (1989). Tal metodologia utiliza o método da máxima verossimilhança para estimar a posição mais provável e a magnitude do QTL no intervalo entre dois marcadores ligados no mapa genético (Lynch & Walsh, 1997). O mapeamento

por intervalo possui uma maior precisão nas estimativas do efeito e da posição do QTL, uma vez que analisa cada centiMorgan (cM) do genoma mapeado. No entanto, é uma metodologia mais complexa que necessita tanto da construção de mapas genéticos quanto da utilização de programas computacionais específicos para as análises. Atualmente, novos modelos têm sido propostos com o objetivo de aumentar a resolução do mapeamento de QTL, como o mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1993, 1994), múltiplos QTLs (Jansen, 1993) e o mapeamento por intervalos múltiplos (Kao et al., 1999).

Um dos problemas nas análises de QTLs é que o grande número de testes realizados dificulta o estabelecimento de níveis de significância estatística, o que pode ser uma fonte adicional de erro. Para aumentar a confiabilidade dos resultados, foram propostos testes de permutação não-paramétricos, com base na reamostragem dos dados originais (Churchill & Doerge, 1994 e Doerge & Churchill, 1996). Os testes de permutação são procedimentos poderosos na determinação de níveis de significância para as associações dos QTLs com marcadores, pelo fato de se ajustarem a cada experimento, independentemente da distribuição dos dados. Programas específicos para o mapeamento de QTLs contendo algoritmos apropriados para implementar vários dos procedimentos estatísticos descritos estão disponíveis para acesso público, na internet, como QTL Cartographer (Program..., 2000) e MapManager QT (Map..., 2000).

SAM

A seleção de características simples, com o auxílio de marcadores moleculares, tem grande utilidade quando a característica é de difícil medição, ou quando se deseja selecionar para diversas características simultaneamente, como no caso de piramidação de genes. No entanto, a seleção assistida por marcadores (SAM) tem sua maior contribuição na seleção de características quantitativas. Associações entre alelos de marcadores moleculares e alelos de QTLs podem ser usadas para selecionar, indiretamente, alelos favoráveis

de QTLs. Para caracteres de baixa herdabilidade, a seleção fenotípica é realizada em gerações mais avançadas, pois a herdabilidade e a acurácia estatística de estimar médias das progênes crescem com o aumento no número de repetições, gerações, locais e anos de teste, o que leva a uma ampliação muito grande no número de plantas a ser avaliado. Sendo assim, os melhoristas devem optar entre produzir estimativas mais precisas da média de um número menor de progênes ou amostrar um grande número de progênes, com estimativas menos precisas. A SAM apresenta-se como uma alternativa eficiente para permitir a seleção precoce de características de baixa herdabilidade. A seleção precoce diminui o número de plantas a ser analisado por família, permitindo a avaliação de um número muito maior de progênes. A SAM é mais efetiva em gerações iniciais de seleção entre progênes de cruzamentos entre linhas endogâmicas (Stromberg et al., 1994). Nestas gerações, a herdabilidade é baixa, pois o número de repetições é limitado, e o desequilíbrio de ligação é alto (Falconer, 1981). O paradoxo é que o poder de mapeamento de QTLs decresce, à medida que a herdabilidade abaixa, e é menor justamente para características que teoricamente sofreriam o maior impacto pela SAM (Lande & Thompson, 1990). Para evitar a detecção de falsas associações entre marcadores e QTLs, um nível de significância bastante alto é utilizado para declarar associação entre um marcador e um QTL. A utilização de níveis de significância bastante estridentes na escolha dos marcadores aumenta a acurácia da SAM e produz ganhos significativos desta sobre a seleção fenotípica. Trabalhos mais recentes tendem a utilizar a regressão múltipla do fenótipo aos marcadores, como o método de identificar a associação entre marcadores e QTLs, e estimar o efeito dos marcadores (Lande & Thompson, 1990, Zhang & Smith, 1992 e Gimelfarb & Lande, 1994). Regressão múltipla é um procedimento computacionalmente mais simples do que o método da máxima verossimilhança, produzindo resultados muito similares (Lande & Thompson, 1990 e Haley & Knott, 1992).

Os resultados de estudos teóricos e

experimentais permitem concluir que a SAM pode ser utilizada para aumentar substancialmente a eficiência dos programas de melhoramento (Edwards et al., 1987, Stuber et al., 1987 e Lande & Thompson, 1990). A eficiência da seleção assistida por marcadores, comparada com a seleção fenotípica, é afetada por diversos fatores, tais como a herdabilidade da característica, a cobertura do genoma pelos marcadores, identificação de associação entre marcadores e QTLs, tamanho e número de famílias, tipo de população e escolha do método de seleção assistida por marcadores. A seleção, utilizando marcadores flanqueando o QTL, também é mais eficiente do que a seleção com base em um único marcador. Edwards & Page (1994) obtiveram ganhos de seleção de 38% superiores, quando utilizaram marcadores flanqueando o QTL, em relação à seleção com base em um único marcador, quando os marcadores estavam longe do QTL (20% de recombinação). Com 5% de recombinação entre os marcadores e o QTL a vantagem foi de 11%. Lande & Thompson (1990) propuseram a teoria do índice de seleção, utilizando marcadores que maximizam a taxa de ganhos genéticos pela combinação das informações do polimorfismo nos locos dos marcadores genéticos com dados da variação fenotípica entre os indivíduos.

Este índice pode ser usado tanto para a seleção individual, como para a seleção de linhas. Porém, a utilização deste índice requer testes de progênes com repetições, para a obtenção dos valores fenotípicos. A seleção que se baseia apenas em marcadores pode ser utilizada e possui eficiência semelhante ao índice, quando p (a proporção da variância genética aditiva da característica que é associada com o loco marcador) for maior que $p > 0,5$ para características de baixa herdabilidade.

Muitas características de importância econômica são afetadas por vários QTLs. Além disso, em muitos casos, QTLs para diferentes características apresentam-se ligados (Stuber et al., 1987, Edwards et al., 1987, Jiang & Zeng, 1995 e Ribaut et al., 1997). QTLs para produção de grãos em milho, ligados em fase de repulsão, foram mapeados por Graham et al. (1997). Como na maioria dos programas de melhoramento,

o objetivo é melhorar a performance para diversas características simultaneamente, o número de QTLs envolvidos em um programa de melhoramento facilitado por marcadores moleculares deve ser grande. Devido à natureza intrínseca dos QTLs, e pelo fato de caracteres quantitativos serem controlados por um grande número de genes de pequeno efeito, a seleção recorrente assistida por marcadores moleculares é uma escolha apropriada para o melhoramento de populações. Através de ciclos sucessivos de seleção e intercrossamentos, a seleção recorrente favorece a quebra de ligações genéticas, facilitando a recombinação entre genes e aumentando a frequência de alelos favoráveis nas populações de melhoramento. O uso da seleção assistida por marcadores moleculares permite a identificação de combinações favoráveis de alelos, permitindo maiores ganhos com a seleção. Xie & Xu (1998b) apresentaram uma comparação teórica entre diversos métodos de seleção recorrente com base em famílias e seleção massal, utilizando seleção assistida por marcadores e seleção fenotípica. A seleção recorrente assistida por marcadores foi duas vezes mais eficiente do que a seleção fenotípica, com famílias de tamanho pequeno, baixa herdabilidade e alta proporção da variação fenotípica explicada pelos marcadores (p). Com o aumento da população, aumento da herdabilidade e diminuição de p , a vantagem da seleção assistida por marcadores diminuiu. Seleção assistida por marcadores é mais competitiva com a seleção fenotípica tradicional, quando a característica possui baixa herdabilidade. Se o objetivo do programa de melhoramento é maximizar a resposta por unidade de custo, a seleção assistida por marcadores pode ser inferior à seleção fenotípica, quando a herdabilidade é superior a 30% e o custo da avaliação fenotípica por indivíduo é menor do que a genotipagem do loco marcador (Xie & Xu, 1998a).

CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

O marco inicial do mapeamento genético foi o reconhecimento do fenômeno da ligação genética explicado por Morgan

(1910). Os primeiros mapas genéticos de espécies cultivadas (MacArthur, 1934 e Emerson et al., 1935) foram construídos antes mesmo do material genético ser atribuído ao DNA. O mapeamento genético baseia-se na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, uma vez que a probabilidade de ocorrer permutas genéticas entre dois marcadores é menor, quanto mais próximos eles estiverem localizados. Tal fato torna possível ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos, tendo em vista que o genoma eucarioto é organizado e transmitido como unidades lineares. Com o aumento da disponibilidade de marcadores genéticos e de metodologias estatísticas implementadas em programas computacionais apropriados, existem atualmente mapas genéticos saturados para a maioria das espécies cultivadas.

A distância genética entre os locos é medida em termos de frequência de recombinação, que é a probabilidade de ocorrência de permuta genética entre dois marcadores. A distância de mapeamento, expressa em centiMorgans (cM), é calculada com base na frequência de recombinação por meio de funções de mapeamento que corrigem as distorções entre a conversão das unidades. A função de Haldane é a mais simples e admite que as permutas genéticas ocorrem ao acaso e são independentes. Já a função de Kosambi considera interferência parcial nos cálculos da distância em centiMorgans. A interferência é o fato de que uma permuta genética afeta a ocorrência de outras em regiões adjacentes próximas a ela, considerando, desta forma, a ocorrência de *crossing-overs* duplos. A precisão na medida da distância genética é diretamente proporcional ao tamanho da população e ao número de marcadores analisados.

Para um marcador ser utilizado no mapeamento genético, ele deve ser polimórfico entre os indivíduos parentais e apresentar uma segregação mendeliana esperada na progênie. Marcadores, cuja segregação é estatisticamente validada pelo teste de Qui-quadrado, são agrupados e ordenados em cada grupo de ligação com base nas análises de segregação des-

tes em uma população de mapeamento, por meio de pacotes computacionais apropriados, como MapMaker (Lander et al., 1987) e JoinMap (Stam, 1993). Vários tipos de populações segregantes podem ser utilizados no mapeamento genético, dependendo do hábito reprodutivo da espécie, do objetivo do estudo e do tempo disponível. A população F_2 é bastante utilizada, uma vez que pode ser obtida com apenas dois ciclos de cruzamentos e representa todas as possíveis combinações alélicas (AA, Aa e aa), possibilitando a estimativa do mecanismo de ação gênica e das interações com outros locos. Linhagens recombinantes endogâmicas (RILs) são obtidas por meio de autofecundações sucessivas dos indivíduos F_2 até atingirem níveis desejáveis de homozigose. As populações recombinantes endogâmicas são também utilizadas na construção de mapas (Burr et al., 1988), com a vantagem de que os genótipos são perpetuados em função do elevado nível de homozigose, permitindo a avaliação fenotípica em diferentes locais, a quantificação da interação genótipo x ambiente e o intercâmbio entre informações genéticas geradas por diferentes grupos de pesquisa. A ausência de heterozigose é, em parte, compensada pelos ciclos sucessivos de autofecundação, que criam maiores oportunidades de ocorrer recombinação, em comparação com populações F_2 . No entanto, o tempo gasto para produzir esse tipo de população é bastante elevado, requerendo de cinco a oito ciclos de autofecundação. Populações de retrocruzamento também podem ser utilizadas no mapeamento genético.

O número de marcadores necessários para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação genética. Um mapa pode ser considerado completo, quando o número de grupos de ligação obtido pela análise dos marcadores for igual ao número de cromossomos gaméticos do organismo ou quando todos os marcadores genéticos mapeados estiverem ligados, sugerindo que todas as regiões do genoma estão representadas.

Não há uma relação geral entre a distância genética e a distância física, existindo uma

grande variação entre organismos e dentro de um mesmo cromossomo. A quantidade de DNA correspondente a um centiMorgan pode variar de 140 kb (1 kb = 1.000 pares de base), em *Arabidopsis*, a 2.000 kb em milho (Lynch & Walsh, 1997). Embora a distância genética seja altamente variável, a ordem dos marcadores ao longo dos grupos de ligação e a distância entre locos ortólogos em diferentes espécies são extremamente conservadas (Paterson, 1996). Tal fato sugere que regiões contendo DNA repetitivo são uma das principais causas da grande diferença no tamanho físico do genoma das plantas superiores.

OUTRAS APLICAÇÕES DOS MAPAS GENÉTICOS

Mapeamento comparativo

O mapeamento comparativo envolve a análise das similaridades e diferenças na ordem dos genes ao longo dos cromossomos, entre espécies correlacionadas que não podem ser cruzadas sexualmente. Para isso, é necessário que os marcadores genéticos sejam ortólogos, isto é, devem possuir uma ascendência comum entre espécies que não apresentam possibilidade de cruzamento sexual (Paterson, 1996). Estudos comparativos têm revelado uma grande colinearidade entre os genomas, demonstrando que um número surpreendentemente reduzido de rearranjos cromossômicos distingue espécies e gêneros correlacionados. Tal conhecimento possibilita a troca de informações relevantes sobre a função e a localização de genes entre espécies relacionadas, aumentando a eficiência e o aproveitamento dos recursos investidos em análises genômicas.

Para que os marcadores moleculares sejam utilizados em análises comparativas, eles devem representar locos únicos em cada genoma. A maioria das análises de mapeamento comparativo realizadas até o momento baseia-se em marcadores RFLP. Os microsatélites, embora possam ser utilizados, ainda têm uso limitado nesse tipo de estudo.

Estudos comparativos têm estabelecido uma ordem comum entre genes em grande parte do genoma, que foi conservada ao

longo de milhões de anos no decorrer da evolução das espécies (Paterson, 1996). A grande conservação na ordem dos genes entre diferentes espécies de gramíneas levou Bennetzen & Freeling (1993) a sugerirem que as gramíneas fossem tratadas como um sistema genético único. Guimarães et al. (1997), utilizando sondas genômicas de RFLP, encontraram uma grande colinearidade entre os genomas de sorgo e cana-de-açúcar, sendo observada uma conservação de um QTL associado ao florescimento entre milho, sorgo, cana-de-açúcar e arroz. Estudos realizados por Paterson et al. (1995) demonstram que QTLs associados à altura de planta, à deiscência e ao tamanho de sementes são também conservados em arroz, milho e sorgo. Desta forma, o conhecimento gerado para uma espécie pode ser amplamente transferido para outra correlacionada, contribuindo para um aumento sinérgico na identificação e clonagem de genes em espécies de interesse econômico.

Clonagem de genes com base em mapa

O mapeamento genético é uma importante metodologia alternativa na clonagem de genes, principalmente quando o produto gênico não é conhecido. Nesse caso, o efeito fenotípico do gene é avaliado em progênies segregantes, com o objetivo de identificar marcadores de DNA que flanqueiam a região genômica de interesse. Em seguida, o mapeamento físico é utilizado para clonar um fragmento grande de DNA que contenha o gene. A manutenção e replicação *in vitro* de grandes segmentos cromossômicos foram facilitadas significativamente com o desenvolvimento dos cromossomos artificiais, tornando a metodologia mais amplamente utilizada. Sequências transcritas, contidas no fragmento cromossômico clonado, são isoladas por diferentes técnicas e, finalmente, o gene de interesse é identificado por complementação, sendo sua função confirmada em experimentos de transformação genética. O primeiro gene clonado a partir de mapa genético foi uma proteína quinase, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* em tomate (Martin et al., 1994).

CONCLUSÃO

A utilização de marcadores moleculares com base em DNA proporcionou uma evolução muito grande na genética e no melhoramento de plantas nos últimos anos.

O principal objetivo foi fornecer uma idéia geral sobre as bases moleculares dos marcadores de DNA e sobre suas principais aplicações. Foram abordados os diferentes tipos de marcadores moleculares, enfatizando as vantagens e limitações de cada um. É importante esclarecer que a utilização de um tipo de marcador deve ser norteada pelos objetivos a serem alcançados, pela complexidade, diversidade genética da cultura e pela estratégia de melhoramento. Assim, não existe uma técnica perfeita, e cada situação deve ser avaliada, para que a escolha dos tipos de marcadores adaptem-se a cada uma delas. As possibilidades de aplicações dos marcadores moleculares são inúmeras, desde a mais simples como estudos da diversidade genética de espécies até trabalhos mais complexos de clonagem de genes com base em mapas de ligação. O grande desafio é tornar essas técnicas mais eficientes, automatizando etapas com a possibilidade de analisar um maior número de dados com rapidez e redução de custos. A combinação dos métodos de melhoramento, das metodologias estatísticas e das tecnologias moleculares traz novas perspectivas para o conhecimento genético e para a aceleração dos programas de melhoramento, bem como aplicações práticas nos processos de proteção de cultivares e de análises de pureza genética de sementes, entre outras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.18, p.265-273, 1995.

ALZATE-MARIN, A.L. **Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.):** diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 1996. 65p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

BENNETZEN, J.L.; FREELING, M. Grasses as a single genetic system: genome composition,

collinearity and compatibility. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.9, p.259-261, 1993.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** Viçosa: UFV, 1997. 547p.

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

BRASIL. Lei nº 9456, de 25 de abril de 1988. Institui a Lei de proteção de cultivares, e dá outras providências. **LEX - coletânea de legislação e jurisprudência:** legislação federal e marginalia, São Paulo, v.61, p.1172-1184, 1997.

BURR, B.; BURR, F.A.; THOMPSON, K.H.; ALBERTSON, M.; STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, v.118, p.519-526, 1988.

CARVALHO, G.A. **Marcadores RAPD ligados a genes de resistência ao cancro da haste.** Viçosa: UFV, 1995. 51p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

CERVIGNI, G.D.L. **Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe).** Viçosa: UFV, 1999. 52p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.

DIERS, B.W.; MANSUR, L.; IMSANDE, J.; SHOEMAKER, R.C. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, Madison, v.32, p.377-383, 1992.

DOERGE, R.W.; CHURCHILL, G.A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, p.285-294, 1996.

DUDLEY, J.W.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; RUFENER, G.K. Molecular marker information and selection of parents in corn breeding programs. **Crop Science**, Madison, v.32, p.301-304, 1992.

EDWARDS, M.D.; PAGE, N.J. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.88, p.376-382, 1994.

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize - I: number, genomic distribution and type of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.

EMERSON, R.A.; BEADLE, G.W.; FRASER, A.C. **A summary of linkage studies in maize.** Ithaca: Cornell University, 1935. (Cornell University, Agricultural Experimental Station, Memoir, 180).

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics.** New York: John Wiley, 1981.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- GIMELFARB, A.; LANDE, R. Simulation of marker assisted selection hybrid population. **Genetical Research**, London, v.63, p.39-47, 1994.
- GIOVANNONI, J.J.; WING, R.A.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from preexisting mapping populations. **Nucleic Acids Research**, London, v.19, p.6553-6558, 1991.
- GRAHAM, G.I.; WOLF, D.W.; STUBER, C.W. Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five of maize by fine mapping. **Crop Science**, Madison, v.37, p.1601-1610, 1997.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.
- GUIMARÃES, C.T.; SILLS, G.R.; SOBRAL, B.W.S. Comparative mapping of *Andropogoneae*: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.94, p.14261-14266, 1997.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, Edinburgh, v.69, p.315-324, 1992.
- JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.79, p.583-592, 1993.
- JARVIS, P.; LISTER, C.; SZABO, V.; DEAN, C. Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.24, p.685-687, 1994.
- JIANG, C.; ZENG, Z.B. Multiple-trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.140, p.1111-1147, 1995.
- KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v. 152, p.1203-1216, 1999.
- KEIM, P.; BEAVIS, W.; SCHUPP, J.; FREESTONE, R. Evaluation of soybean RFLP markers diversity in adapted germ plasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.85, p.205-212, 1992.
- KEIM, P.; SHOEMAKER, R.C.; PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.77, p. 786-792, 1989.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant J.**, v.4, p.403-410, 1993.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v.124, p.743-756, 1990.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable micro-satellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- LIVINI, C.; AJMONE-MARSAN, P.; MELCHINGER, A.E.; MESSEMER, M.M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic groups revealed by RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.84, p.17-25, 1992.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative genetics**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1997. 990p.
- MACARTHUR, J.D. Linkage groups in tomato. **J. Genet.**, v.29, p.123-133, 1934.
- MCDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, p.171-176, 1994.
- MAP manager Qt. Disponível site **University of Buffalo** (01 Dec. 1998). URL: <http://www.mcbio.med.buffalo.edu/mpmgr.html> Consultado em 28 abr. 2000.
- MARTIN, G.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R.; EARLE, E.D.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v.263, p.1432-1436, 1994.
- MARTIN, G.B.; WILLIAMS, J.G.K.; TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance genes in tomato using random primer and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.88, p.2336-2340, 1991.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MIRANDA, G.V. **Diversidade genética e desempenho de cultivares elites de soja como progenitores**. Vicosia: UFV, 1998. 117p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MORGAN, T.H. Sex-linked inheritance in *Drosophila*. **Science**, v.32, p.120-122, 1910.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335, 1987.
- OLSON, M.; HOOD, L.; CANTOR, C.; DOSTSTEIN, D. A common language for physical mapping of the human genome. **Science**, v.254, p.1434-1435, 1989.
- OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G.; BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA JOINT PLANT BREEDING SYMPOSIUM, 2, 1994, Corvallis Proceedings... Corvallis: Oregon State University, 1994.
- PARAN, I.; KESSELI, R.; MICHELMORE, R.W. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome**, Ottawa, v.34, p.1021-1027, 1991.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.85, p.985-993, 1993.
- PATERSON, A.H. **Genome mapping in plants**. New York: Academic Press, 1996. 330p.
- PATERSON, A.H.; LIN, Y.R.; LI, Z.; SCHERTZ, K.; DOEBLEY, J.F.; PINSON, S.R.M.; LIU, S.C.; STANSEL, J.W.; IRVINE, J.E. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. **Science**, v.269, p.1714-1718, 1995.
- PROGRAM in statistical genetics: software. Disponível site **North Carolina State University** (09 Jan. 2000). URL: <http://www.statgen.ncsu.edu/qtlearn/cartographer.html> Consultado em 28 abr. 2000.
- QUEIROZ, V.T. **Mapeamento genético do caçueiro e identificação de QTLs para resistência à vassoura-de-bruxa**. Viçosa: UFV, 1999. 57p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- RIBAUT, J.M.; HOISINGTON, J.A.; DEUTSH, J.A.; JIANG, C.; LEON, G. Identification of quantitative trait loci under drought

- conditions in tropical maize. I: flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.92, p.905-914, 1997.
- 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.
- RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, v.40, p.442-450, 1997.
- SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para a resistência ao nematóide de cisto da soja e capacidade de combinação de genitores**. Viçosa: UFV, 1999. 85p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant J.**, v.3, p.739-744, 1993.
- STROMBERG, L.D.; DUDLEY, J.W.; RUFENER, G.K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize. **Crop Science**, Madison, v.34, p.1221-1225, 1994.
- STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize – II: factors influencing yield and its component traits. **Crop Science**, Madison, v.27, p.639-648, 1987.
- VASCONCELOS, M.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, p.447-451, 1996.
- 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**, London, v.23, p.4407-4414, 1995.
- YOUNG, N.D.; ZAMIR, D.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, v.120, p.579-585, 1988.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, 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**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.
- XIE, C.; XU, S. Efficiency of multistage marker-assisted selection in the improvement of multiple quantitative traits. **Heredity**, v.80, p.489-498, 1998a.
- XIE, C.; XU, S. Strategies of marker-aided recurrent selection. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1526-1535, 1998b.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1468, 1994.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.90, p.10972-10976, 1993.
- ZHANG, W.; SMITH, C. Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.83, p.813-820, 1992.