

TIPOS DE MARCADORES E GENÔMICA DE PLANTAS

PLANT GENOMICS AND MARKERS

Newton Portilho CARNEIRO¹; Claudia Teixeira GUIMARÃES¹; Jurandir Vieira MAGALHÃES¹

RESUMO: O melhoramento de plantas usa a variabilidade genética e a seleção para gradualmente melhorar plantas para características que são de interesse para os agricultores e os consumidores. Essa variabilidade tem sido utilizada por meio do uso eficiente do germoplasma disponível. Apesar do melhoramento genético ter produzido variedades melhoradas ao longo dos anos, avanços recentes no campo da biotecnologia e da biologia molecular podem agora ser empregados para facilitar e acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares. Esses métodos são focados principalmente na molécula do DNA, e basicamente envolvem a hibridização de clones marcados para detectar seqüências genômicas que são polimórficas para sítios de restrição internos, tais como na técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), ou na amplificação de fragmentos de DNA, como nas técnicas de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD) e de Seqüências Repetidas Simples (SSRs ou microsatelites). O método do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) é uma técnica híbrida que detecta polimorfismos gerados por mutações em seqüências de reconhecimento de enzimas de restrição, que são reveladas por meio de uma amplificação seletiva por PCR da seqüência dos adaptadores. Essas técnicas, quando integradas com outros recursos como mutantes gerados por agentes químicos e mutagênese-insercional, mapeamento de loci quantitativos (QTLs), projetos de seqüenciamento de DNA, espectrometria de massa em grande escala, proteômica e mapeamento físico e comparativo, têm facilitado tremendamente o processo de clonagem de genes de interesse agrônomico. Ferramentas avançadas de bioinformática para a organização de dados e análises subseqüentes têm sido desenvolvidas para um melhor e mais rápido processamento de enormes quantidades de dados obtidos para várias espécies vegetais. O objetivo do presente texto é o de fornecer uma visão geral dos tipos de marcadores moleculares mais comumente utilizados nas características que são alvo do melhoramento de plantas. As vantagens e desvantagens das várias tecnologias de marcadores são também discutidas.

UNITERMOS: Marcadores moleculares, Plantas, Genômica, Biotecnologia, Melhoramento vegetal

INTRODUÇÃO

Antes da formulação das leis da genética mendeliana, e antes mesmo da teoria cromossômica da herança, o melhoramento de plantas era realizado de forma intuitiva, selecionando-se as melhores plantas cujas sementes eram guardadas para plantios subseqüentes. Contudo, esse processo era lento e bastante imprevisível. De acordo com dados fornecidos pela Food and Agriculture Organization (FAO), a população mundial deverá dobrar em 40 anos (Fig. 1), o que irá requerer um crescimento compatível da produção agrícola. Os métodos tradicionais de melhoramento evoluíram consideravelmente desde o seu surgimento no começo do século, produzindo

importantes incrementos na qualidade e na produtividade das espécies cultivadas (Fig. 2). Por exemplo, a produção de milho nos Estados Unidos tem apresentado uma tendência de aumento nos últimos 30 anos, mesmo considerando-se flutuações anuais causadas principalmente por fatores climáticos. Além do melhoramento vegetal, outros fatores como o aprimoramento das técnicas de manejo do solo, água, pragas, ervas daninhas e doenças, além da tecnificação dos processos químicos destinados à produção de fertilizantes e pesticidas, contribuíram para o aumento da produtividade agrícola. A esses progressos somaram-se avanços expressivos na mecanização agrícola, no armazenamento e escoamento da safra.

¹ Pesquisador, doutor, Centro Nacional de Pesquisas em Milho e Sorgo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

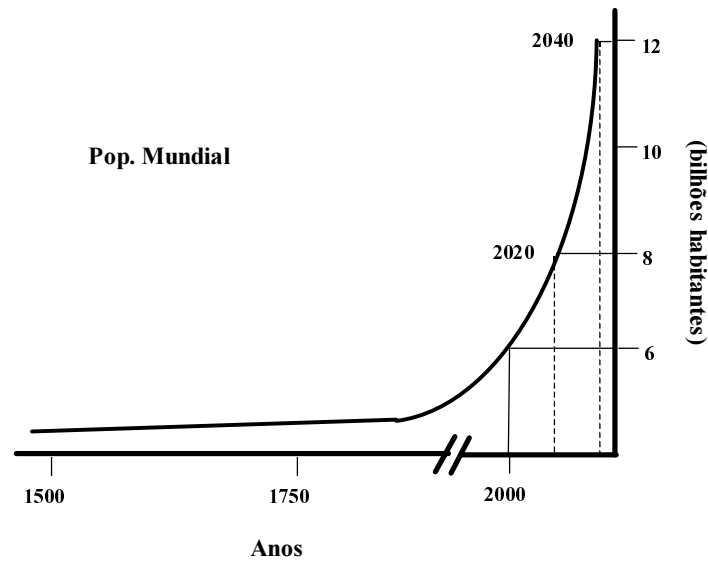


Figura 1. Crescimento populacional previsto para os próximos 40 anos

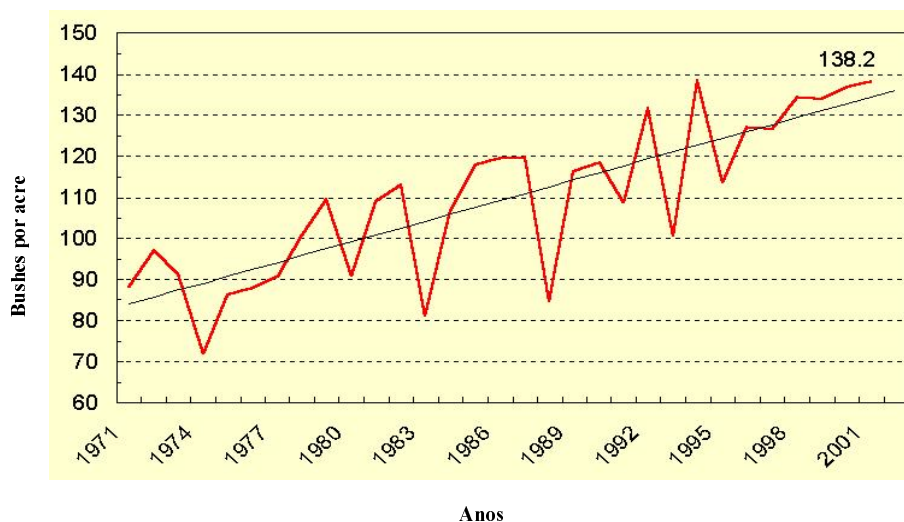


Figura 2. Aumento da produção de milho nos Estados Unidos nos últimos 30 anos.

Apesar dos resultados expressivos do melhoramento vegetal, o aumento da produção agrícola não tem sido sustentável nos últimos anos, havendo evidências de que os ganhos de produtividade em cereais estejam em trajetória descendente em alguns países (Pingali e Heisey, 1999). Dessa maneira, para assegurar a sustentabilidade da produção agrícola, novas ferramentas fazem-se necessárias. Dentre essas, o uso de marcadores moleculares no auxílio aos métodos convencionais de melhoramento como a seleção assistida por marcadores, o mapeamento molecular nas suas diversas aplicações e a impressão digital de DNA (“fingerprinting” molecular), assumem grande

importância. Tais estratégias visam aumentar a eficiência do processo de melhoramento e a redução do tempo para a geração de materiais genéticos superiores.

O termo marcador é utilizado para definir elementos capazes de prever e caracterizar um fenótipo, que também possibilitam localizar-se no genoma os genes associados à manifestação da característica. Inicialmente, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos de fácil identificação no organismo e de herança monogênica. Apesar dos marcadores morfológicos terem contribuído significativamente para o estabelecimento dos princípios

teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica, fatores como número reduzido de marcadores disponíveis e efeitos deletérios de algumas mutações (não neutralidade), representavam sérios empecilhos à sua utilização prática. Dessa maneira, a utilização desses marcadores para mapear genes associados a características de importância econômica era limitada (Guimarães e Moreira, 1999).

A intensificação do uso de marcadores deu-se com o surgimento das ferramentas moleculares, baseadas na tecnologia do DNA recombinante. Os primeiros a serem desenvolvidos foram as isoenzimas, as quais permitiram a ampliação do uso de marcadores em pelo menos uma ordem de magnitude em relação aos marcadores morfológicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). À medida que as técnicas de biologia molecular se aprimoravam, o DNA passava a ser o ponto focal no desenvolvimento de novos marcadores. Um número quase ilimitado de marcadores moleculares distribuídos aleatoriamente no genoma, os quais eram independentes do estágio da planta e do ambiente, foram então desenvolvidos. Os primeiros marcadores em nível de DNA eram baseados na técnica de hibridização. Entretanto, com o surgimento da técnica de PCR, deu-se o rápido desenvolvimento de várias tecnologias para análise de segregação genética. Com a grande quantidade de dados gerados, houve também necessidade de um aprimoramento nas técnicas de armazenamento e processamento da informação, culminando no surgimento de novos programas para análises estatísticas. Os marcadores mais utilizados são:

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Botstein *et al.*, 1980)

VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats* (Jeffrey *et al.*, 1985)

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams *et al.*, 1990)

SCAR - *Sequence Characterized Amplified Regions*
STS - *Sequence Tagged Sites* (Paran e Michelmore, 1993)
SSR - *Single Sequence Repeats* - Microsatélites (Litt e Luty, 1989)

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Vos *et al.*, 1995).

Os marcadores moleculares variam quanto a sua capacidade de detectar diferenças entre indivíduos (polimorfismos), custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Uma comparação entre os principais marcadores moleculares é apresentada no Quadro 1.

Marcadores RFLP se baseiam na hibridização de sondas (i.e. fragmentos de DNA de seqüências codantes ou não codantes) com o DNA genômico tratado com enzimas de restrição. O polimorfismo é produzido por diferenças de tamanho de fragmentos de restrição entre alelos, após hibridização com uma sonda de DNA marcado (Fig. 3). Como vantagens, os marcadores RFLP são co-dominantes, portanto fornecendo maior conteúdo de informação genética, independe de regiões codificadoras, e de número praticamente ilimitado. A técnica permite ainda o uso de sondas heterólogas (i.e. sondas obtidas de organismos diversos daquele em que está sendo feita a análise), viabilizando a construção de mapas comparativos entre espécies e relativamente baixo custo. Como limitações, essa é uma técnica laboriosa e pouco adequadas à automatização, necessitando ainda de grandes quantidades de DNA genômico e de sondas de DNA.

Os marcadores VNTR ou minissatélites fornecem informações genéticas semelhantes àquelas geradas pela técnica de RFLP. Contudo, o polimorfismo gerado depende da frequência de pequenas regiões repetitivas entre sítios de restrição no genoma (Fig. 4). Marcadores VNTR são de grande aplicabilidade para “fingerprinting” de DNA e testes de paternidade. As limitações dessa técnica são as mesmas do RFLP, além da baixa distribuição no genoma.

Quadro 1. Comparação de diferentes sistemas de marcadores moleculares

Técnica	RFLP	RAPD	Microsatélite/SSR	SCAR	AFLP	Microarray
Descrição	Restrição por endonucleases Hibridização por Southern blot	Amplificação de DNA com primers de seqüência aleatória	Amplificação de seqüências simples repetidas com pares de primers específicos	Produto de PCR polimórfico	Restrição por endonucleases seguido por amplificação por PCR	DNA amplificado, marcado e hidridizado com oligos e/ou c/DNA
Tipo de polimorfismo	Mudanças em uma base Inserção/deleção	Mudanças em uma base Inserção/deleção	Mudanças no comprimento das repetições	Mudanças em uma base Inserção/deleção	Mudanças em uma base Inserção/deleção	Base simples, quantitativo
Abundância genômica	Alto	Muito alto	Alto	Médio	Muito alto	Muito alto
Níveis de polimorfismo	Médio	Médio/alto	Alto	Médio	Muito alto	Muito alto
Dominância	Co-dominante	Dominante	Co-dominante	Co-dominante	Dominante	Co-dominante?
Necessidades						
Quantidade de DNA necessária	2-10 µg	10-30 ng	10-30 ng	50-100 µg ?	250-500 µg	1 ng
Necessidade do conhecimento da seqüência	Não - necessita da sonda de DNA	Não	Sim	Sim	Não	Não
Sistema de gel	Agarose	Agarose	Acrilamida/Agarose	Agarose	Acrilamida	Sem gel
Implementação						
Custos de desenvolvimento	Médio	Baixo	Alto para gerar primers e baixo para aplicar a técnica	Médio/alto	Médio/alto	Muito alto
Custos de início ?	Médio/alto	Baixo	Alto	Alto	Médio/alto	Muito alto
Portabilidade ? Lab.	Alto	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto
Aplicações	Mapa comparativo Mapeamento	Mapeamento, seleção assistida por marcadores	Mapeamento, fingerprinting, seleção assistida por marcadores	Mapeamento, seleção assistida por marcadores	Fingerprinting, mapeamento, saturação de uma região específica	Fingerprinting, estudo de seleção gênica

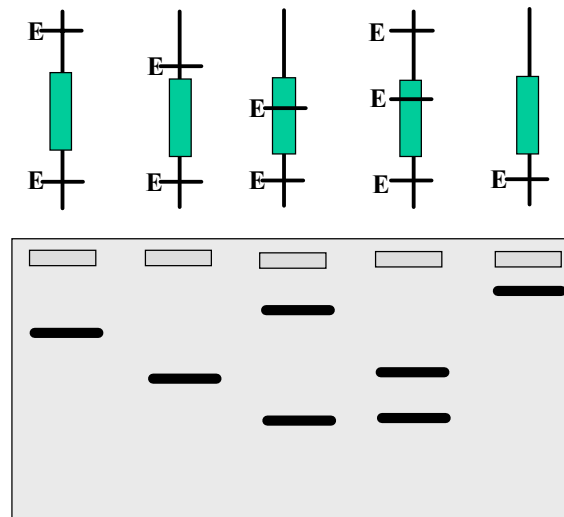


Figura 3. RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Retrição)

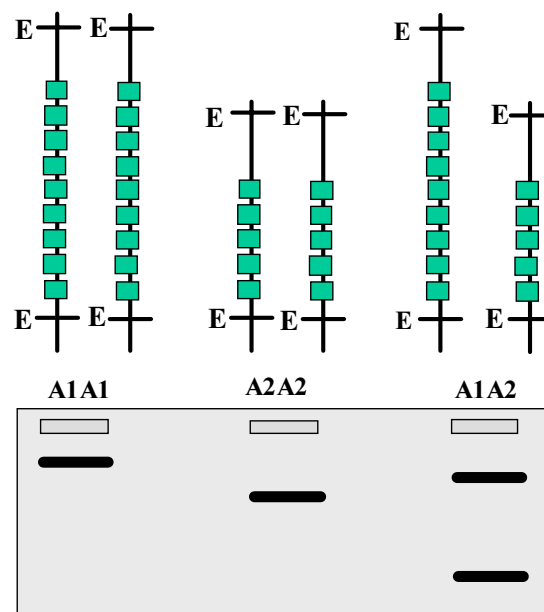


Figura 4. VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) ou Minisatélites

A técnica de RAPD foi praticamente a primeira a ser desenvolvida com base na técnica de PCR. O polimorfismo do RAPD é baseado na capacidade de um primer de se anelar ou não a uma seqüência complementar distribuída aleatoriamente no genoma (Fig. 5). A técnica exige pequenas quantidades de DNA e produz um grande número de resultados de maneira rápida, uma vez que polimorfismos RAPD podem ser detectados por meio de géis simples de agarose. Além disso, não é necessário conhecimento prévio de seqüências genômicas-alvo nem de sondas de DNA. Entretanto, a técnica de RAPD

apresenta uma grande desvantagem que é a baixa repetibilidade dos resultados.

SSR (*“Simple Sequence Repeats”* ou microssatélites) são marcadores baseados na técnica de PCR, por meio da qual pares de primers de seqüência conhecida são utilizados. Esses primers se anelam nas seqüências que flanqueiam regiões repetitivas, que podem ter de duas a seis bases repetidas em tandem (Fig. 6). O polimorfismo é criado em função de variações no número de repetições dos microssatélites no genoma e o resultado pode ser visualizado em géis de poliácridamida ou de agarose

(de concentração elevada). SSRs são marcadores codominantes e multialélicos, tendo como vantagens a sua rapidez e facilidade técnica, aliadas à possibilidade de automatização em reações multiplex analisadas em

seqüenciadores de DNA. A sua grande limitação é a etapa de desenvolvimento dos primers, que depende da clonagem e seqüenciamento dos microsatélites para se conhecer as seqüências que flanqueiam as regiões repetitivas.

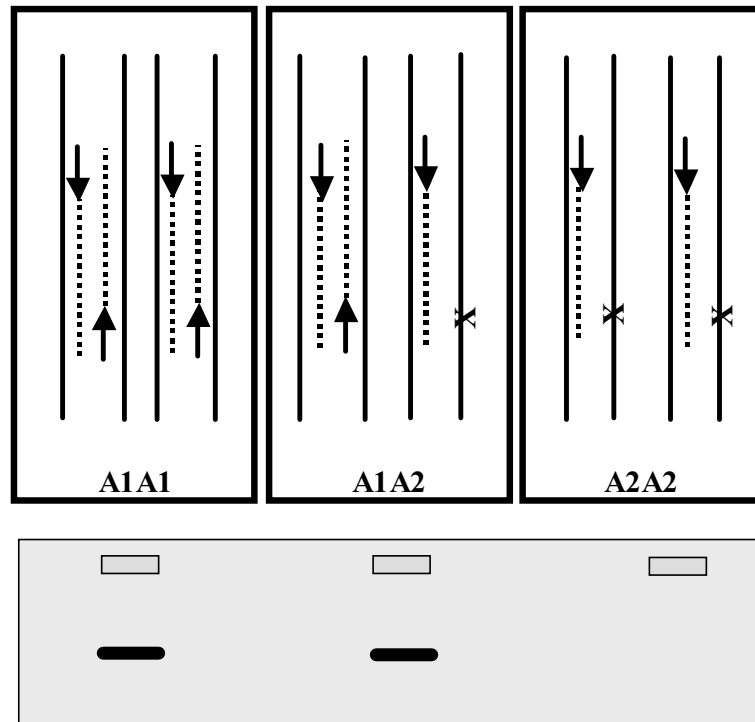


Figura 5. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

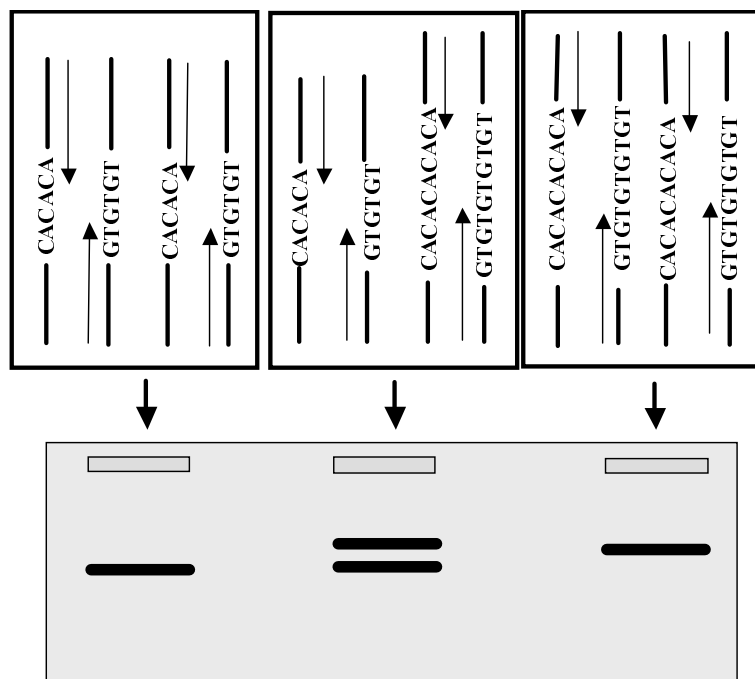


Figura 6. SSR (Single Sequence Repeats) ou Microsatélites

ISSR-PCR (*Inter-Single Sequence Repeat PCR*) é uma modificação da metodologia de SSR que utiliza primers baseados em seqüências repetidas simples (SSR) ancoradas tanto no final 5' como 3' com 2 ou 4 resíduos de purinas ou pirimidinas para iniciar amplificação por PCR de segmentos genômicos flanqueados por microssatélites repetidos inversamente orientados que estejam próximos aos microssatélites.

O método mais comum para gerar marcadores ISSR-PCR é pela marcação do final 5' dos primers ISSR com $a^{32}P$ ATP, ou pela adição na reação de PCR de uma mistura de um dNTP marcado com $g^{32}P$, juntamente aos outros três não marcados. Em ambos os casos, os produtos de PCR podem ser separados em géis de poliacrilamida e detectados por autoradiografia. Nucleotídeos fluorescentes podem ser usados nas reações de ISSR-PCR, técnica também denominada de FISSR-PCR. Nesse caso, a separação e a análise dos fragmentos são realizadas em

seqüenciadores automáticos de DNA (Nagaraju *et al.*, 2002)

AFLP são marcadores baseados na clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição, seguida de ligação de adaptadores e amplificação seletiva por PCR, e separação de fragmentos em géis de poliacrilamida (Fig. 7). Polimorfismos AFLP são criados em função de variações na distância entre sítios de restrição e nas bases localizadas na extremidade 3' dos primers utilizados na etapa de amplificação seletiva. Como essa técnica explora dois tipos de variação na seqüência da seqüência do DNA, o AFLP tem a vantagem de analisar um grande número de regiões genômicas por experimento, sem requerer informação prévia de seqüências. As desvantagens desse processo é o seu custo elevado, o requerimento de DNA de alta pureza e as várias etapas envolvidas para obtenção dos resultados. Entretanto, a técnica de AFLP substituiu com vantagens o RAPD, principalmente pelo aumento na capacidade de amostragem do genoma.

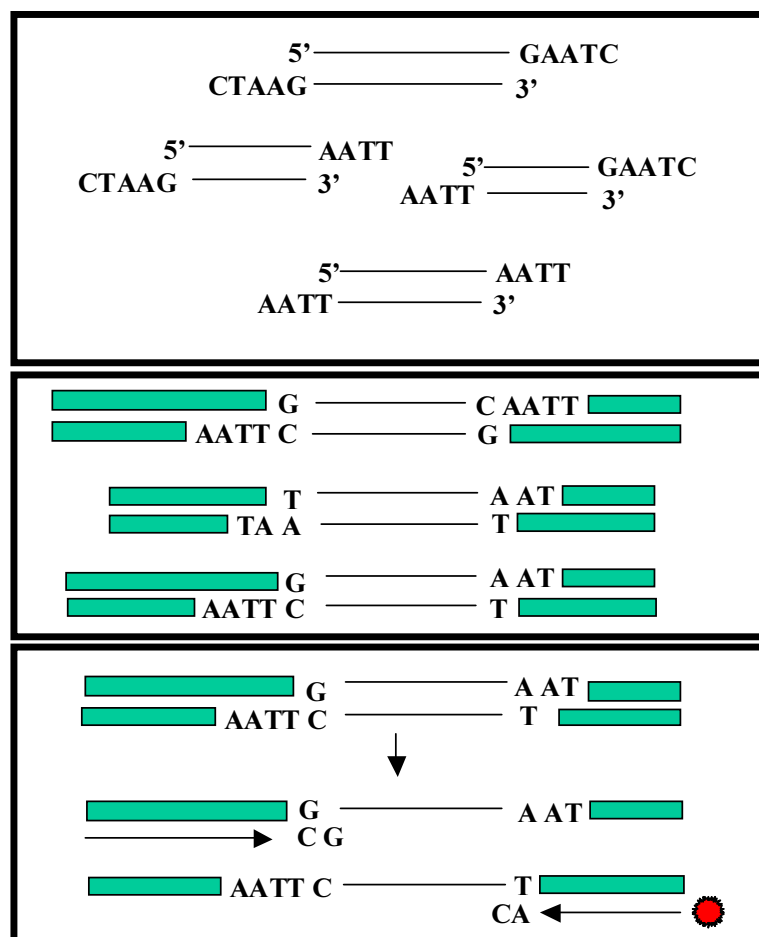


Figura 7. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) é uma terminologia usada para identificar diferenças de um único

par de base entre alelos (i.e. transições ou transversões). Essa diferença pode ser detectada por várias técnicas

incluindo PCR em tempo real, seqüenciamento de DNA, espectrometria de massa, ELISA (Lieu *et al.*, 2002) e amplificação utilizando um primer longo cuja extremidade 3' termine uma base imediatamente antes do SNP de interesse. Uma das grandes contribuições dos projetos de seqüenciamento genômico e funcional tem sido a disponibilização de uma grande quantidade de informações sobre as seqüências de genes e alelos. Tais informações têm se tornado uma fonte profícua de marcadores, os quais possibilitam a exploração da variabilidade alélica dentro de uma mesma espécie, e também entre espécies filogeneticamente próximas.

Microarray

Microarray ou arranjo de DNA é uma metodologia utilizada para comparar a expressão de um grande número de genes simultaneamente, que pode ser

usada para determinar um padrão de expressão gênica específico de um indivíduo submetido a uma dada condição ambiental. Esse sistema baseia-se na impressão automatizada de milhares de clones de cDNAs em placas de vidro, e subsequente hibridização com duas sondas marcadas com fluorescências diferentes (geralmente uma que emite uma cor vermelha e outra verde). As sondas são conjuntos de cDNAs gerados a partir de células ou tecidos submetidos a duas situações diferentes que se deseja comparar (e.g. com e sem estresse de alumínio, por exemplo). Os resultados são produzidos sob forma de diferentes intensidades de fluorescência que são captadas por um microscópio de fluorescência à laser, e diferenciadas em função dos níveis de expressão de cada gene. A imagem dos pontos fluorescentes é processada por computadores e programas específicos, sendo gerada uma grande quantidade de informação simultaneamente (Fig. 8).

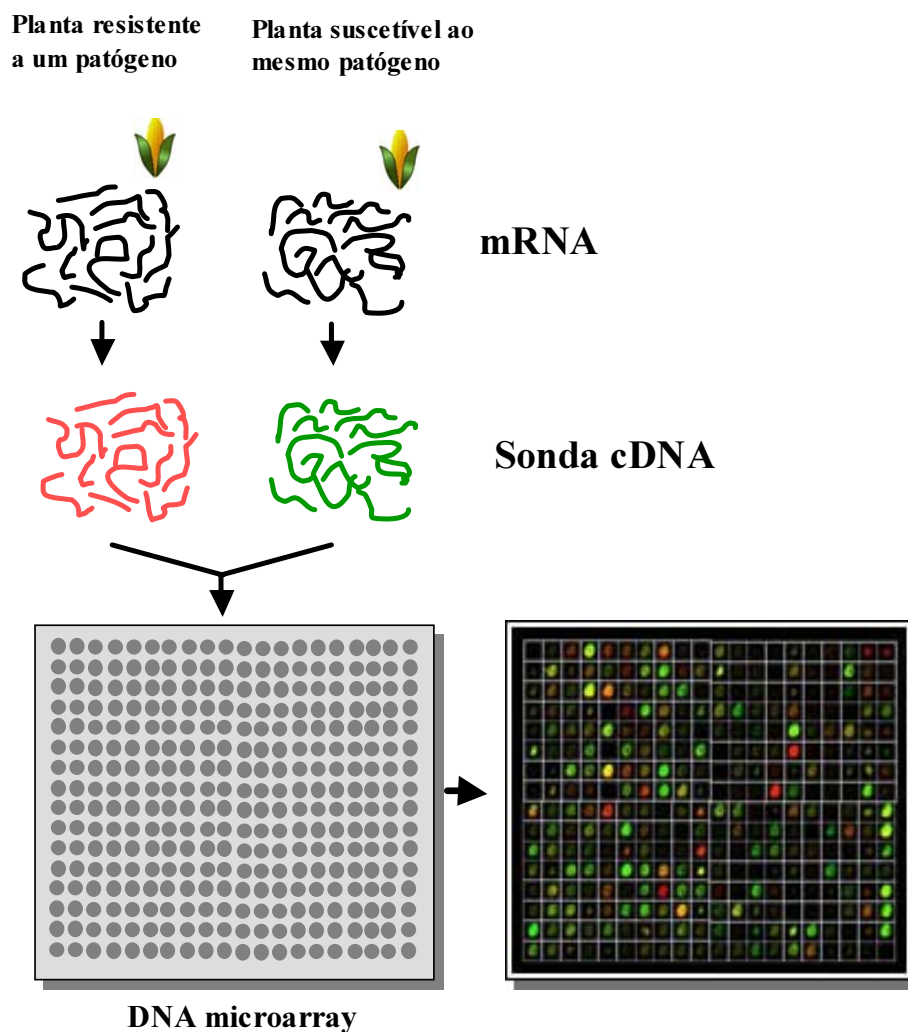


Figura 8. Análise de expressão gênica usando *microarray*.

Uma derivação dessa técnica, originalmente denominada de DArT - Diversity Array Technology (Jaccoud et al., 2001) - foi proposta com o objetivo de genotipagem e mapeamento genético em larga escala. Nessa estratégia, é detectada a presença ou ausência de uma grande quantidade de fragmentos genômicos que representam um organismo ou uma população. A impressão de milhares de fragmentos genômicos e sua análise simultânea em uma única etapa de hibridização fornece a possibilidade de um “fingerprinting” molecular de alta precisão, em um único experimento. No entanto, a otimização da técnica e a necessidade da infraestrutura de microarrays inviabiliza tal tecnologia para a grande maioria dos laboratórios que utilizam as técnicas convencionais de marcadores moleculares.

IRAP e REMAP

O retrotransposon *BARE-1* é um componente ativo, disperso e altamente abundante do genoma de cevada (*Hordeum vulgare*) e de outras espécies desse

gênero. Como todo retrotransposon do seu tipo, *BARE-1* se liga por terminais repetidos longos (LTRs). Kalendar et al. (1999) desenvolveram marcadores baseados em amplificação, onde os primers são ancorados em uma posição no LTR do retrotransposon e em um dado LTR dentro do genoma. O marcador IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) é gerado pela proximidade de dois LTR usando primers em direção internas do retrotransposon (Fig 9). Já o marcador REMAP (*Retrotransposon – Microsatellite Amplified Polymorphism*) baseia-se na amplificação entre o LTR do retrotransposon e as seqüências repetidas simples, sendo essas seqüências flanqueadas pelos microssatélites (Fig 10). Tais marcadores podem ser utilizados para distinguir variedades de cevada, produzindo padrões de fingerprinting também para outras espécies do gênero. Os padrões de amplificação indicam que apesar da família de retrotransposons *BARE-1* ser dispersa no genoma, esses elementos estão localizados em um “cluster” ou freqüentemente encontrados próximos a arranjos de seqüências simples repetidas.

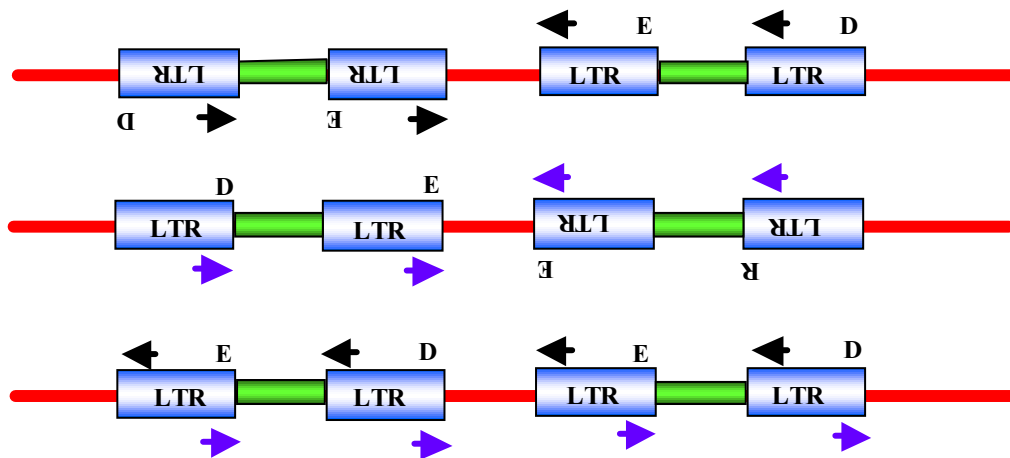


Figura 9. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)

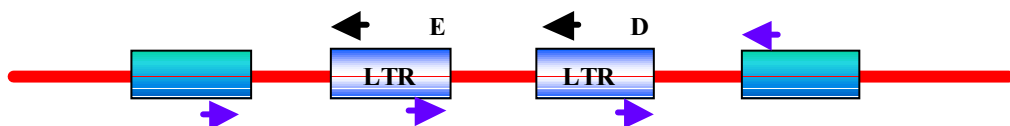


Figura 10. REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism)

Importância dos marcadores moleculares no melhoramento:

1. Validar as coleções-núcleo e auxiliar a organização das mesmas nos bancos de germoplasma, visando à seleção do menor número de acessos que melhor representem a variabilidade genética dos bancos.

2. Auxiliar o estabelecimento de grupos heteróticos, para diminuir o número de cruzamentos e de avaliações das combinações híbridas.

3. Impressão digital de DNA (ou fingerprinting) para uso em proteção em cultivares

4. Seleção assistida por marcadores (SAM) para auxiliar na transferência de regiões do genoma que

contenham genes de interesse cuja característica seja de difícil avaliação fenotípica, e a recuperação do genoma recorrente em programas de retrocruzamento assistido. (Figura 11). Essa estratégia tem como objetivo a redução do tempo gasto para a geração de materiais genéticos superiores e o aumento da eficiência dos programas de melhoramento genético, sendo muito vantajoso para plantas perenes e de ciclo de vida longo.

5. Filogenia molecular que permite a formulação de inferências acerca de ancestralidade (análogo de “tipo selvagem”) e estados derivados (análogo a mutante).

6. Mapeamento de genes e de QTLs

7. Genômica comparativa

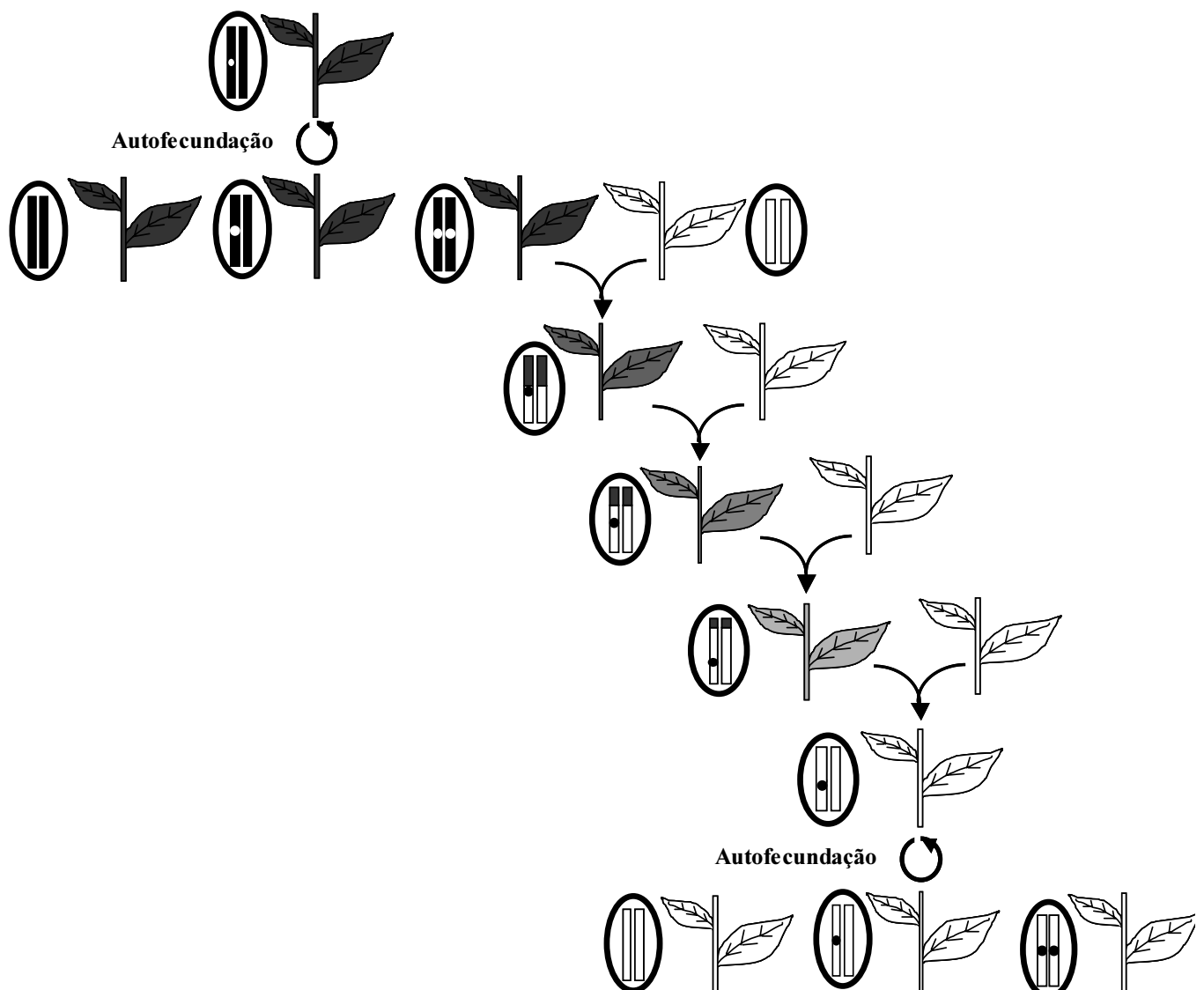


Figura 11. Transferência de um gene de interesse de uma planta transgênica para uma linhagem elite por retrocruzamento.

Mapeamento usando linhagens de adição e “radiation hybrid”

O mapeamento genético depende da seleção de parentais contrastantes, de populações segregantes e de marcadores polimórficos. A distância genética é calculada de acordo com a frequência de recombinação entre os marcadores (Figura 12). No entanto, métodos que não utilizam populações segregantes têm sido desenvolvidos para calcular distância física entre dois marcadores. A primeira estratégia desse tipo foi o uso de linhagens de adição desenvolvidas entre milho e aveia (Kynast *et al.*, 2001).

O processo de eliminação uniparental de cromossomos já foi verificado em híbridos de milho com *Coix*, *Zea perennis*, *Hordeum vulgare*, *Saccharum officinarum*, *Trisacum andersonii* e *Tritium aestivum* (Kynast *et al.*, 2001). Em cruzamentos de aveia e milho, o híbrido F_1 pode reter um ou mais cromossomos de milho adicionados a um complemento haplóide de aveia (Rines *et al.*, 1995; Riera-Lazarazu *et al.*, 1996). Há apenas um registro de cruzamentos de trigo com milho em que houve retenção cromossômica, porém sem transmissão à progênie (Comeau *et al.*, 1992). Em tais plantas, a restituição

meiótica aumentou a produção completa ou parcial de gametas F_1 não reduzidos, levando a uma fertilidade parcial. A auto-polinização dessas plantas gerou diferentes tipos de plantas F_2 euploides ou aneuploides. Adições dissômicas ($2n = 6x + 2 = 44$) para diferentes cromossomos de milho foram recuperadas entre a progênie (Rines *et al.*, 1995; Riera-Lazarazu *et al.*, 1996; Kynast *et al.*, 2000). Dessa maneira, o genoma do milho – altamente complexo – pode ser “simplificado”, uma vez que uma série de linhagens de aveia podem ser desenvolvidas, com cada linhagem contendo um par de cromossomos de milho em homozigose. Assim, cromossomos individuais de milho, uma vez separados dos outros cromossomos, podem se tornar um objeto ideal para atribuir-se um dado marcador a um grupo de ligação representado em um mapa genético.

Pela radiação com partículas gama de linhagens de aveia contendo adições em série de cromossomos de milho, é possível produzir deleções ou translocações intergenômicas do cromossomo de milho no conjunto de cromossomos de aveia. Dessa maneira, criam-se segmentos cromossômicos ainda mais limitados, nos quais pode-se proceder com maior facilidade o mapeamento e isolamento de seqüências de interesse (Riera-Lazarazu *et al.*, 2000).

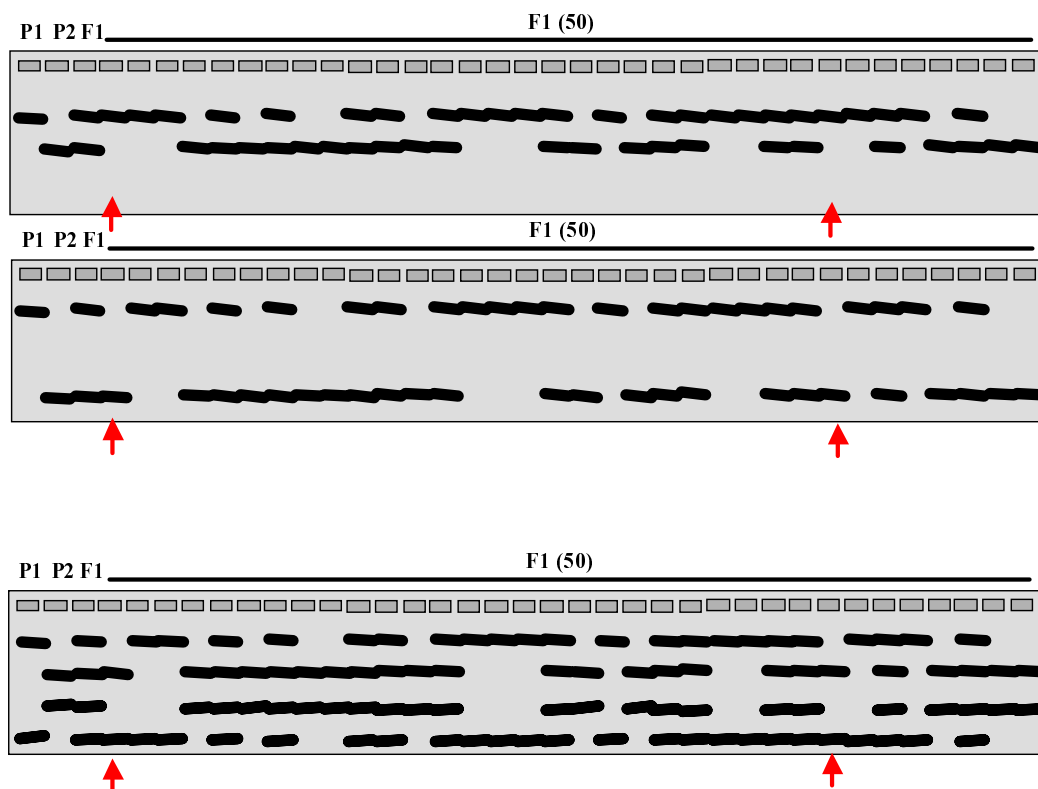


Figura 12. Mapeamento usando marcadores RFLPs. Taxa de recombinação 2 em 50 indivíduos corresponde a uma distância genética de 4 centimorgans.

O segundo método de mapeamento ordena marcadores ao longo do cromossomo e dá uma estimativa da distância física entre eles. “Radiation hybrid” são produzidos pela fusão de células doadoras irradiadas com uma célula de camundongo receptor. Essas linhagens de células híbridas são agrupadas nos chamados painéis de clones, onde cada um contém diferentes fragmentos dos cromossomos produzidos pela irradiação. Os clones são identificados por PCR para estabelecer a presença ou ausência de um dado marcador. Locos próximos tendem a mostrar padrões de retenção similares. Com tais resultados, a distância entre os locos pode ser calculada com base em modelos estatísticos. A medida de qualidade da posição dos marcadores é expressa como uma probabilidade ou valor de LOD. LOD indica na escala logarítmica, a razão entre a probabilidade dos dados observados terem surgido assumindo a presença de um QTL sobre a probabilidade de sua ausência. O método “radiation hybrid” pode ser usado para mapear marcadores não polimórficos tais como os STSs (*Sequence Tagged Sites*). As etiquetas de seqüências expressas (*Expressed Sequence Tagged - EST*) são muito adequadas a essa

finalidade, sendo frequentemente usadas em bovinos (Rexroad *et al.*, 1999), cães (Vignaux *et al.*, 1999) e suínos (McCoard *et al.*, 2002).

TILLING (*Target Induced Local Lesion In Genomes*)

Com o grande acúmulo de informações de seqüências de DNA nos bancos de dados, a ênfase em genômica tem sido direcionada para a determinação da estrutura do gene e para testes de função, o que tem sido feito por meio da genética reversa. No método TILLING, é explorada a capacidade de identificar mutações provocadas por agentes químicos em seqüências de *Arabidopsis thaliana* (McCallum *et al.*, 2000), combinando a eficiência da mutagênese induzida pelo etilmetanolsulfonato (EMS) com a capacidade de resolução da cromatografia líquida desnaturante de alta resolução (DHPLC). Esse processo detecta mudanças de pares de bases em análise de heteroduplex, e é capaz de gerar uma grande variedade de alelos de modo rápido e automático, podendo ser aplicado a qualquer organismo passível de mutagênese química.

ABSTRACT: Plant Breeding relies on genetic variation and selection to gradually improve plants for traits that are of interest to the grower and the consumer. This variability has been in part assessed through an efficient use of the available germplasm. Although breeding efforts have continuously produced improved varieties throughout the years, recent developments in the field of biotechnology and molecular biology can now be employed to facilitate and speed up cultivar development. These methods are mainly DNA-based techniques and basically use the hybridization of cloned probes to detect genomic sequences that are polymorphic for internal restriction sites, such as in Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), or on the amplification of DNA fragments using the polymerase chain reaction (e.g. Random Amplified Polymorphic DNA [RAPD] or Simple Sequence Repeats [SSRs or Microsatellites]). The Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) method is conceptually a hybrid technique, relying on polymorphisms in the recognition sequences of restriction enzymes that are revealed through selective PCR amplification of adapter sequences. These techniques, when integrated with other resources such as mutants generated by chemical and insertional mutagenesis, quantitative trait locus (QTL) mapping, cDNA sequencing projects, high throughput mass spectrometry and proteomics, physical and comparative mapping, have made gene cloning far more efficient. Advanced bioinformatic tools for data retrieval and subsequent statistical analysis have been developed, allowing for a quick and reliable management of enormous amount of data obtained in several plant species. The objective of the present manuscript is to offer an overview of the most common molecular markers used in the genetic analysis of traits that are relevant as targets for crop improvement. The advantages and disadvantages of current marker technologies are also discussed.

UNITERMS: Molecular markers, Plants, Genomics, Biotechnology, Plant breeding.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANIEV, EV.; RIERA-LAZARAZU, O, RINES HW; PHILLIP RL (1997). Oat-maize chromosome addition lines: a new system for mapping in maize genome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94:3524-3529.

COMEAU, A; NADEAU, P., PLOURDE, A, SIMARD, R. MAES O, KELLY, S. HARPER, L.; LETTRE, J.; LANDRY, B., B, ST-PIERRE C-A (1992) Media for the in ovulo culture of proembryos of wheat and wheat-derived inter-specific hybrid and haploid. *Plant Sci* 81:117-125.

FERREIRA, M.E. E GRATTAPAGLIA D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3^{ed}. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

GUIMARÃES, CT. E MOREIRA, MA. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BOREM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 715-740.

KALENDAR, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A; SCHULMAN, A (1999) IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98:704-711.

KYNAST, RG; RIERA-LIZARAZU, O; VALES, MI; OKAGAKI, RJ; MAQUIEIRA, SB; CHEN, G; ANANIEV, EV; ODLAND, WE; RUSSEL, CD; STEC, AO; LIVINGSTON, SM.; ZAIA, HÁ; RINES HW, PHILLIPS, RL; (2001). A complete set of maize individual chromosome additions to the oat genome. *Plant Physiology* 125: 1216-1227.

LIEU, P.; ZHANG, Y.; GILLES, P. (2002). SureScore SNP Genotyping kit: A single-base extension ELISA for discrimination of nucleotide polymorphisms. *Focus* 24:6-9.

MCCALLUM, C.; COMAI, L.; GREENE, EA.; HENIKOFF, S.; (2000) Target screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* 18: 455- 457

MCCOARD, S. A., FAHRENKRUG, S. C., ALEXANDER, L. J., FREKING, B. A., ROHRER, G. A., WISE, T. H., FORD, J. J.(2002) Source An integrated comparative map of the porcine X chromosome Authors:: [Animal Genetics](#), **33**, (3): 178-185

NAGARAJU, J.; KATHIRVEL, M.; SUBBAIAH, V.L MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, LD. (2002) FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for highthroughput genotyping and genetic mapping *Molecular and Celular Proves* 16:67-72.

PINGALI, P.L. AND PW HEISEY, 1999. Cereal crop productivity in developing countries: Past trend and future prospects. CIMMYT Economics Program Working Paper 99/03. Mexico, D.F.: CiMMYT.

REXROAD, CE; SCHLAPFER, JS; YANG, Y.; HARLIZIUS, B.'WOMACK, JE. (1999). A radiation hybrid map of bovine chromosome one. *Animal Genetics* 30:325-332.

RIERA-LIZARAZU, O, RINES, HW.; PHILLIPS, RI (1996). Cytological and milecular characterization of oat X maize partial hybrids. *Theor. Appl. Geneti* 93:123-135.

RINES HW.; RIERA –LAZARAZU, O, PHILLIPS RL (1995). Disomic maize chromosome-addition oat plants derived from oat X maize crosses. In K. Oono, F. Tawaiwa, eds, *Modification of Gene Expression and Non-Mendelian Inheritance*. National Institute of Agrobiological Resources Tsukuba, Japan pp 235-251.

RIERA –LAZARAZU, O; VALES, MI, ANANIEX, EV; RINES HW.; PHILLIPS RL (2000). Production and characterization of maize-chromosome 9 radiation hybrid derived from na oat-maize addition line. *Genetics* 156:327-339.

VIGNAUX, F; PRIAT, C; JOUQUAND, S; HITTLE, C.; JIANG, Z.; CHERON, A; RENIER, C.; ANDRE, C; GALIBERT, F; (1999) Toward a Dog Radiation hybrid map. *Journal of Heredity* 90(1):60-67.