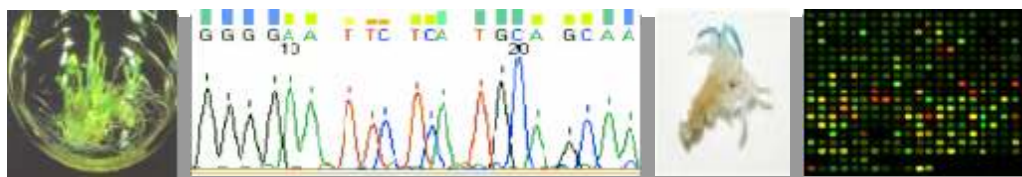


## Ferramentas Biotecnológicas Aplicadas à Cultura da Soja



A partir década de 60 a agricultura mundial ganhou força com o emprego de técnicas de melhoramento genético. Estas técnicas permitiram, através de cruzamentos, o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e adaptadas a diversos ambientes. Em meados da década de 70, com a descoberta de estruturas e mecanismos moleculares responsáveis pela expressão e transferência da informação genética, as primeiras ferramentas biotecnológicas foram desenvolvidas.

Dentre as diversas ferramentas biotecnológicas hoje disponíveis, o emprego de Marcadores Moleculares tem desempenhado papel fundamental no auxílio aos Programas de Melhoramento para o desenvolvimento de variedades com elevada produtividade, adaptadas a diversos ambientes e resistentes as mais variadas doenças. Um marcador molecular pode ser definido como toda e qualquer característica molecular correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Estes permitem diferenciar dois indivíduos com base no seu genoma e são caracteres herdáveis (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A seleção de indivíduos com base nas diferenças em nível de DNA, através do emprego de marcadores moleculares, pode ser mais vantajosa do que a seleção baseada nas características visíveis (fenótipos), uma vez que esses marcadores independem do ambiente e não mudam durante o ciclo de vida do indivíduo. A seleção baseada em características fenotípicas geralmente apresenta maior sucesso para características de alta herdabilidade, mas nem sempre para as de baixa herdabilidade.

Os marcadores moleculares de DNA podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação do DNA via reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). O primeiro tipo de marcador amplamente utilizado, ainda na década de 70, foi baseado na técnica de hibridização. Esses marcadores foram chamados de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ou seja, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (Botstein et al., 1980). Essa técnica se baseia no princípio de que diferenças no DNA podem resultar em corte diferenciado do mesmo por enzimas de restrição. Essas enzimas são proteínas capazes de reconhecer seqüências específicas e cortar o DNA nessas posições, razão pela qual são chamadas as “tesouras” da biologia molecular, resultando em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. A detecção dessa variação de tamanho é feita através de sondas específicas (seqüências de DNA), que se pareiam a seqüências complementares do DNA do indivíduo em estudo (hibridização) e são marcadas com algum produto que permita sua visualização (radioatividade, fluorescência). Outro tipo de marcador que também se baseia na técnica de hibridização são os minisatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (Jeffreys et al., 1985), que foram bastante utilizados em exames de paternidade em humanos até meados dos anos 90.

Os marcadores baseados na reação de PCR são os mais utilizados atualmente e se baseiam na amplificação de fragmentos específicos de DNA, delimitados por iniciadores (primers), utilizando a enzima DNA polimerase, a mesma que participa na replicação do material genético in vivo. Os iniciadores são pequenos pedaços de DNA (em geral entre 10 e 30 nucleotídeos) e servem como ponto de partida para a polimerase copiar o DNA. A posição dos iniciadores é que define a seqüência a ser copiada e o resultado obtido é a amplificação de um determinado fragmento do DNA em milhões de cópias, caso este esteja presente no genoma do indivíduo.

Dentre os marcadores de DNA baseados na técnica de PCR, destacam-se os seguintes: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (Paran & Michelmore, 1993) e microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) (Prowell et al., 1996). Enquanto os marcadores RAPD e AFLP usam iniciadores inespecíficos, os marcadores de microssatélites e SCAR utilizam iniciadores que direcionam a amplificação de um fragmento específico e pré-determinado do genoma.

Os marcadores podem ser também divididos em marcadores dominantes e marcadores co-dominantes. Os marcadores dominantes são aqueles em que somente uma das formas pode ser visualizada, significando que indivíduos carregando dois alelos não podem ser diferenciados de indivíduos que carregam apenas o alelo dominante. Esse é o caso dos marcadores RAPD, AFLP e em alguns casos os marcadores SCARs.

# Circular 47 Técnica

Londrina, PR  
Setembro, 2007

## Autores

### Francismar C. Marcelino

Bióloga, Dra  
Embrapa Soja  
Cx. Postal 231  
86001-970, Londrina, PR  
francm@cnpsa.embrapa.br

### Eliseu Binneck

Engº Agrônomo, Dr  
Embrapa Soja  
Cx. Postal 231  
86001-970, Londrina, PR  
binneck@cnpsa.embrapa.br

### Ricardo Vilela Abdelnoor

Engº Agrônomo, Dr  
Embrapa Soja  
Cx. Postal 231  
86001-970, Londrina, PR  
ricardo@cnpsa.embrapa.br

### Alexandre L. Nepomuceno

Engº Agrônomo, Dr  
Embrapa Soja  
Cx. Postal 231  
86001-970, Londrina, PR  
nepo@cnpsa.embrapa.br

Por outro lado, marcadores co-dominantes são aqueles em que as duas ou mais formas podem ser visualizadas, como é o caso dos marcadores RFLP, VNTR e microssatélites.

Entre as principais aplicações de marcadores de DNA em programas de melhoramento de plantas estão: o monitoramento e organização da variabilidade genética; a seleção assistida por marcadores moleculares; e a proteção de cultivares. Ainda podem ser utilizados em estudos de genética de populações, construção de mapas genéticos, mapeamento de loci de caracteres quantitativos (QTLs) e análises de similaridade e distância genética (Lend et al., 1990; Padilha et al., 2003; Reiter et al., 1992; Russeal et al., 1997).

Atualmente, marcadores moleculares vêm sendo utilizados intensamente na Embrapa Soja, para o mapeamento de genes de resistência a doenças, caracterização de cultivares de soja, estudos de diversidade genética na soja e em fito e entomopatógenos, dentre outras aplicações. Marcadores do tipo microssatélites vêm sendo utilizados, por exemplo, no mapeamento de genes envolvidos na resistência a ferrugem Asiática da soja, doença que tem causado sérios danos à cultura, com a elevação do custo de produção e redução da produtividade. Esses marcadores podem ser usados para se fazer a seleção de plantas que carreguem genes de resistência, como o caso do marcador AF162283 (Figura 1), que está ligado ao gene de resistência Rpp4 (Silva et al., 2007).

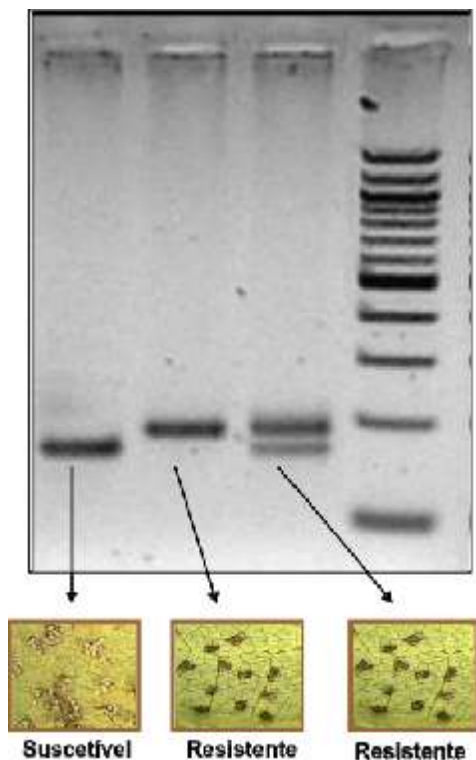


FIGURA 1 Seleção de plantas que carreguem genes de resistência utilizando marcador molecular do tipo microssatélite. 1 - indivíduo homocigoto apresentando o fenótipo de susceptibilidade à ferrugem Asiática da soja; 2 - indivíduo homocigoto apresentando o fenótipo de resistência à ferrugem Asiática da soja; 3 - indivíduo heterocigoto apresentando o fenótipo de resistência à ferrugem Asiática da soja.

Um dos principais frutos advindos do emprego das ferramentas biotecnológicas é o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs), que passaram a oferecer possibilidades e alternativas importantes para vários problemas de caráter econômico, e de melhoria na qualidade de vida humana e do meio ambiente.

O processo de introdução de construções gênicas no genoma de uma espécie, por métodos não naturais é denominado **Transformação**. As construções genéticas introduzidas que derivam os organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser produzidas por pelo menos três metodologias para transformação: técnicas envolvendo a introdução direta do material genético no organismo (biobalística), emprego de cepas de bactérias capazes de transferir genes para plantas (*Agrobacterium* sp.) e fusão celular por métodos não naturais.

Qualquer construção genética utilizada para produzir OGMs deve apresentar pelo menos três elementos básicos: o promotor, que controla a expressão do transgene no organismo; a região codificadora, que codifica a proteína de interesse; e a região terminadora, que determina o final do processo de transcrição do gene. Além disso, pode ser usado um gene marcador que serve para selecionar as células que, de fato, foram transformadas. A soja resistente ao herbicida glifosato, por exemplo, tem como região reguladora o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV35S); como região codificadora, o gene para a proteína EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens*, que confere a resistência ao herbicida, e como região terminadora, o terminador do gene da nopalina sintase (NOS), também de *Agrobacterium* (Figura 2).

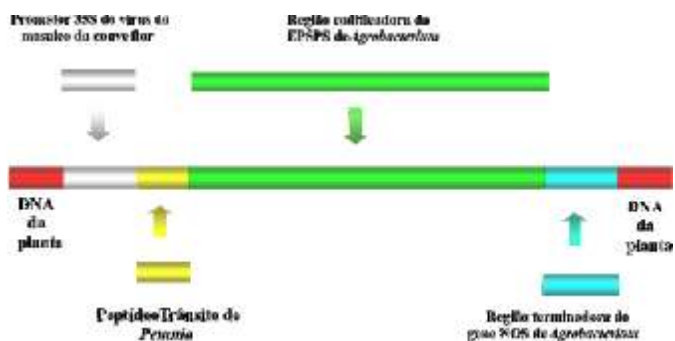


FIGURA 2 - Representação da construção presente na soja resistente ao herbicida glifosato. Região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor, peptídeo de trânsito de Petúnia, gene que codifica a proteína EPSPS, que confere a resistência ao herbicida, e o terminador do gene da nopalina sintase (NOS).

Atualmente a Embrapa Soja vem empregando técnicas de transformação gênica por biobalística para introdução de construções gênicas visando à obtenção de plantas tolerantes à seca (Figura 3). Esta técnica é caracterizada pela aceleração do fragmento de DNA, ligado à partículas de ouro ou tungstênio, contra o tecido a ser transformado, utilizando para tal um equipamento conhecido como Acelerador de Partículas ou Revólver de Genes ou *Gene Gun*.



FIGURA 3 - Sistema para transformação em soja pela técnica de biobalística.

As plantas transformadas com construções que visam tolerância a seca estão sendo testadas para verificar a eficiência da estratégia molecular empregada. A análise destes eventos quanto a aspectos fisiológicos, como taxa fotossintética e de transpiração, condutância estomática e eficiência fotossintética, em experimentos conduzidos em casa de vegetação, revelou que as plantas GM responderam mais eficientemente às condições de estresses a que foram submetidas (Figura 4).



FIGURA 4 - Plantas de soja transgênica contendo a construção gênica para tolerância à seca (direita) e não transgênicas (esquerda), sob estresse hídrico (2,5% de Umidade Gravimétrica no solo).

Além deste evento transgênico, a Embrapa soja, em parceria com outras empresas, já lançou variedades geneticamente modificadas (GM) que apresentam resistência ao herbicida glifosato, e, atualmente, já vem testando em experimentos de campo novos genótipos GMs tolerantes a herbicidas do grupo imidazolinonas. Nestes dois últimos casos, a introdução do transgene nas variedades da Embrapa se deu por cruzamentos convencionais com cultivares já contendo o transgene.

A adoção das técnicas de transformação para transferência de genes entre as espécies cada vez mais vem se intensificando. Muitos novos eventos transgênicos vêm sendo desenvolvidos e testados nos últimos anos, principalmente por grandes empresas do setor privado. Dentre estes eventos podemos citar soja e algodão com resistência a herbicidas e insetos, diferentes eventos de milho tolerantes a insetos, batata com

resistência a vírus, arroz com alto teor de vitamina A, tomate com amadurecimento tardio, entre outros.

A identificação de genes e dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas aos mais variados tipos de estresses, bióticos ou abióticos, constitui uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias de controle. Neste sentido, técnicas relacionadas ao estudo da **Expressão Diferencial de Genes**, em resposta a determinado tipo de estresse, como Microarranjo de DNA, Bibliotecas Substrativas de cDNA e PCR quantitativo, tem sido as principais ferramentas empregadas pela Embrapa Soja para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas à seca e à infecção dos principais fitopatógenos que acometem a cultura, como *Phakopsora pachyrhizi*, que causa a ferrugem Asiática da soja, e nematóides (*Heterodora glycines*, *Meloidogyne* spp.).

Técnicas para análise diferencial da expressão de genes utilizam principalmente como alvo de estudo os transcritos (moléculas de RNAm), que são sintetizados pelo indivíduo durante o estresse, em comparação com aqueles produzidos na ausência do mesmo. A análise global dos transcritos de um organismo expressos em situações específicas constitui uma das áreas da era Genômica, também conhecida como Transcriptômica. Os transcritos presentes apenas na situação de presença do estresse, ou seja, diferencialmente expressos, são potencialmente codificados por genes que participam de rotas metabólicas que respondem ao estresse. Como consequência, é possível a identificação de genes ou rotas metabólicas cruciais para o fenótipo de tolerância ao estresse. A identificação destes genes e/ou rotas metabólicas amplia as possibilidades do desenvolvimento de estratégias moleculares para tolerância ou resposta eficiente ao estresse, por exemplo, pela utilização de genes principais à reposta como marcadores para seleção de indivíduos tolerantes, e até mesmo estratégias para a criação de cultivares transgênicos resistentes/tolerantes por transformação direta de plantas.

Um exemplo desse tipo de estudo é a análise da expressão diferencial de genes de soja frente à inoculação por *Phakopsora pachyrhizi*, pela técnica de microarranjo. Amostras de RNA mensageiro (RNAm) dos dois acessos, nas situações de presença e ausência do patógeno, foram isoladas e hibridizadas com uma lâmina contendo cerca de 36.000 seqüências gênicas de soja fixadas. Como os transcritos isolados em cada tipo de tratamento são marcados com diferentes corantes, é possível verificar a hibridização diferencial dessas moléculas de RNAm com os seus respectivos fragmentos complementares presentes na lâmina. Da análise destes 36.000 genes, foi possível identificar genes que são expressos apenas na condição de infecção com o fungo da ferrugem no genótipo resistente, incluindo alguns homólogos à fatores de transcrição, que são proteínas capazes de regular (ativando ou inibindo) a expressão de outros genes que foram apenas induzidos no genótipo resistente após a infecção com o patógeno (Van der Mortel et al., 2007).

A análise da expressão diferencial de genes pode ainda ser realizada utilizando como alvo de estudo o produto final da expressão gênica, ou seja, as proteínas expressas, bem como metabólitos específicos derivados das rotas metabólicas ativadas pelo tipo de estresse. O estudo da expressão gênica ao nível de proteína é

denominado Proteômica, e o de metabólitos de Metabolômica.

Independente da técnica adotada, as análises de expressão diferencial de genes, principalmente envolvendo as técnicas de microarranjos de DNA, construção e sequenciamento de bibliotecas de cDNAs, geram uma quantidade imensurável de dados, que necessitam de ferramentas de **Bioinformática** para serem analisados e interpretados.

A rápida expansão do volume de dados de seqüências biológicas (nucleotídeos e proteínas) nos últimos anos, produzidas pela automatização do sequenciamento de DNA, e o acúmulo de outras informações como dados de expressão de genes e proteínas, interações moleculares, perfil metabólico, estruturas moleculares, filogenia, entre outros, constituem uma significativa demanda por recursos de manipulação e análise computacional cada vez mais modernos e especializados (Binneck, 2006). Para o desenvolvimento desses recursos, surgiu a bioinformática, uma nova área técnico-científica multidisciplinar que faz a interface entre matemática, estatística, ciência da computação, tecnologia da informação e biologia, e se baseia na utilização de recursos da informática para aquisição, processamento, armazenamento, recuperação, análise, distribuição e interpretação da informação relacionada com as macromoléculas biológicas; DNA, RNA e proteínas (Benton, 1996; Luscombe *et al*, 2001; Prosdoci *et al*, 2003). A bioinformática é imprescindível para que todo o volume de informação biológica possa ser convertido em um melhor conhecimento da estrutura, função e variabilidade dos genes nas plantas, de modo que a aplicação desse conhecimento possa levar à descoberta de novas estratégias para melhorar a capacidade produtiva das cultivares nas diferentes condições de cultivo, garantindo a produção de alimentos e energia no futuro.

A publicação da seqüência genômica completa de duas plantas modelo, *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) e arroz (Goff *et al*, 2002; Yu *et al*, 2002), já tem contribuído para o entendimento dos processos que são conservados em todos os eucariotos, a identificação de genes específicos de plantas e um melhor entendimento da função de vários genes, mas o desafio maior agora é a aplicação dessas novas informações no melhoramento de plantas de uma maneira rápida e sistemática. Os genomas de outras culturas importantes estão sendo atualmente seqüenciados, como é o caso do milho (Messing & Dooner, 2006; Chan *et al*, 2006), e mais recentemente foi anunciado o seqüenciamento do genoma da soja (Jackson *et al*, 2006).

As grandes metas do melhoramento genético hoje são obter resistência a doenças e insetos pragas, adaptação aos estresses ambientais e melhoria da qualidade nutricional (Aragão, 2003). O longo tempo para o desenvolvimento de novas cultivares com algumas dessas características pelos métodos de melhoramento clássicos, que envolvem a introgressão convencional de novos genes a partir de genótipos silvestres, pode ser um ponto limitante (Castro *et al*, 2006). Nesse contexto, a utilização da biotecnologia moderna com as aplicações das ciências genômicas e das ferramentas da bioinformática, podem ser de grande auxílio, considerando que essas tecnologias têm revolucionado

profundamente as perspectivas e a velocidade de utilização do conhecimento biológico na obtenção de cultivares mais adaptadas e mais produtivas.

Um conhecimento detalhado das interações entre a planta e o agente causal da infecção/dano deverá possibilitar o desenvolvimento e incorporação de resistências mais duráveis a muitas doenças e pragas. Essas novas abordagens de controle, suportadas pela informação obtida a partir de estudos genômicos, será importante tanto para aumentar a produtividade das culturas como para reduzir a degradação ambiental ou mesmo a presença de resíduos nos alimentos, problemas que podem estar associados com as práticas agrônômicas tradicionais, utilizando fungicidas e inseticidas.

Questões específicas demandadas pelos diferentes desafios da pesquisa biotecnológica podem ser abordadas optando-se, hoje, com o auxílio da bioinformática, por fazer uma análise computacional inicial a partir das informações disponíveis em bancos de dados biológicos (Dicks, 2000) para direcionar e selecionar as estratégias experimentais, com considerável economia financeira e de tempo. Esses procedimentos podem ser extremamente efetivos na aceleração da obtenção dos resultados e descobertas científicas desejados. Além disso, muitas descobertas científicas estão sendo feitas simplesmente pela análise sistematizada dessas fontes de informação, que não param de aumentar (Galperin, 2007). Entretanto, essas informações estão espalhadas em múltiplas fontes, impossibilitando que se obtenha diretamente a informação requerida, sendo necessária, em um laboratório voltado para a pesquisa avançada em biotecnologia de plantas, a existência de estrutura computacional e competência profissional na área de bioinformática para converter esses dados complexos e heterogêneos em dados úteis, informação organizada e sistematizada conforme as necessidades de cada linha de pesquisa. Problemas assim determinam que cada vez mais as instituições que desenvolvem pesquisa na área da biotecnologia façam investimentos na área de bioinformática (Binneck, 2004).

## Referências:

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, p. 796-815, 2000.

ARAGÃO, F. J. L. Engenharia genética no melhoramento de plantas. In: Borém, A., Giúdice, M. & Sediya, T. (Ed.). **Melhoramento genômico**. Viçosa: UFV, 2003.

BENTON, D. Bioinformatics principles and potential of a new multidisciplinary tool. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 8, p. 261-72, 1996.

BINNECK, E. As Ômicas: integrando a bioinformação. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 28-37, 2004.

- BINNECK, E. Bioinformática aplicada à análise genômica. In: PIPOLO, V. C. P.; GARCIA, J. E. J. (Ed.). **Biotechnologia na agropecuária: aplicações e biossegurança**. Cascavel: Coodetec, 2006, cap. 5, p. 107-155.
- CASTRO, A. M. G.; LIMA, S. M. V.; LOPES, M. A.; MACHADO, M. S.; MARTINS, M. A. G. **O futuro do melhoramento genético vegetal no Brasil: impactos da biotecnologia e das leis de proteção de conhecimento**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.
- CHAN, A. P.; PERTEA, G.; CHEUNG, F.; LEE, D.; ZHENG, L.; WHITELAW, C.; PONTAROLI, A. C.; SANMIGUEL, P.; YUAN, Y.; BENNETZEN, J.; BARBAZUK, W. B.; QUACKENBUSH, J.; RABINOWICZ, P. D. The TIGR Maize Database. **Nucleic Acids Research**, v.34, p. D771-6, 2006. (Database issue).
- DICKS, J. Plant genome databases: from references to inference tools. **Briefings in Bioinformatics**, v. 1, n. 2, p. 138-50, 2000.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- GALPERIN, M. Y. The Molecular Biology Database Collection: 2007 update. **Nucleic Acids Research**, v. 35(Database issue), p. D3-4, 2007.
- GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAN, T. H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H.; HADLEY, D.; HUTCHISON, D.; MARTIN, C.; KATAGIRI, F.; LANGE, B. M.; MOUGHAMER, T.; XIA, Y.; BUDWORTH, P.; ZHONG, J.; MIGUEL, T.; PASZKOWSKI, U.; ZHANG, S.; COLBERT, M.; SUN, W. L.; CHEN, L.; COOPER, B.; PARK, S.; WOOD, T. C.; MAO, L.; QUAIL, P.; WING, R.; DEAN, R.; YU, Y.; ZHARKIKH, A.; SHEN, R.; SAHASRABUDHE, S.; THOMAS, A.; CANNINGS, R.; GUTIN, A.; PRUSS, D.; REID, J.; TAVTIGIAN, S.; MITCHELL, J.; ELDREDGE, G.; SCHOLL, T.; MILLER, R. M.; BHATNAGAR, S.; ADEY, N.; RUBANO, T.; TUSNEEM, N.; ROBINSON, R.; FELDHAUS, J.; MACALMA, T.; OLIPHANT, A.; BRIGGS, S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, p. 92-100, 2002.
- JACKSON, S. A.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; SCHMUTZ, J. AND GRIMWOOD, J. TOWARD a Reference Sequencing of the Soybean Genome: a Multiagency Effort. **Crop Science**, v. 46, p. S55-S61, 2006.
- LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods of Information in Medicine**, v. 40, p. 346-358, 2001.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v. 124, p. 743-756. 1990.
- MARTIN, M.; RECKNOR, J. M.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R.; BAUM, T. J.; WHITAM, S. A. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 20, p. 887-899, 2007.
- MESSING, J.; DOONER, H. K. Organization and variability of the maize genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 157-163, 2006.
- PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, E. **Avaliação da pureza genética em sementes de milho utilizando marcadores microssatélites**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 65 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 30).
- PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N.; JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F.; NHANI, J. R. A.; WUST, C. I.; CAMARGO FILHO, F.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRESKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. S.; FLATSCHART, A. V. F. Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 12-25, 2003.
- REITER, R. S.; WILLIAMS, J.; FELMAN, K. A.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V.; SKOLNICK, P. A. Global and local genome mapping in Arabidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplification polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 89, p. 1477-1481, 1992.
- 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.
- 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**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.
- YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LIN, W.; YE, C.; TONG, W.; CONG, L.; GENG, J.; HAN, Y.; LI, L.; LI, W.; HU, G.; HUANG, X.; LI, W.; LI, J.; LIU, Z.; LI, L.; LIU, J.; QI, Q.; LIU, J.; LI, L.; LI, T.; WANG, X.; LU, H.; WU, T.; ZHU, M.; NI, P.; HAN, H.; DONG, W.; REN, X.; FENG, X.; CUI, P.; LI, X.; WANG, H.; XU, X.; ZHAI, W.; XU, Z.; ZHANG, J.; HE, S.; ZHANG, J.; XU, J.; ZHANG, K.; ZHENG, X.; DONG, J.; ZENG, W.; TAO, L.; YE, J.; TAN, J.; REN, X.; CHEN, X.; HE, J.; LIU, D.; TIAN, W.; TIAN, C.; XIA, H.; BAO, Q.; LI, G.; GAO, H.; CAO, T.; WANG, J.; ZHAO, W.; LI, P.; CHEN, W.; WANG, X.; ZHANG, Y.; HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; LI, Z.; MAO, L.; ZHOU, C.; ZHU, Z.; CHEN, R.; HAO, B.; ZHENG, W.; CHEN, S.; GUO, W.; LI, G.; LIU, S.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L.; YUAN, L.; YANG, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, v. 296, p. 79-92, 2002.

Patrocínio:



Soluções que valorizam a vida



**Circular  
Técnica, 47**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Soja**  
Cx. Postal 231  
86001-970 - Londrina, PR  
Fone: (43) 3371-6000 - Fax: 3371-6100  
Home page: <http://www.cnpso.embrapa.br>  
e-mail: [sac@cnpso.embrapa.br](mailto:sac@cnpso.embrapa.br)

1ª edição  
1ª impressão (2007): tiragem 500 exemplares

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

Governo  
Federal

**Comitê  
de Publicações**

**Presidente:** Manoel Carlos Bassoi  
**Secretário Executivo:** Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite  
**Membros:** Antonio Ricardo Panizzi, Claudine Dinali Santos Seixas, Francismar Corrêa Marcelino, Ivan Carlos Corso, José Miguel Silveira, Maria Cristina Neves de Oliveira, Rafael Moreira Soares, Ricardo Vilela Abdelnoor

**Expediente**

**Supervisão editorial:** Odilon Ferreira Saraiva  
**Normalização bibliográfica:** Ademir Benedito Alves de Lima  
**Editoração eletrônica:** Danilo Estevão