

**X Curso sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças
Brasília, 28 a 30 de julho de 2010**

Aplicação de seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento genético e produção de sementes de tomate e outras hortaliças

Leonardo S. Boiteux
boiteux@cnph.embrapa.br
Embrapa Hortaliças

Maria Esther de Noronha Fonseca
mesther@cnph.embrapa.br
Embrapa Hortaliças

Introdução

A genética molecular e a análise genômica têm sido empregadas de maneira crescente em programas de melhoramento genético e na produção de sementes de hortaliças. A revolução da ciência genômica observada nos últimos 20 anos ampliou o conhecimento sobre a estrutura genética de diversas espécies de plantas (THRO *et al.*, 2004). O principal resultado destes avanços foi o desenvolvimento de uma ampla plataforma de recursos para a análise de genomas vegetais, incluindo modernas ferramentas de sequenciamento, bioinformática e vetores para clonagem de grandes fragmentos cromossômicos (THRO *et al.*, 2004). Estes desenvolvimentos culminaram com a elucidação completa dos genomas nucleares de duas espécies modelos: uma dicotiledônea (*Arabidopsis thaliana*, família Brassicaceae) e uma monocotiledônea (*Oryza sativa*, família Poaceae) (GOFF *et al.*, 2002). Toda esta informação, associada a sistemas de marcadores e a técnicas para análise em larga escala de transcritos, proteínas, mutantes naturais, insercionais e químicos, tem permitido definir melhor a função dos genes e, principalmente, a associação destes genes e suas variantes alélicas com fenótipos de interesse (THRO *et al.*, 2004).

Do ponto de vista da aplicação prática, a grande revolução nesta área veio em meados da década de 1980 com a técnica denominada "polymerase chain reaction" (PCR) (MULLIS, 1990). Cópia das fitas de DNA em série e "in vitro" até que a quantidade desejada seja obtida. Utiliza-se de uma enzima polimerase termo-estável, o que permite copiar em série DNA. A tecnologia da PCR tem sido o principal elo de integração entre melhoramento clássico e o "melhoramento molecular" permitindo viabilizar diferentes atividades de pesquisa e de rotina dentro dos programas integrados de melhoramento incluindo: **(01)** Determinação de pureza genética de cultivares e identificação de misturas físicas de sementes e de materiais de propagação vegetativa; **(02)** Estabelecimento de sistemas de caracterização molecular ("fingerprinting") que podem subsidiar e/ou fornecer amparo legal para proteção de cultivares; **(03)** Organização de germoplasma permitindo identificar duplicatas e/ou selecionar acessos mais representativos em termos de variabilidade genética dentro das coleções ("core collections"); **(04)** Determinação de potenciais grupos heteróticos e predição de heterose de acordo com a estimativa das distâncias genéticas entre acessos de germoplasma e de cultivares elites; **(05)** Diagnose molecular de fitopatógenos de importância econômica e/ou associados com sementes permitindo aumentar a qualidade sanitária de lotes comerciais; **(06)** Caracterização de variabilidade de patógenos permitindo desenvolver métodos para seleção de fontes com amplo espectro de resistência; **(07)** Seleção assistida por marcadores (SAM) visando aumentar a frequência de alelos de interesse ou restringir o tamanho dos segmentos genômicos de espécies selvagens no processo de introgressão de genes após cruzamentos interespecíficos. Exemplos bem sucedidos de SAM incluem incorporação simultânea de distintos genes de resistência a doenças em linhagens, seleção precoce para qualidade de frutos e raízes; incorporação de fatores de macho-esterilidade em linhagens parentais de híbridos; recuperação mais rápida do genoma de parentais recorrentes em retrocruzamentos assistidos por marcadores (STAM, 2003; CAHILL & SCHMIDT, 2004); **(08)** Monitoramento da incorporação de fatores genéticos controlando a expressão de características quantitativas ("quantitative trait loci" - QTL) via SAM; **(09)** Isolamento de regiões cromossômicas contendo genes e QTLs possibilitando a transferência

destes fatores genéticos via estratégias transgênicas para diferentes cultivares e espécies de planta (FRARY *et al.*, 2000); **(10)** Desenvolvimento, via sequenciamento em larga escala, de extensos catálogos de genes em plantas submetidas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos; **(11)** Obtenção da sequência completa de genomas de plantas e de diversos microorganismos. Esta informação sobre estruturas completas e/ou parciais de distintos genomas vegetais permite estimativas refinadas das relações filogenéticas e de sintonia entre grupos de ligação entre espécies de importância agrícola; **(12)** Desenvolvimento de projetos genomas funcionais em combinação com sistemas que permitem análise em larga escala de padrões de expressão gênica (“DNA chips” / “microarrays”) gerando os chamados transcriptomas; **(13)** Utilização de informações de genoma estrutural e funcional de espécies modelo para a busca e isolamento de genes análogos em espécies de interesse agrônomo e **(14)** Desenvolvimento de “novos” fenótipos (ex. “golden rice” e “blue rose”) via mobilização de genes em sistemas de transformação de plantas (transgenia), que podem, posteriormente, serem incorporados, via técnicas convencionais, em diferentes cultivares elites.

Marcadores moleculares baseados em PCR

(1) “Randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD) – Este sistema utiliza “primers” arbitrários de pequeno tamanho (5-10 pares de bases). Ele é simples, rápido e sem uso de radioatividade. Podem ser convertidos co-dominantes (inserções/deleções entre as regiões de anelamento dos “primers”) (WILLIAMS *et al.*, 1990). Cobertura do genoma com RAPD é relativamente bem extensa, embora exista em algumas espécies a tendência de aglomeração em algumas regiões genômicas específicas. Entre as principais desvantagens podem-se citar um número relativamente baixo de marcadores por reação resultando em um custo por marcador elevado. Os marcadores RAPD são predominantemente dominantes. Além disso, é necessário para visualização dos produtos em gel de agarose, o emprego de corantes cancerígenos (exemplo brometo de etídio). Outro importante aspecto é a necessidade de uma extração de DNA de boa qualidade. Preparações de ácidos

nucléicos de baixa qualidade podem afetar, em algumas situações, a reprodutibilidade deste sistema de marcadores (BOITEUX *et al.*, 1999). Os maiores tamanhos de amplicon (200-2000bp) obtido com RAPD permitem, após sequenciamento destes marcadores, o desenho de "primers" maiores e específicos. Estes sistemas de marcadores têm sido denominados como SCAR ("sequence characterized amplified regions") (PARAN & MICHELMORE, 1995); **(2) AFLP ("amplified fragment length polymorphism")** – Este sistema combina aspectos do RFLP (por ex. clivagem do DNA com enzimas de restrição) e posterior amplificação via PCR (VOS *et al.*, 1995). A adição enzimática de "linkers" (contendo extensões de nucleotídeos) aos fragmentos obtidos após clivagem com duas enzimas de restrição é a idéia original desta estratégia. Os "primers" são desenhados para anelar os segmentos do DNA que correspondem as regiões conhecidas do "linker" mais regiões desconhecidas do genoma que contenham homologia com as extensões dos "linkers". A marcação de somente um dos "primers" permite uma amplificação seletiva que mesmo assim ainda gera um grande número de polimorfismos. Estes marcadores são dominantes, mas pode ser convertidos para co-dominantes através de leituras em programas de computador concebidos para este propósito. As principais vantagens deste sistema são o número de marcadores por gel, especificidade, resolução e reprodutibilidade mais acentuadas. **(3) Microsatélites** – Estes marcadores são baseados em sequências repetidas comuns usualmente presentes nos genomas de eucariotos. Estas sequências repetidas tendem a contrair ou expandir devido a falhas na polimerase durante transcrição. Estas diferenças em tamanhos geram os polimorfismos que podem ser visualizados em géis. As sequências adjacentes a estas sequências repetidas são, no entanto, conservadas. Esta característica permite o desenho de "primers" específicos para PCR. Estes marcadores são majoritariamente codominantes e altamente polimórficos apresentando boa distribuição nos genomas de plantas (CREGAN *et al.*, 1994). O sistema de detecção é feito via eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose especial devido à necessidade de distinção de fragmentos que diferem por poucos pares de bases. O principal problema de ordem técnica associado a estes marcadores é a necessidade de identificar sequências adjacentes as regiões

repetitivas via construção de livrarias ou a partir de informações em bases de dados (exemplo GeneBank).

Exemplo de aplicações dos sistemas marcadores no melhoramento e produção de sementes de hortaliças

(a) Organização de germoplasma e determinação de potenciais grupos heteróticos.

O germoplasma brasileiro de *Capsicum*, embora fenotipicamente muito rico, permaneceu durante muitas décadas sem uma avaliação mais refinada da sua variabilidade genética. Cerca de 500 acessos de espécies de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças foram avaliados com 50 “primers” do tipo RAPD. Esta análise permitiu discriminar linhagens/populações a nível intraespecífico e interespecífico. Esta análise também permitiu a reconstrução do pedigree de diversas cultivares brasileiras tradicionais de *C. annuum*. Com esperado, estes estudos indicaram elevados níveis de similaridade deste germoplasma que inclui as cultivares ‘Agrônômico 10G’, ‘Ikeda’, ‘Magda’, ‘UFRJ-A’, ‘Cascadura Ikeda’, ‘Fortuna’ e ‘Avelar’. Resultados similares foram obtidos com o grupo de cultivares coletivamente conhecido como germoplasma do tipo “California Wonder. Acessos da espécie *C. baccatum* foram reunidos de acordo com sub-grupos botânicos e origem geográfica dando relevância biológica a estes dois critérios. Além disso, estes esforços permitiram identificar diversos acessos duplicados ou com classificação equivocada quanto a espécie botânica. Do ponto de vista aplicado, a informação gerada por este estudo fornece importantes informações para melhoristas e geneticistas em termos de orientar seleção de parentais para desenvolvimento de populações para melhoramento e para mapeamento genético de características de interesse.

(b) Sistemas de marcadores para resistência a doenças

Diversos mapas locais para regiões cromossômicas foram construídos para diversas hortaliças (MOHAN *et al.*, 1997). Estes mapas serviram como âncoras para isolar genes de resistência via mapeamento (“map based-cloning” ou “positional cloning”). O primeiro relato do isolamento e clonagem de um gene de resistência *Pto* (resistência a *Pseudomonas tomato*) foi via mapeamento e clonagem da região cromossômica contendo o marcador mais o gene de interesse. A análise de sequência indicou que *Pto* representa, estruturalmente, uma quinase (MARTIN *et al.*, 1993). Diversos genes de resistência foram posteriormente isolados via mapeamento ou via mutagênese insercional com transposons (BAKER *et al.*, 1997). O tomateiro é a hortaliça com um maior número de genes de resistência clonados até o presente momento. Após o isolamento de *Pto* foram isolados diversos genes incluindo *Cf-2*, *Cf-5*, *Cf-9* (raças de *Cladosporium*) (HAMMOND-KOSACK & JONES 1997); *Ve* (*Verticilium dahliae*); *I-2* (*Fusarium* raça 2) *Mi* (*Meloidogyne* spp., afídeos e tolerância a mosca-branca); *Sw-5* (*Tospovirus*) e *Asc* (*Alternaria alternata* – “stem canker”). A comparação das sequências destes diversos genes indicou, de maneira surpreendentemente, que diversas regiões gênicas estavam conservadas ao longo da evolução mesmo para patógenos tão díspares quanto fungos, bactérias, nematóides e vírus (STASKAWICZ *et al.*, 1995; BENT, 1996). Esta conservação de sequências entre distintos genes de resistência clonados permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores: os chamados “disease resistance analogs” (MICHELMORE, 1995; LEISTER *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1996). Esta estratégia tem sido usada para isolar genes de resistência “candidatos” em várias espécies de planta.

(c) Marcadores funcionais para resistência a doença do vira-cabeça controlada pelo gene *Sw-5*

Outro grande avanço no melhoramento genético foi o isolamento e caracterização do gene *Sw-5*. Este gene foi incorporado em variedades comerciais a partir de cruzamentos com a espécie selvagem *S. peruvianum* (STEVENS *et al.*, 1992). Este complexo locus de resistência foi nomeado *Sw-5* e plantas que o

expressam são capazes de restringir a distribuição sistêmica de diferentes espécies virais, apresentando somente sintomas localizados representados por lesões locais causadas por reação de hipersensibilidade (HR) (STEVENS *et al.*, 1992; BOITEUX & GIORDANO, 1993). O locus *Sw-5* foi mapeado no braço longo do cromossomo 9 e foi isolado através de clonagem posicional (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000; SPASSOVA *et al.*, 2001). Além disso, foi verificado que o fator de resistência a tospovírus reside em um complexo formado por cinco cópias do gene, denominadas *Sw-5a* a *Sw-5e* (SPASSOVA *et al.*, 2001). Para o monitoramento de uma região genômica que codifica uma determinada expressão de um fenótipo, os marcadores denominados “derivados do gene” ou “funcionais” (VARSHNEY *et al.*, 2005) representam uma ferramenta robusta, já que não há riscos de separação acidental através de eventos de recombinação genética (*crossing-over*) como reportado para marcadores ligados ao gene. Até o momento, a identificação de marcadores funcionais, específicos e co-dominantes derivados exclusivamente do locus *Sw-5* não estão publicamente disponíveis, apesar de que a totalidade deste foi clonada e caracterizada (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000; SPASSOVA *et al.*, 2001). A maioria dos marcadores moleculares disponíveis para o monitoramento da incorporação do gene *Sw-5* é apenas geneticamente próxima ao gene e podem, ocasionalmente, ser separados do gene através de recombinação genética. Marcadores derivados do próprio gene *Sw-5* seriam ideais para diferenciar, com certeza, plantas suscetíveis e resistentes. Recentemente, a Embrapa Hortaliças, em colaboração com a Universidade de Brasília, estabeleceram um sistema de marcadores moleculares altamente eficientes na identificação do gene *Sw-5* (DIANESE *et al.*, 2010). As grandes vantagens deste sistema de marcador são: **(1)** ele é universal (isto é, funciona para diferentes cultivares e grupos varietais) e **(2)** é co-dominante (isto é, o pesquisador consegue separar plantas homozigotas resistentes de plantas heterozigotas, também resistentes). Estas características são cruciais para as empresas de sementes que visam o desenvolvimento de linhagens parentais de híbridos de tomateiro. Desta forma, o desenvolvimento deste novo marcador aumentará a capacidade de monitoramento da incorporação do gene *Sw-5*

em material genético de elite utilizado em programas de melhoramento genético no Brasil e no mundo.

(d) Monitoramento de citoplasma macho estéril

O fenômeno da heterose, amplamente definido com sendo a situação aonde o híbrido F_1 supera as linhagens parentais em termos de performance e/ou estabilidade e/ou uniformidade, tem sido explorado intensivamente em diversas hortaliças. Alguns problemas práticos na produção de sementes híbridas envolvem a emasculação do parental feminino. Neste sentido, a presença de macho-esterilidade genética representa uma grande vantagem sobre emasculação artificial. Os marcadores moleculares podem prestar valiosos auxílios aos melhoristas através da identificação precoce de genótipos de interesse. Em hortaliças, os sistemas genéticos-citoplásmaticos têm sido os mais empregados, notadamente em cebola e cenoura. Neste sistema existem seis possíveis genótipos: **(1)** N (citoplasma normal) *Ms Ms* (gene nuclear homozigoto dominante controlando fenótipo normal = linha restauradora); **(2)** N *Ms ms* = normal; **(3)** N *ms ms* = normal (= linha B mantenedora); **(4)** S (citoplasma estéril) *Ms Ms* = normal; **(5)** S *Ms ms* = normal e **(6)** S *ms ms* = (macho estéril = linha A). Tanto a cebola quanto a cenoura são plantas bianuais com um grande número de minúsculas flores perfeitas, o que inviabiliza a produção manual de semente híbrida. Desta forma, o uso de SAM tem se revelado uma importante ferramenta na identificação de citoplasma macho-estéril usando simples marcadores baseados em PCR. Estes polimorfismos entre linhas férteis e estéreis foram identificados tanto em DNA mitocondrial quanto em DNA de cloroplastos em cebola (HAVEY, 1995) e em DNA de *mitocôndria em cenoura* (BACH et al., 2002). Um elemento fundamental para aumentar a eficiência do sistema será a identificação de marcadores para o gene nuclear mantenedor (*Ms*) permitindo uma pronta e precoce identificação de todos os genótipos de interesse para produção de linhagens e híbridos nestas duas hortaliças.

(e) Diagnose e detecção molecular de fitopatógenos

Diversos projetos genomas de fitopatógenos já se encontram em andamento ou já foram finalizados. Neste campo destaca-se a participação de grupos de pesquisa brasileiros que se encontram em posição de liderança nesta área (para revisão ver CAMARGO, 2002). Alguns projetos de destaque estão *Xylella* spp. (videira e citrus); *Ralstonia solanacearum*; *Agrobacterium tumefaciens*; *Xanthomonas citri*; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; *Pseudomonas syringae*; brusone (*Magnaporthe grisea*). Além disso, segue em curso uma série de projetos de análise genômica de vários fitopatógenos em distintos laboratórios e instituições de pesquisa mundiais. No CNPH projetos estão sendo conduzidos visando identificar marcadores espécie-específicos para diversas espécies de *Alternaria* e *Stemphylium*. O sequenciamento de diversas geminivíroses e potyvíroses (INOUE-NAGATA *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2008) também está em progresso. Estes projetos têm gerado informação genética para o desenvolvimento de “primers” que podem ser altamente **específicos** (permitindo a detecção de um único variante do patógeno) ou **universais** (permitindo a detecção de um número expressivo de variantes de um patógeno ou grupo de patógenos). Estas técnicas de análises e detecção são rotineiramente conduzidas via PCR.

(f) Mapeamento de características quantitativas (QTL)

QTL representa a localização cromossômica de um locus que afeta parcialmente a expressão de uma característica quantitativa. O primeiro QTL foi um marcador morfológico. Em 1923, Sax observou que o tamanho da semente (característica quantitativa) estava associado com cor do grão (característica monogênica) em feijão. Em 1961, Thoday estabeleceu o moderno conceito de QTL ao afirmar que características monogênicas poderiam ser usadas para detectar QTL se eles co-segregassem. A idéia atual de QTL é essencialmente a mesma só que desta vez contando com as inovações tecnológicas que são os marcadores moleculares e os

mapas genéticos de alta densidade gerados pelo emprego destes marcadores (TANKSLEY, 1993). Uso de mapas genéticos para estudar características poligênicas tem sido aplicado para diversas características de interesse incluindo resistência a doenças em diversas hortaliças (YOUNG *et al.*, 1996) e tamanho de fruto em tomateiro (FRARY *et al.*, 2000)

(g) Genética e genômica do controle do teor de Brix em tomate

Estudos genéticos e moleculares (envolvendo cruzamentos com distintos acessos de espécies selvagens de tomateiro de elevado Brix) têm demonstrado a presença de pelo menos 32 QTLs para sólidos solúveis. Estes QTLs estão espalhados por todos os doze cromossomos do tomateiro (CAUSSE *et al.*, 2004). Dois *loci* importantes (denominados brx2.1 e brx2.2) foram identificados no cromossomo 2 do tomateiro em estudos de mapeamento genético. O *locus* brx2.2 está ligado a um QTL para número de lóculos e com um QTL para peso de fruto. Outras regiões do genoma do tomateiro importantes para determinação do teor de Brix foram detectadas no cromossomo 1 em cruzamentos envolvendo as espécies selvagens *S. chmielewskii* e *S. habrochaites*. Um gene codificador da ADPglucose pirofosforilase (enzima essencial para a acumulação de amido nos frutos e que apresenta maior expressão em linhagens de tomate com maior Brix) está, coincidentemente, localizado também no cromossomo 1. Desta forma, este gene é um potencial candidato para explicar este QTL para mais elevado Brix presente nesta região do genoma do tomateiro. Na espécie *S. chmielewskii* um QTL de Brix elevado está ligado tanto com firmeza quanto com uma coloração pouca intensa dos frutos. Recentemente, um QTL localizado no cromossomo 9 (Brix9-2-5), que aumenta o valor Brix de maneira moderada, co-segregou com um gene codificador da enzima invertase da parede celular (um gene que tem expressão específica na flor e no fruto). Estudos posteriores, analisando um conjunto de segmentos genômicos de espécies selvagens, indicaram um QTN (“quantitative trait nucleotide”) que confere propriedades cinéticas diferenciadas desta invertase. Estudos de fisiologia vegetal com linhas de introgressão derivadas da espécie selvagem *S.*

pennellii revelou que o aumento do Brix do fruto maduro foi devido a um aumento nos teores de sacarose e glicose (FRIEDMAN *et al.*, 2000). Este aumento foi condicionado por uma maior atividade da invertase na columela do fruto, aumentando a capacidade de extrair sacarose do floema. No entanto, muitas questões sobre a genética do Brix ainda não estão respondidas. Muitos QTLs para teores de açúcares e Brix têm sido localizados no genoma do tomateiro e, atualmente, cerca de 60 genes envolvidos no metabolismo de carbono foram mapeados. Muitos destes genes podem estar associados com os teores mais elevados de açúcares /Brix.

Conclusões

Os desenvolvimentos advindos da revolução tecnológica da moderna biologia molecular e da análise genômica têm sido progressivamente incorporados no cotidiano dos programas de melhoramento genético e nos sistemas de produção de sementes de hortaliças. Estas ferramentas incluem os novos e robustos sistemas de geração de marcadores genéticos, as novas técnicas diagnose de fitopatógenos e as novas estratégias de mapeamento cromossômico de alta densidade/resolução usando marcadores moleculares. Mais recentemente, temos observado os enormes potenciais de aplicação da ciência genômica estrutural e funcional. O sequenciamento de genomas completos de animais, plantas dicotiledôneas, monocotiledôneas e diversos microorganismos poderão servir como uma inesgotável fonte de genes/marcadores para o melhoramento clássico e para o desenvolvimento de cultivares de hortaliças geneticamente transformadas.

Referências

Bach IC; Olesen A; Simon PW (2002) PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.) *Euphytica* 127: 353-365.

Baker B; Zambyrski P; Staskawicz B; Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. **Science** 276: 726-733.

Bent AF (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. **Plant Cell** 8: 1757-1771.

Boiteux LS; Giordano LB (1993) Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica** 71:151-154.

Boiteux LS; Fonseca MEN; Simon PW (1999) Effect of plant tissue and DNA purification methods on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota*). **Journal of American Society for Horticultural Sciences** 124: 32-38.

Brommonschenkel SH; Frary A; Tanksley SD (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13:1130-1138.

Causse M; Duffe P; Gomez MC; Buret M; Damidaux R; Zamir D; Gur A; Chevalier C; Lemaire-Chamley M; Rothan C (2004) A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. **Journal of Experimental Botany** 55: 1671-1685.

Camargo LEA (2002) Interações patógeno-hospedeiro: Contribuições da genômica. **Fitopatologia Brasileira** 27: S12-S14.

Cregan PB; Akkaya MS; Bhagwat AA; Lavi U; Rongwen J (1994) Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. In; Plant Genome Analysis (PM Gresshoff, editor). CRC Press, Boca Raton, Flórida.

Dianese EC; Fonseca MEN; Goldbach R; Kormelink R; Inoue-Nagata AK; Resende RO; Boiteux LS (2010) Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. **Molecular Breeding** 25: 133-142.

Fernandes FR; Albuquerque LC; Giordano LB; Boiteux LS; Avila AC; Inoue-Nagata AK. (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite *Begomovirus* species associated to tomatoes. **Virus Genes** 36: 251-258.

Frary A; Nesbitt TC; Frary A; Grandillo T; Van der Knaap E; Cong B; Liu J; Meller J; Elber R; Alpert KB; Tanksley S (2000) Cloning of *fw-2* a QTL controlling fruit size in tomato. **Science** 289: 85-88.

Fridman E; Pleban T; Zamir D (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 97: 4718–4723.

Havey M (1995) Marker-facilitated selection of male sterile cytoplasm in onion. **Theoretical and Applied Genetics** 91: 387.

Hammond-Kosack KE; Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 48: 575-607.

Inoue-Nagata AK; Fonseca MEN; Resende RO; Boiteux LS; Monte DC; Dusi AN; Avila AC; van der Vlugt RAA (2002) Pepper yellow mosaic virus: A new potyvirus in sweet pepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology** 147: 849-855.

Kanazin V; Marek LF; Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 93: 11750-11755.

Leister D; Ballvora A; Salamini F; Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics** 14: 421-429.

Martin GB; Brommonschnkel SH; Chunwongse J; Frary A; Ganai MW; Spivey R; Wu T; Earle ED; Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science** 262: 1432-1436.

Michelmore RW (1995) Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology** 15: 393-427.

Michelmore RW; Paran I; Kesseli RV (1991) 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 USA** 88: 9828-9832.

Mohan M; Nair S; Bhagwat A; Krishna TG; Yano M; Bhatia CR; Sasaki T (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding** 3: 87-103.

Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American** 262: 56-65.

Paran I; Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics** 85: 985-993.

Smith OS; Smith JSC; Bowen SL; Tenborg RA; Wall SJ (1990) Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, grain yield heterosis and RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics** 80: 833-840.

Spassova MI; Prins TW; Folkertsma RT; Klein-Lankhorst RM; Hille J; Goldbach RW; Prins M (2001) The tomato gene *SW5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. ***Molecular Breeding*** 7: 151-161.

Stevens MR; Scott SJ; Gergerich RC (1992) Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. ***Euphytica*** 59: 9-17.

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. ***Science*** 268: 661-667.

Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. ***Annual Review of Genetics*** 27: 205-233.

Varshney RK; Graner A; Sorrells ME (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. ***Trends on Plant Science*** 10: 621-630.

Vos P; Hogers R; Bleeker M; Reijans M; van der Lee T; Hornes M; Frijters A; Pot J; Peleman J; Kupier M; Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. ***Nucleic Acids Research*** 23: 4407-4414.

Williams JGK; Kubelik AR; Livak JA; Rafalski JA; Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. ***Nucleic Acids Research*** 18: 6531-6535.

Yu YG; Buss GR; Saghai-Maroo MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease resistance genes in soybean based on conserved nucleotide-binding site. ***Proceedings of the National Academy of Sciences USA*** 93: 11751-11756