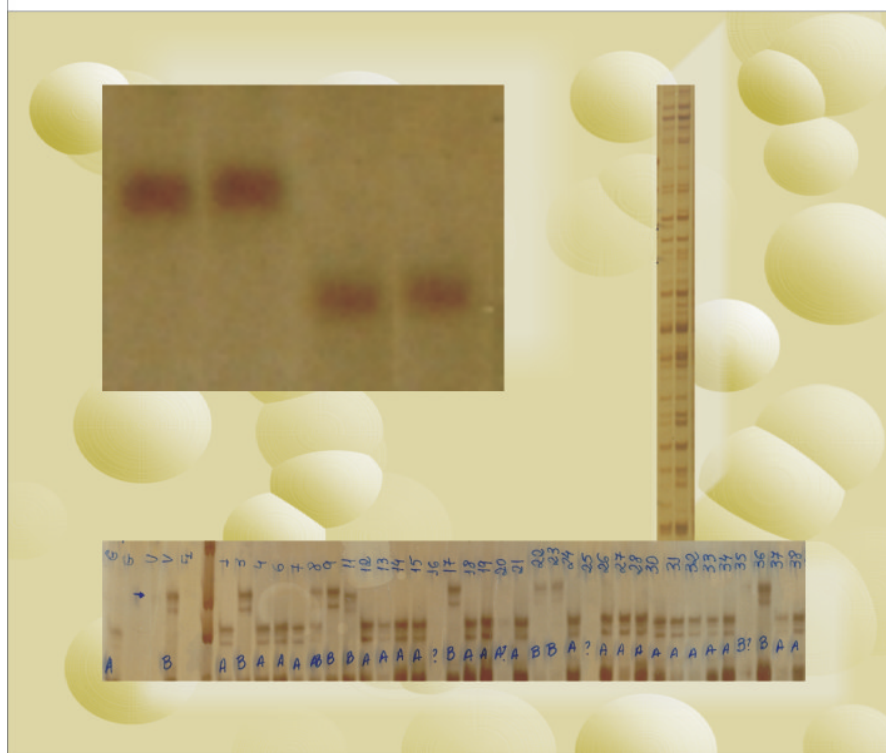


**Marcadores Moleculares
como Ferramentas para
Estudos de Genética de
Plantas**



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Luís Carlos Guedes Pinto
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

José Renato Cortez Bezerra
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0205
Agosto, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 147

Marcadores Moleculares como Ferramentas para
Estudos de Genética de Plantas

Lúcia Vieira Hoffmann
Paulo Augusto Vianna Barroso

Campina Grande, PB.
2006

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

Luiz Paulo de Carvalho

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Nair Helena Arriel de Castro

Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Lúcia Vieira Hoffmann

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2006) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas, por Lúcia Vieira Hoffmann e Paulo Augusto Vianna Barroso. Campina Grande, 2006

35p. (Embrapa Algodão. Documentos, 147)

1. Plantas-Estudos-Genética. 2. Marcadores Moleculares. I. Hoffmann, L.V.
II. Barroso, P.A.V. III. Título. IV. Série.

CDD575.1

© Embrapa 2006

Autores

Lúcia Vieira Hoffmann

D.Sc., Engº Agrôn., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720, Campina Grande, PB, CEP 58107-720. e-mail: hoff@cnpa.embrapa.br,

Paulo Augusto Vianna Barroso

D.Sc., Engº Agrôn., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720, Campina Grande, PB, CEP 58107-720. e-mail: pbarroso@cnpa.embrapa.br

Apresentação

Marcadores moleculares são uma importante ferramenta de biotecnologia com ampla aplicação na agricultura. São grandes “parceiros” da genética clássica, pois se o desenvolvimento de conhecimento e suas aplicações na agricultura antes eram dificultados por um número relativamente pequeno de marcas genéticas que podiam ser utilizadas, com os marcadores moleculares um número tremendamente maior de características genéticas pode ser utilizado; entretanto, seu potencial só pode ser entendido como ferramenta da genética clássica, uma ciência que, mesmo que analisada somente por suas aplicações agrícolas mais importantes, não é de fácil entendimento, pela quantidade de conceitos que envolve. Este documento visa introduzir estudantes aos princípios básicos da biologia molecular mais utilizados para obtenção de marcadores moleculares, bem como ilustrar algumas implicações genéticas de seu uso.

Sumário

Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas	11
1. Introdução	11
2. Enzimas diferem quanto à mobilidade eletroforética	12
3. Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso	14
4. Microssatélites ou Seqüências Simples Repetidas	17
5. Marcadores diferem quanto à habilidade de detectar polimorfismo.	19
6. Dominância e codominância	20
7. Associando uma característica de interesse a um marcador	22
8. Mapas genéticos : um exemplo utilizando marcadores RAPD.....	24
9. Identificação de Genótipos (<i>fingerprinting</i>) e Estimativa da Diversidade Genética Utilizando Marcadores Moleculares	27
10. Algumas populações segregantes facilitam o mapeamento de genes	29
11. Como otimizar a informação fornecida por marcadores dominantes	30
Referências Bibliográficas	33

Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas

Lúcia Vieira Hoffmann
Paulo Augusto Vianna Barroso

1. Introdução

Em 1866, Mendel publicou trabalho científico onde postulou a taxa de segregação de 3:1 de fenótipos dominantes e recessivos (Primeira Lei de Mendel) e de herança independente de diferentes caracteres (Segunda Lei de Mendel). Estas inferências foram feitas a partir da observação de dados fenotípicos, entre eles cor do cotilédone e textura da semente de ervilha (WEIR, 1996).

A identificação do DNA como material genético ocorreu na primeira metade do século XX. Nos anos 70 desenvolveram-se algumas técnicas, uma delas a duplicação do DNA, *in vitro*, realizada pela DNA polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus* que, por viver em fontes térmicas, possui enzima que polimeriza a uma temperatura alta (72°C) e mantém atividade mesmo que submetida a 95°C. Isto é importante para a automação do processo *in vitro*, onde a alta temperatura é utilizada como estratégia para separar as fitas de DNA, necessária para o processo de duplicação. A duplicação do DNA *in vitro* é conhecida por PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*. Muitos procedimentos em biologia molecular baseiam-se em PCR (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta e outras técnicas transformaram o DNA, antes uma molécula de difícil

acesso, em uma molécula de fácil manipulação. Marcadores moleculares surgiram a partir destas técnicas. Eles consistem em fragmentos discretos de DNA obtidos por ferramentas da biotecnologia moderna que, visualizadas em géis de eletroforese, servem como ferramenta para uma série de estudos genéticos em plantas.

O DNA de organismos eucariotos possui tanto seqüências transcritas, regulatórias e ainda outras sem função conhecida. Em qualquer dos casos, sua segregação também obedece as Leis de Mendel.

As diversas aplicações de marcadores moleculares residem em prover instrumentos para os mais diversos estudos já realizados pela genética clássica. A principal aplicação de estudos de genética de plantas é o melhoramento genético, isto é, a seleção artificial de plantas na busca do aprimoramento de suas características agrônomicas ou de qualidade do produto agrícola. Os trabalhos de melhoramento genético vêm acrescentando grandes ganhos no rendimento agrícola. Por proverem um número quase que ilimitado de possíveis alelos, marcadores moleculares ampliam em muito a possibilidade de investigação genômica nas diversas espécies.

As tecnologias para obtenção de marcadores moleculares serão abordadas brevemente, tendo sido já descritas em maior detalhe em uma diversidade de publicações (NÓBREGA et al., 1999; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001). Aqui serão enfatizados aspectos genéticos dos marcadores mais utilizados em genética de plantas. Os procedimentos básicos para obtenção de marcadores serão abordados apenas para alguns marcadores largamente utilizados em genética de plantas, por serem suficientes para discutir os tópicos aqui abordados quanto a características de interesse agrônomico como número de alelos por loco, dominância ou codominância e polimorfismo.

2. Enzimas diferem quanto à mobilidade eletroforética

Entre os marcadores moleculares podem estar as isoenzimas, que não são

DNA, mas sim proteínas visualizadas em gel. Por isso alguns autores as chamam de marcadores bioquímicos.

As enzimas são sintetizadas, como todas as proteínas, a partir de um RNA mensageiro, por sua vez transcrito a partir de uma seqüência de DNA, um gene. Estes genes podem ter diferenças entre si, codificando enzimas que, embora tenham as mesmas funções metabólicas, diferem entre si em algumas propriedades. Estas diferentes formas de uma enzima são chamadas **isoenzimas**. Além de, em um único loco, poderem existir diferentes alelos de um mesmo gene, codificando diferentes isoformas de uma enzima, freqüentemente em único organismo existem vários genes, em vários locos, que codificam a mesma enzima.

Enzimas, como outras proteínas, têm carga elétrica. Quando em solução, podem ligar-se a íons e ânions livres, modificando sua carga, por isso são chamadas de substâncias anfóteras. Então, se colocadas em um campo elétrico, migram conforme seu peso molecular e sua carga elétrica líquida. Como isoenzimas podem diferir quanto a estas características, a eletroforese vem sendo a maneira usual de identificar suas diferentes isoformas. Assim, proteínas totais de um organismo são colocadas em um gel com porosidade suficiente para que se movimentem e, então, são submetidas a um campo elétrico.

Então, para verificar a presença de isoformas de uma enzima específica, após o período de algumas horas de migração no gel, utilizam-se substratos específicos para a enzima, que forneçam produtos coloridos. A presença de cor é utilizada como indicadora da presença da enzima.

Quando as isoformas observadas são produzidas a partir de genes de um mesmo loco podem ser chamadas aloenzimas. Pode-se deduzir se duas ou mais bandas são produzidas a partir de um ou mais locos a partir da observação de géis de uma população segregante. Se a segregação ocorre de maneira independente, como postulado na Segunda Lei de Mendel, infere-se serem produtos de genes de diferentes locos, não ligados. Haverá maior certeza do número de locos se esta população for obtida a partir do cruzamento de pais contrastantes, se o perfil eletroforético dos pais for também observado.

Uma complicação na análise de isoenzimas é a possibilidade serem compostas por duas ou mais subunidades, sendo estas codificadas por alelos de um mesmo loco ou por genes de locos distintos. As enzimas formadas por duas, três ou quatro subunidades são chamadas, respectivamente, diméricas, triméricas e tetraméricas, e não são incomuns. A maneira de proceder as análises, nestes casos, foi descrita por Nóbrega et al. (1999), Alfenas et al. (1991) e Alfenas (1998).

3. Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso é conhecido principalmente através da sigla de seu nome em inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD. Esta técnica baseia-se na duplicação do DNA, *in vitro*, utilizando PCR.

Na reação de PCR para obtenção de marcadores RAPD são necessários, como em qualquer PCR, uma pequena seqüência do DNA complementar ao DNA que se deseja estudar, conhecida como iniciador ou *primer* (ver Figura 1). O *primer* é colocado em um pequeno tubo junto com o DNA em estudo (molde para a duplicação de DNA), a enzima DNA polimerase termoestável, nucleotídeos, uma solução tampão e magnésio. Esta mistura, ou *mix*, é submetida a 20 a 30 ciclos de temperatura de 95 °C, para denaturação do DNA, uma temperatura mais baixa para anelamento dos primers, e 72 °C para atividade da DNA polimerase e extensão das fitas.

Como em qualquer PCR, para que a amplificação ocorra exponencialmente e o fragmento amplificado seja de tamanho constante, são necessários dois sítios de anelamento dos *primers*, que devem anelar em locais que têm entre si uma distância amplificável e cujas extremidades 3' (a direção de duplicação do DNA é sempre 5' em direção a 3') posicionem-se internamente ao fragmento a ser amplificado (ver Figura 1). É necessário que o primer não possua seqüência palindrômica¹, ou a amplificação dar-se-ia, indiferenciadamente, para a região entre os *primers* e externamente a ela.

¹Seqüência palindrômica de DNA é aquela que fornece a mesma leitura quando lida no sentido da posição 3' para a posição 5' ou vice-versa.

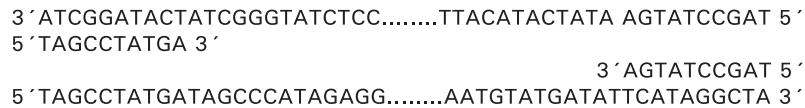


Fig. 1. Os primers RAPD anelam-se nas duas fitas de maneiras opostas, ou seja, com as posições 3' posicionando-se internamente à região a ser amplificada

O que diferencia a reação de PCR para obtenção de marcadores RAPD de outras reações PCR é o tamanho do primer. No RAPD o primer é de 10 bases, tamanho suficientemente pequeno para que uma seqüência aleatória encontre, em qualquer genoma, duas seqüências complementares na posição necessária e haja duplicação do DNA (ver Quadro 1). Isto ocorre normalmente de duas a dez vezes por genoma, resultando em uma a dez bandas no gel. Devido ao menor tamanho do primer, menos pontes de hidrogênio serão formadas entre primer e DNA molde. A temperatura de anelamento deve ser menor (cerca de 35°C) que em PCR utilizando primers específicos (quando seria de 40°C a 60°C).

Procedimentos semelhantes, com primers inespecíficos, foram desenvolvidos simultânea e independentemente por Willians et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990), sendo a denominação RAPD sugerida pelo primeiro grupo.

Também é preciso que primers com 10 bases contenham, pelo menos, 50% de guanina e citosina. Isto se justifica pelo maior número de pontes de hidrogênio responsáveis pela ligação G-C (3 pontes) do que pela ligação A-T (2). Assim, um híbrido primer-DNA com menos de 50% de GC, provavelmente, não permanece anelado com a temperatura de polimerização (72°C), havendo separação antes da DNA polimerase termoestável iniciar a polimerização.

Os segmentos de DNA amplificados através da técnica RAPD são separados em eletroforese de acordo com seu peso molecular, que reflete o número de pares de base (pb), e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Cada produto de amplificação deverá ser visualizado como uma banda, portanto, espera-se encontrar normalmente

Quadro 1: O tamanho do primer em RAPD e o número de fragmentos esperados

O tamanho do primer RAPD, 10 pb, é pequeno, fazendo com que a chance de anelamento seja relativamente alta. No caso de um primer maior, como os usados para amplificação de uma seqüência conhecida, de 18pb a 24 pb, a chance de encontrar uma seqüência complementar é bem menor. Por isso o primer RAPD é inespecífico, e um mesmo primer pode ser utilizado para amplificação de seqüências nos mais diferentes genomas. Enquanto que o primer de 18 pb é específico e amplifica só uma seqüência, geralmente, o primer RAPD amplifica 2 a 10 bandas. A probabilidade de uma seqüência ser complementar a uma seqüência aleatória de 10 pb é de $1 / 4^{10}$, pois, como são 4 as bases que compõem o DNA (A, T, C e G), a probabilidade de a primeira ser, por exemplo, A, e de $1/4$. A probabilidade de a primeira ser A e a segunda G é de $(1/4) \times (1/4)$, e a probabilidade de se encontrar 10 determinadas bases em seqüência é de $1 / 4^{10}$.

Porém, para que a amplificação de marcadores RAPD ocorra de maneira exponencial e simultaneamente, o fragmento amplificado seja de tamanho constante, são necessários dois sítios de anelamento dos primers, distando entre si uma distância amplificável, ou seja, entre 500 e 2500 pb. Ou seja, cerca de 2000 posições de distanciamento entre os primers são aceitáveis. Então, a probabilidade de que isto ocorra é

$$p = 2000 \times 1 / 4^{20} = 1,819 \cdot 10^{-9}$$

No genoma da principal espécie cultivada de algodão, *Gossypium hirsutum*, de tamanho estimado em $2,38 \times 10^9$ pb, o número n esperado de fragmentos RAPD, com base na probabilidade p calculada, seria

$$n = 2,38 \times 10^9 \cdot p = 1,3$$

No entanto, verifica-se um número maior de bandas. Iqbal et al. (1997) encontraram cerca de 7 bandas por primer. Isto provavelmente ocorra devido a amplificações a partir de seqüências não totalmente complementares, ou seja, a complementariedade entre nove ou oito pares de bases seja suficiente para que ocorra anelamento e duplicação de DNA. O número de bandas maior do que o esperado é verdadeiro para a maioria das espécies estudadas. O pareamento de primers não totalmente complementares deve ser maior quanto menor o tamanho do genoma, pois nas mais diversas estudadas, mesmo o tamanho dos genomas sendo muito variável, o número de bandas permanece praticamente constante (Ferreira e Gattapaglia, 1998).

de 2 a 10 bandas. O polimorfismo entre dois indivíduos é verificado pela comparação do perfil eletroforético dos produtos de amplificação obtidos pela utilização dos mesmos primers e condições de reação.

Como na maioria dos marcadores moleculares, as informações fornecidas por um único marcador RAPD são baixas, sendo necessário analisar diversos primers para que se obtenha resultados úteis. Os dados obtidos a partir de um conjunto de primers podem ser ampliados com a utilização dos primers isoladamente e em pares. Quando usados em pares, o padrão de amplificação apresenta novos produtos, enquanto alguns formados pela utilização isolada dos primers não são detectados (WILLIAMS et al., 1993).

Os marcadores RAPD apresentam algumas vantagens em relação a outros marcadores: um mesmo conjunto de *primers* pode ser usado em qualquer espécie; permite analisar um maior número de amostras por unidade de tempo; o investimento na instalação do laboratório e o custo por amostra são menores; os procedimentos são simples e não incluem radioisótopos; permite a automação do processo. A principal limitação do uso de RAPDs é sua dominância, que ficará melhor compreendida após a leitura do item 6.

4. Microsatélites ou Seqüências Simples Repetidas

Microsatélites ou Seqüências Simples Repetidas (SSR, do inglês, Simple Sequence Repeats) ou são partes constituintes de DNAs de eucariotos formado de seqüências de um a cinco nucleotídeos que se repetem. Essas seqüências repetitivas são flanqueadas por seqüências únicas. Para que os microsatélites sejam utilizados em biotecnologia como marcadores moleculares, *primers* complementares às seqüências únicas que flanqueiam os microsatélites são utilizados em PCRs. Neste caso, os primers constituem-se de 18 a 24 nucleotídeos, em número suficientemente grande para que este primer não encontre outra seqüência complementar que não a do microsatélite.

A maior dificuldade de se utilizar SSR é justamente de se obter as

seqüências a serem utilizadas como primers. Para obtê-las, é necessário fazer bibliotecas genômicas e selecionar clones, utilizando-se como sondas seqüências repetitivas. Uma vez selecionados estes clones são seqüenciados. Nem todos os microssatélites localizados poderão ser utilizados para rotina como marcadores moleculares. Deseja-se que o produto de amplificação não seja maior que 200pb para que os alelos sejam efetivamente separados, não deve haver no primer seqüências repetitivas para evitar anelamento inespecífico e deve haver um conteúdo mínimo de 40% C + G (REDDY et al., 2001). Deve-se ainda observar entre os possíveis *primers*, utilizando-se programas computacionais, os seguintes itens: *i)* presença de grampos (anelamento do *primer* com ele mesmo, quando dobrado) e dímeros (anelamento de dois *primer*). Estas estruturas devem estar ausentes ou, se presentes, ter baixa estabilidade. *ii)* temperatura de anelamento: será tanto maior quanto menor a porcentagem de A + T em relação a T + G. Um destes programas pode ser encontrado em www.generunner.com.

Em mamíferos, incluindo o genoma humano, os marcadores microssatélites são os mais utilizados, porém em plantas parecem ser menos abundantes, pois são encontrados a cada 29 ou 80 kb, enquanto que no genoma humano existe em média uma seqüência SSR a cada 6 kb. Além disso, enquanto que em mamíferos sabe-se que as seqüências mais freqüentes são dinucleotídeos CA e TG, facilitando sua localização, em plantas há uma variabilidade de tipos de detecções. Assim, há menor quantidade de primers de SSR em plantas, dificultando seu uso (CARDLE et al., 2000).

Os segmentos de DNA amplificados são separados em eletroforese em géis de acrilamida ou agarose de alta resolução, que fornecem melhor distinção entre fragmentos que diferem pouco entre si quanto ao peso molecular. Quando em géis de acrilamida, a coloração do DNA para visualização de bandas é feita com prata.

As vantagens da utilização de microssatélites em relação a outros marcadores moleculares são a fácil exeqüibilidade, uma vez disponíveis *primers* para a espécie em estudo, o alto polimorfismo e a boa distribuição no genoma.

5. Marcadores diferem quanto à habilidade de detectar polimorfismo

Se existe diversidade genética em uma população, ela deve ser detectada pelo marcador molecular. Porém, esta “habilidade” pode ser maior ou menor, dependendo das bases genéticas deste marcador. Existe a tendência de que genes sejam mais conservados do que as regiões de DNA sem função, como seqüências repetitivas, já que dependendo da alteração no DNA do gene, a proteína ou não seria codificada ou não teria função, tendendo a não serem selecionadas. Com efeito, verifica-se que marcadores microssatélites, que detectam regiões não codificadoras, são muito mais polimórficos que isoenzimas. O RAPD, que amplifica igualmente locos de regiões repetitivas como genes, tem polimorfismo estimado maior do que o marcador baseado no Polimorfismo no Fragmento de Fragmentos de Restrição, mais conhecido como RFLP, do inglês, Restriction Fragment Length Polimorphism (GARCIA et al., 1995), e é especialmente adequado na análise de indivíduos com baixa divergência genética (WILLIANS et al., 1993).

O conteúdo de informação de polimorfismo, conhecido pela sigla PIC, de seu nome em inglês, *Polymorphism Information Content*, pode ser estimado por

$$Pic = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

onde f_i é a freqüência do i ésimo alelo. Calculado assim, o valor de PIC reflete tanto o número de alelos como a freqüência de cada alelo, e será maior quanto maior for o número de alelos e quanto mais equivalentes as freqüências alélicas. Assim, com dois alelos, o valor de PIC será máximo quando a freqüência de cada um deles for 0,5. Com este cálculo, PIC torna-se sinônimo de heterozigosidade (ROBINSON, 1998) e diversidade genética (SENIOR et al., 1998).

Tanto na seleção assistida como no mapeamento genético (ver adiante) a investigação é feita com base na segregação de marcadores. Só se observa segregação se houver polimorfismo. Logo, o fato de um marcador ser altamente polimórfico é considerado vantajoso.

6. Dominância e codominância

Por terem diferentes bases genéticas os marcadores moleculares diferem quanto ao tipo de segregação esperada em F2. Se imaginarmos uma enzima codificada em um único loco com dois alelos, sabemos que os homozigotos para cada loco, como codificam uma só isoforma, apresentarão uma só banda, enquanto que os heterozigotos apresentarão duas bandas (contanto, é claro, que as isoformas possam ser distintas entre si na eletroforese). Portanto, marcadores isoenzimáticos são considerados codominantes. O cruzamento de dois homozigotos contrastantes entre si, resultaria em F2 numa segregação do tipo 1:2:1, como o esperado no caso de codominância gênica. Isto pode ser testado através de um teste qui-quadrado.

No caso de marcadores RAPD, como comentado no ítem 3, uma banda reflete a amplificação de um segmento entre dois sítios de anelamento do primer. Algumas diferenças genéticas entre indivíduos serão detectadas por marcadores RAPD. Para explicar quais são elas, vamos imaginar que temos um genótipo, chamado "selvagem", que produz uma banda, e um genótipo alterado em relação a este, chamado "mutante". O genótipo "mutante" poderá ser diferenciado do "selvagem" pelo RAPD quando contiver:

- (a) Substituição de uma ou mais bases no sítio de anelamento.
- (b) Deleção de um segmento contendo 1 ou 2 sítios de anelamento do primer
- (c) Inserção de um segmento grande de DNA entre os 2 sítios de anelamento, conduzindo a um fragmento muito grande para ser amplificado;

(d) Inserção ou deleção de um pequeno segmento de DNA entre os sítios de anelamento do primer.

Nos casos (a), (b) e (c), existe **presença de banda** no genótipo “selvagem”, seja ele homocigoto ou heterocigoto para a presença dos dois sítios de anelamento. Indivíduos homocigotos para o alelo “mutante” apresentarão **ausência de banda**. Nestas situações, em F₂, ocorrerá segregação do tipo 3:1 para presença/ausência de bandas e o marcador RAPD será **dominante**.

No caso (d) o genótipo “mutante” também apresentará uma banda, resultado da amplificação de um segmento, de maior ou menor mobilidade eletroforética do que banda do fenótipo “selvagem”, decorrentes, respectivamente, da deleção e da inserção de um fragmento. Indivíduos heterocigotos apresentarão duas bandas. Nesta situação apenas, o marcador RAPD é considerado codominante.

Quase na totalidade dos casos, os marcadores RAPD são dominantes, impossibilitando a detecção de indivíduos heterocigóticos. A dominância pode restringir a possibilidade de sua utilização em análises genéticas onde seja importante diferenciar homocigotos de heterocigotos. Isto será particularmente importante em populações de plantas alógamas, onde a porcentagem de locos em heterocigose é alta. Nos casos onde os indivíduos avaliados são todos homocigotos, a segregação dominante dos RAPD não representa limitação, como em seleções dentro de variedades compostas por uma mistura de linhas puras ou populações locais onde os indivíduos embora heterogêneos entre si, são homocigotos. Em estudos envolvendo diversidade ou distância genética em plantas autógamas, como as plantas a serem analisadas para a identificação e determinação da diversidade são homocigotas, a segregação dominante dos marcadores RAPD não produz menos informações do que os marcadores codominantes. Assim, as características de menor custo, maior rapidez e melhor exploração da variabilidade molecular existente, fazem a técnica RAPD ser especialmente recomendada.

É possível ampliar a oportunidade de marcadores RAPD comportarem-se

como dominantes pela associação com metodologias que permitam a identificação de pequenas variações na seqüência de bases de duas bandas aparentemente iguais, como o tratamento com enzimas de restrição e a utilização de géis com gradiente de condições desnaturantes (WEISING et al., 1995).

Microssatélites também são considerados codominantes, uma vez que alelos diferentes podem ser observados como bandas distintas e, conseqüentemente, a segregação observada é do tipo 1:2:1. Os marcadores microssatélites podem eventualmente comportar-se como dominantes, no caso de a diferença entre os genótipos que segregam residir, não no número de seqüências repetitivas, mas no sítio de anelamento dos primers.

7. Associando uma característica de interesse a um marcador

Uma das dificuldades encontradas no melhoramento genético é o fato do ambiente interferir na expressão genotípica. Um exemplo onde o ambiente interfere drasticamente é o caso de resistência a doenças. A doença pode não ocorrer por inexistência de inóculo ou condições climáticas favoráveis para seu desenvolvimento, de forma que não existe incidência ou severidade da doença o suficiente para que se diferenciem plantas suscetíveis de plantas resistentes. Assim, seria altamente desejável que a seleção pudesse ser feita para a presença do gene em si, ao invés de se fazer seleção para o fenótipo, e isto seria facilmente executável no caso de se ter certeza do efeito de determinado gene num fenótipo buscado pelo melhoramento. No entanto, atualmente o conhecimento genômico da grande maioria das espécies de plantas é tal que raras são as características de interesse agrônomo para as quais a seqüência gênica é conhecida. Então, existe a alternativa de identificar marcas gênicas ligadas ao gene de interesse, que co-segreguem com ele.

Para encontrar marcadores para uma característica, é necessário observar

uma população segregante, tanto para a característica de interesse como para o marcador. Normalmente, essa população é obtida a partir do cruzamento de dois genótipos contrastantes para a característica. Na população segregante observa-se cada indivíduo tanto para a característica de interesse (por exemplo, resistência ou suscetibilidade a uma doença) como para uma série de marcadores moleculares. A seguir, faz-se um teste para verificar ligação de cada marcador com o gene de interesse (Figura 2).

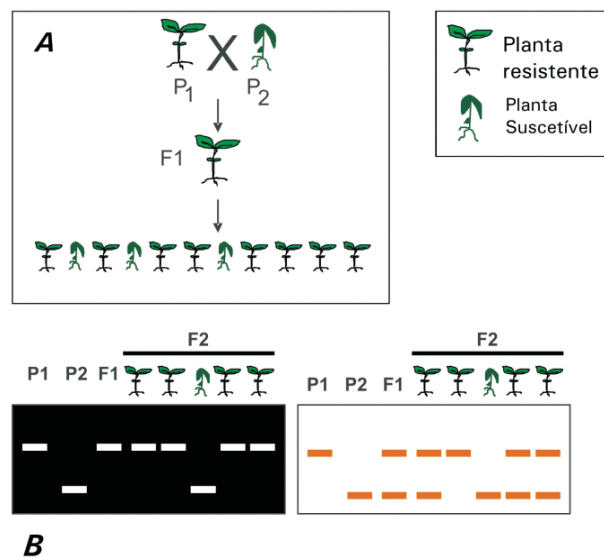


Fig. 2. A) A identificação de um marcador ligado a uma característica agrônômica de interesse, por exemplo resistência de plantas a doenças, é feita em uma população que segregue tanto para a característica de interesse como para o marcador. Normalmente, a população segregante é uma população F2 obtida pelo cruzamento de pais contrastantes (P1 x P2). Neste exemplo, a resistência à doença é dominante sobre suscetibilidade, pois plantas F1 são resistentes e predominam em F2. Observando cada indivíduo F2 simultaneamente para uma característica de interesse e uma série de marcadores, espera-se encontrar pelo menos um marcador ligado. B) Marcador dominante ligado in cis ao gene de interesse, pois quase sempre está presente quando a característica agrônômica de interesse está presente. Um marcador dominante ligado in trans estaria quase sempre ausente quando a característica de interesse estivesse presente. C) Marcador codominante ligado à característica de interesse: plantas resistentes à doença contêm o marcador ligado in cis à resistência (no exemplo, a banda de menor mobilidade eletroforética, pois ela está presente no parental resistente) em homozigose ou em heterozigose.

Como é necessário encontrar um marcador ligado à característica de interesse, é desejável que os marcadores tenham boa distribuição no genoma. RAPD e microssatélites têm melhor distribuição no genoma que isoenzimas, mas quaisquer destes são muito mais freqüentes e dispersos do que os marcadores morfológicos.

Marcadores ligados ao gene de interesse podem servir para seleção indireta de indivíduos no melhoramento de plantas. Este processo chama-se seleção assistida por marcadores.

A seleção assistida é particularmente importante quando realizada para caracteres que se expressam em estágios de desenvolvimento avançado, como características de frutos e sementes, quando o padrão de herança é recessivo ou quando há necessidade de operações especiais para que o gene se expresse, como para resistência à pragas e doenças. Em doenças, a seleção assistida evita erros devido a métodos de inoculação inadequados ou ineficientes e possibilita selecionar plantas resistentes a patógenos não existentes na região onde se realiza o programa de melhoramento, ou onde a inoculação artificial representa riscos às lavouras comerciais.

8. Mapas genéticos : um exemplo utilizando marcadores RAPD

Construir um mapa genético envolve: *i*) encontrar grupos de genes e marcadores ligados, constituindo grupos de ligação *ii*) medir a distância genética entre estes genes e marcadores, dada pela porcentagem de gametas recombinantes.

Um mapa genético pode auxiliar na localização de genes ainda não mapeados, já que fornece a distribuição genômica dos marcadores. Isto é importante particularmente quando se deseja mapear características controladas por vários genes, também chamadas características quantitativas. Os locos mapeados recebem o nome de locos de características quantitativas, mais conhecidos pela sigla do nome em inglês, QTL (Quantitative Trait Loci).

Quando a espécie já possui um mapa genético molecular, procura-se determinar a posição do marcador associado ao gene de interesse, através da associação a marcadores já presentes no mapa.

Um trabalho preliminar à produção do mapa é a escolha dos progenitores a serem utilizados. Os progenitores devem ser o mais divergentes possível para possibilitar a análise de um grande número de marcadores segregantes na população. Em muitos casos, para explorar ao máximo a divergência, o mapa é obtido a partir de um cruzamento entre uma espécie cultivada e uma espécie selvagem, sendo, portanto, um mapa interespecífico.

A dominância de um marcador, impossibilitando a detecção de indivíduos heterozigóticos, não é uma limitação para a construção de mapas em populações recombinantes homozigóticos, como linhagens endogâmicas recombinantes ou de duplos haplóides. Tampouco limita para populações de retrocruzamento.

Na construção de mapas moleculares para populações F_2 ou F_3 , considerando dois marcadores (locos A e B) a dominância dos marcadores RAPD permite a detecção de apenas 4 classes fenotípicas havendo 10 genótipos possíveis (Tabela 1)

Contudo, a estimativa da distância entre marcadores pode ser realizada sem a necessidade de teste de progênie, caso se considere que todos os

Tabela 1. Genótipos existentes dentro das classes fenotípicas detectadas em uma população F_2 , considerando 2 genes (A e B) ligados e supondo a existência de equilíbrio entre os alelos.

Fenótipo	Genótipo
I	AB/AB; AB/ab; AB/aB*; Ab/AB*; Ab/aB**
II	Ab/Ab**; Ab/ab*
III	aB/aB**; aB/ab*
IV	ab/ab

Notas: * indivíduos formados por apenas 1 gameta recombinante;
 ** indivíduos formados por 2 gametas recombinantes.

gametas são igualmente viáveis dentro da população. Se uma combinação gênica resultar em viabilidade diferencial dos gametas, os resultados obtidos podem conter erros grosseiros.

Um exemplo hipotético de construção de mapas a partir de F_2 é dado a seguir. Considere que a população foi obtida do cruzamento $AB/AB \times ab/ab$, e que a análise por RAPD forneceu os resultados apresentados na Figura 3:

Verifica-se na Figura 3 a existência de ligação entre os marcadores A e B, evidenciada pela segregação em F_2 . Supondo igual viabilidade gamética, os genótipos que compõem cada classe fenotípica são os apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que, com exceção da IV, as classes são compostas por mais de um genótipo, sendo as II e III compostas unicamente por recombinantes e a I por recombinantes e não recombinantes.

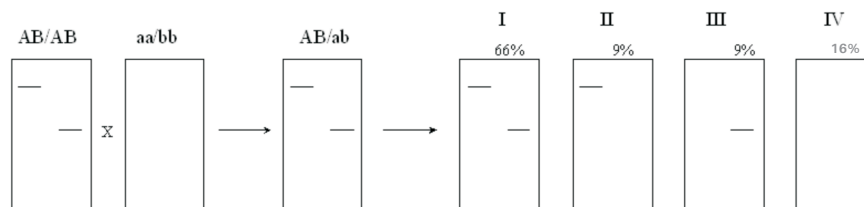


Fig. 3. Análise do cruzamento entre AB/AB e ab/ab , sendo A e B produtos de amplificação RAPD, e a proporção de cada fenótipo RAPD verificado em F_2 . Os genótipos que compõem as classes fenotípicas I, II, III e IV podem ser observados no quadro 4.

Caso se considere 'x' a frequência de cada gameta recombinante e $(0,5-x)$ a frequência de cada gameta parental, a proporção de cada genótipo é dada na Tabela 2.

Observa-se que o genótipo ab/ab tem proporção esperada $(x^2-x + 0,25)$. Como a classe IV é composta exclusivamente por indivíduos ab/ab , é possível estimar a frequência de cada gameta recombinante (x):

Tabela 2. Proporções esperadas de cada genótipo em uma população F_2 , obtida do cruzamento entre AB/AB e ab/ab, considerando que os genes A e B estão ligados e que se recombinam a uma frequência igual a $2x$.

	AB (0,5-x)	Ab (x)	aB (x)	ab (0,5-x)
AB (0,5-x)	$(x^2-x+0,25)$	$(0,5x-x^2)$	$(0,5x-x^2)$	$(x^2-x+0,25)$
Ab (x)	$(0,5x-x^2)$	(x^2)	(x^2)	$(0,5x-x^2)$
aB (x)	$(0,5x-x^2)$	(x^2)	(x^2)	$(0,5x-x^2)$
ab (0,5-x)	$(x^2-x+0,25)$	$(0,5x-x^2)$	$(0,5x-x^2)$	$(x^2-x+0,25)$

$$x^2-x+0,25=0,16$$

$$x^2-x+0,09=0$$

$$x=0,10$$

A distancia genética entre os locos é dada em unidades de recombinação e é igual, em número, à porcentagem de gametas recombinantes formados em F_1 . Conforme ilustrado na Tabela 2, em F_1 são formados dois tipos de gametas recombinantes, em iguais proporções, x Ab e x aB. Portanto, a porcentagem de gametas recombinantes será $2x$, que é igual 20%. Como, a rigor, a correspondência entre porcentagem de recombinantes e distância de recombinação não é exata, pode-se utilizar ferramentas, como a curva de Haldane (STAUB et al., 1996). Tem-se que a distância entre os 2 marcadores é de 20 unidades de recombinação.

9. Identificação de Genótipos (*fingerprinting*) e Estimativa da Diversidade Genética Utilizando Marcadores Moleculares

As características genéticas de populações ou cultivares podem ser mensuradas por caracteres morfológicos. Porém, marcadores moleculares podem ampliar em muito o poder de detecção de diferenças entre e dentro de populações, particularmente se forem altamente polimórficos.

Os marcadores moleculares permitem obter um padrão de polimorfismo único na comparação de diferentes genótipos. Através da identificação molecular de genótipos é possível realizar trabalhos de caracterização de variedades e cultivares, realizar controle de pureza de sementes, verificar a taxa de fecundação cruzada existente, detectar variação somaclonal em cultura de tecidos, constatar a obtenção de híbridos somáticos e reduzir o número de gerações de retrocruzamento necessárias para a recuperação do progenitor recorrente.

Uma vez estabelecida a identificação molecular de um conjunto de genótipos, é possível avaliar a diversidade genética entre eles. Caso os genótipos avaliados sejam escolhidos por uma razão qualquer, a diversidade verificada representa, unicamente, a existente entre estes materiais. A diversidade estimada pode representar a existente dentro e entre populações diferentes, se cada população estiver representada por uma amostra de indivíduos.

Em programas de melhoramento pode-se querer maximizar a divergência genética em uma população. A escolha de pais divergentes é muito importante quando se deseja iniciar um programa por hibridação, pois permite a ocorrência de um maior número de recombinações nas populações segregantes. Então, marcadores moleculares são usados para medir a distância genética entre os pais, optando-se pelos cruzamentos onde os pais são mais distantes entre si. Em contrapartida, progenitores menos divergentes podem facilitar a recuperação do progenitor recorrente em programas de retrocruzamento (ABDELNOOR, 1994).

Estimativas da diversidade podem ser obtidas por métodos que verifiquem a similaridade ou a distância existente. Diversos coeficientes podem ser empregados, entre os quais se destacam: Jaccard, Coincidência Simples (simple matching), cuja metodologia de cálculo foi bem descrita por Fungaro & Vieira (1998) e a distância média euclidiana e a distância generalizada Mahalanobis (CRUZ e REGAZZI, 1997). Os resultados são agrupados em uma matriz, utilizada na construção de dendogramas através de técnicas de agrupamento (CRUZ e REGAZZI, 1997), como o método das médias das

distâncias ou UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages”) (FUNGARO e VIEIRA, 1998). Os resultados obtidos pelos diferentes coeficientes podem diferir entre si.

10. Algumas populações segregantes facilitam o mapeamento de genes

Para a obtenção de marcadores associados a genes é necessário analisar genótipos contrastantes. As populações segregantes mais freqüentemente utilizadas são as linhagens quase isogênicas, em inglês ‘Near isogenic lines’ (NIL), e plantas F_2 em um procedimento conhecido como ‘Bulked Segregant Analysis’ (BSA).

As linhagens quase isogênicas são linhagens que apresentam a mesma constituição genética, diferindo apenas em um caráter. Elas são obtidas através da hibridação entre duas linhagens contrastantes, seguida de diversos ciclos de retrocruzamento, fazendo-se seleção para o caráter que se deseja estudar.

Um procedimento alternativo para a obtenção de NIL’s foi desenvolvido por Haley et al. (1994b), que ao invés de retrocruzamentos, utiliza um processo que vincula o desenvolvimento de NIL’s aos métodos convencionais de desenvolvimento de cultivares e linhagens em plantas autógamas. Neste procedimento, os processos de melhoramento são conduzidos normalmente através de pedigree, pedigree modificado, *bulk* ou combinações destes métodos. Através de NIL’s obtidas por este procedimento, os autores encontraram um marcador RAPD intimamente ligado ($2,23 \pm 1,33\text{cM}$) ao gene Ur-3, um gene maior que confere resistência a algumas raças de *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro.

BSA foi desenvolvido por Michelmore et al. (1991). Consiste em dividir uma população F_2 em duas subpopulações de acordo com a expressão da característica de interesse. De cada subpopulação é retirada uma amostra de 10 a 15 indivíduos homocigotos, determinados através do teste de progênie. Para cada amostra, o DNA das plantas é extraído e misturado,

formando um pool. Os dois *pools* obtidos, um de cada amostra, são submetidos à amplificação. Como as regiões do genoma não associadas à característica devem estar igualmente representadas nos pools, espera-se que o polimorfismo observado entre os pools esteja ligado à característica em estudo.

Uma variação do BSA foi desenvolvida por Choi e Skorupska (1995) que, ao invés de utilizar uma população F_2 para formar pools contrastantes, utiliza uma mistura de diferentes cultivares com resposta comum a determinado caráter para compor cada pool. Empregando esta estratégia eles conseguiram observar polimorfismo RAPD entre pools de soja contrastantes para resistência ao nematóide do cisto. Porém, os autores não verificaram se os produtos de amplificação polimórficos estavam ligados à resistência.

A escolha do tipo de material vegetal a ser empregado nos estudos, se NIL's derivados de retrocruzamento, NIL's derivadas de um processo de seleção, BSA ou combinações destes processos, depende das condições e facilidades locais.

11. Como otimizar a informação fornecida por marcadores dominantes

A dominância dos marcadores RAPD pode ser contornada pela utilização de dois marcadores em fases de ligação diferente, um *in cis*, isto é, localizado no mesmo cromossomo que contem o gene de interesse, e outro *in trans*, isto é, localizado no cromossomo homólogo, que não contem o gene de interesse (WILLIANS et al., 1990, (Figura 4). Os homozigotos para o gene de interesse possuem apenas a banda do marcador *in cis*, e os indivíduos heterozigotos possuem as 2 bandas, uma correspondente ao marcador *in cis* e uma correspondente ao marcador *in trans*. A eficácia com que heterozigotos podem ser identificados depende da distância entre o par de marcadores, sendo tanto maior quanto menor for a distância.

Para realizar seleção assistida em populações de retrocruzamento, que são

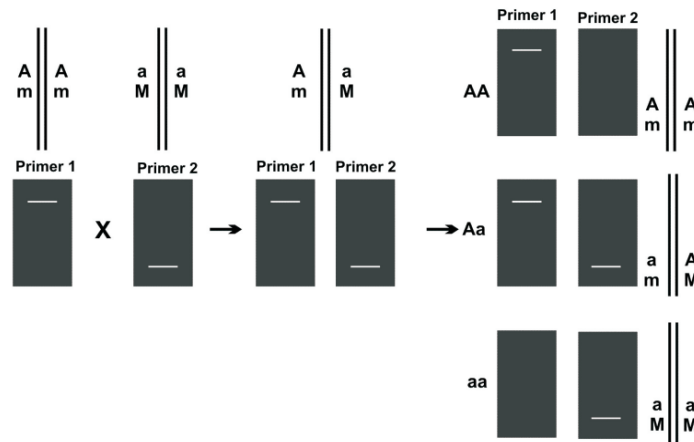


Fig. 4. Identificação de heterozigotos utilizando dois marcadores RAPD, um *in cis* outro *in trans*.

sempre heterozigotas para os genes de interesse, marcadores ligados *in cis* podem servir para selecionar os genótipos heterozigóticos, que são aqueles que contêm o gene de interesse. Marcadores dominantes *in trans* não têm o poder de identificar genótipos que contêm o gene de interesse em populações de retrocruzamento, pois amplificariam bandas tanto nos heterozigotos como nos homozigotos (Tabela 3).

Em populações F_2 , marcadores *in trans* são os mais informativos. Como pode ser observado na Tabela 4, os marcadores ligados a genes dominantes

Tabela 3. Em populações de retrocruzamento marcadores ligados *in cis* selecionam os genótipos heterozigóticos. Os marcadores *in trans* não podem ser utilizados em seleção assistida, pois o produto de amplificação estaria presente nos dois genótipos formados.

Resistência	Genótipo	Fenótipo	Ligação	
			<i>cis</i>	<i>trans</i>
dominante	Rr	resistente	+	-
	rr	susceptív.	-	-
recessiva	RR	susceptív.	-	-
	Rr	susceptív.	+	-

+ plantas selecionadas

- plantas descartadas

Tabela 4. Discriminação entre genótipos de uma população F_2 através de seleção assistida por marcadores RAPD ligados a um gene de resistência à doença, segundo a forma de ligação. No caso de o gene de interesse ser dominante, os marcadores *in trans* selecionam apenas indivíduos homocigotos para a característica, enquanto a seleção através de marcadores *in cis* resulta na seleção de indivíduos homo e heterocigotos.

Genótipo	%	Resistência dominante			Resistência recessiva		
		Fenótipo	<i>cis</i>	<i>trans</i>	Fenótipo	<i>cis</i>	<i>trans</i>
RR	25	resist.	+	+	suscep.	-	-
Rr	50	resist.	+	-	suscep.	+	-
rr	25	suscep.	-	-	resist.	+	+

+ plantas selecionadas - plantas descartadas

in trans selecionam apenas indivíduos homocigotos para a característica, enquanto a seleção através de marcadores *in cis* resulta na seleção de indivíduos homo e heterocigotos, sendo portanto menos eficiente. Como se pode observar na Figura 5, marcadores *in trans* localizados a 20cM do gene permite mais de 50% dos indivíduos selecionados sejam homocigóticos para a característica de interesse. Já marcadores

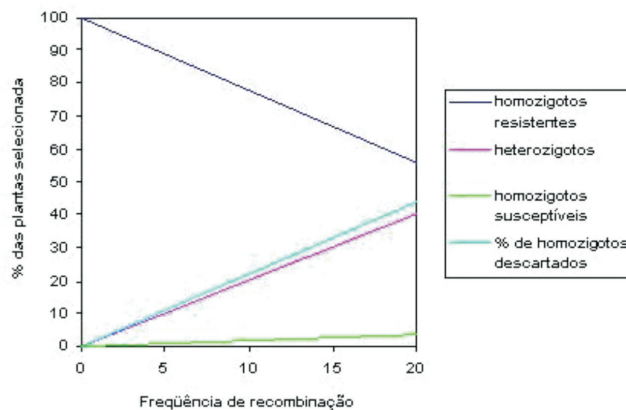


Fig. 5. Composição teórica da porcentagem de indivíduos de uma população F_2 selecionados através de um marcador RAPD. A marcadores *in trans* localizados a 20cM do gene permite mais de 50% dos indivíduos selecionados sejam homocigóticos para a característica de interesse. Já marcadores associados *in cis* com ligação absoluta selecionam apenas 33% de homocigóticos (Haley et al., 1994a).

associados *in cis* com ligação absoluta selecionam apenas 33% de homozigóticos (HALEY et al., 1994a).

Conclui-se que a informação obtida de marcadores dominantes depende da forma de ligação do marcador à característica e do tipo de população a ser averiguada.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 241p.

ABDELNOOR, R.V. **Uso de marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1994. 53f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG..

CARDLE, L.; RAMSAY, L.; MILBOURNE, D.; MACAULAY, M.; MARSHALL, D.; WAUGH, R. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, v. 156, p. 847-54, 2000.

CHOI, I. S.; SKORUPSKA, H. T. RAPD marker selection using DNA bulk of cultivars for differential response in soybean cyst nematode races 3, 5 and 4. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 22, p. 245-250.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Divergência genética. In: _____ **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1997. p. 287-323.

GARCIA, G.M.; STALKER, H.T.; KOCHERT, G. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogea* L.) using RFLP and RAPD markers. **Genome**, v.38, n.1, p.166-176, 1995.

HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K.; KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-chase RAPD markers. **Crop Science**, v.34, p.1061-1066, 1994a.

HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; KELLY, J.D. Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, n.3-4, p.337-342, 1994b.

IOBAL, M. J.; AZIZ, N.; SAEED, N. A.; ZAFAR, Y. MALIK, K. A. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 139-144, 1997.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220p.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. In: Aplicações de PCR em Ecologia Molecular. In.: Melo, I. S.; Azevedo, J. L., (Ed). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998. Cap. 8, p. 205-227.

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 population. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.

NÓBREGA, M. B. M.; SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; CARVALHO, J. M. F. C. **Princípios e utilização da técnica de eletroforese em géis de amido e poliacrilamida**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999. 103p. (Documentos, 65).

REDDY, O. U.K.; PEPPER, A.E.; ABDURAKHMONOV, I; SAHA, S.; LENKINS, J.N.; BROOKS, T.; BOLEK, Y.; EL-ZIK, M. New dinucleotide and

trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Journal of Cotton Science**, v.5, p.103-113, 2001.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. cap. 7, 329-380.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSR for determining genetic similarities and relationships in maize using the agarose gel system. **Crop Science**, v. 38, p. 1088-1098, 1998.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento –plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. Cap. 29, p. 939-966.

STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v. 31, p. 729-741, 1996.

WEIR, B. **Genetic data analysis**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322p.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n24, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K; HANAFEY, M.K.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v.218, p. 704-740, 1993.

WILLIAMS, J.G.K; KUBELIK, 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**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

