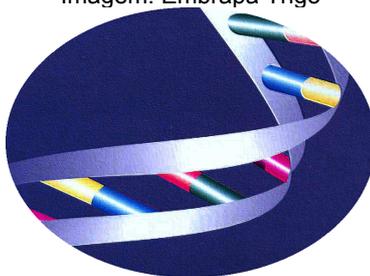


Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal

Imagem: Embrapa Trigo



Sandra Patussi Brammer¹



O melhoramento genético, ao selecionar variedades mais produtivas, de melhor qualidade industrial, mais tolerantes a estresses e com melhor adaptação ecológica, possibilita aumentar os rendimentos agrícolas e até mesmo reduzir o uso de insumos pelo agricultor, o que ajuda a preservar a saúde humana e o meio ambiente. Porém alguns caracteres agrônômicos, especialmente os de herança quantitativa, apresentam dificuldades na seleção fenotípica, tanto na escolha dos pais como na seleção em populações segregantes. A biologia molecular está disponibilizando ferramentas que podem eliminar essas dificuldades.

A era das *Novas Biotecnologias* iniciou na década de 70 com o desenvolvimento de tecnologias como fusão de protoplastos, técnica do DNA recombinante, marcadores bioquímicos, entre outras, que, usando as mais variadas metodologias, visam ao emprego racional dos seres vivos, otimizando-os com finalidades econômicas ou sociais. Atualmente as biotecnologias celulares e moleculares estão sendo rapidamente absorvidas pelos programas de melhoramento varietal.

Marcadores morfológicos variam conforme as condições ambientais, apresentando limitações quanto ao seu uso eficiente. Entretanto, técnicas bioquímicas e moleculares baseadas na análise de polimorfismo de enzimas e de fragmentos de DNA possibilitam a rápida detecção de marcadores moleculares no estudo de aspectos básicos de genética vegetal, bem como em programas de melhoramento genético vegetal, quer para caracteres qualitativos quer quantitativos.

Nos últimos anos têm aumentado a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética, tanto em estudos genéticos como em programas de melhoramento genético.

¹ Pesquisadora da Embrapa Trigo, Caixa Postal 451, 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail: sandra@cnpt.embrapa.br

Os marcadores moleculares são divididos em três grandes grupos: marcadores bioquímicos, marcadores protéicos e marcadores morfológicos, os quais são citados a seguir.

Marcadores bioquímicos – isoenzimas

Marcadores bioquímicos baseados em eletroforese de isoenzimas são úteis em programas de melhoramento, permitindo, a partir de fenótipos isoenzimáticos, a identificação, já na fase de plântula, de genes que conferem resistência a doenças, bem como a caracterização do controle genético desses genes. Tais marcadores foram desenvolvidos nas décadas de 60-70 e tiveram grande aceitação pela comunidade científica, pois permitiram que muitas das dificuldades detectadas pelo uso dos marcadores morfológicos fossem resolvidas.

Por definição, as isoenzimas compreendem diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, com funções metabólicas específicas, e representam um grupo especializado de proteínas, estando presentes em todos os organismos.

Scandalios (1975) já relatava que o uso de isoenzimas como marcadores genéticos havia aumentado significativamente no período de uma década, salientando que as isoenzimas ofereceriam vantagens importantes sobre os marcadores morfológicos convencionais.

O estudo de isoenzimas em plantas tornou-se comum nos últimos anos. As isoenzimas são, de maneira geral, marcadores excelentes, pois, como sua herança é co-dominante, o heterozigoto é facilmente reconhecido e a segregação pode ser acompanhada de maneira confiável.

Shields et al. (1983) destacam que as proteínas são marcadores interessantes para o estudo genético, porque elas são produto primário dos genes estruturais. Mudanças na seqüência de bases codificadoras, na maioria dos casos, resultarão em mudanças na estrutura primária da proteína correspondente. Além disso, em consequência de suas propriedades catalíticas, as enzimas, em especial as isoenzimas, podem refletir o estado metabólico e diferenciado das células.

Segundo Brown & Weier (1983), o pré-requisito essencial para análise da estrutura genética das populações seria a capacidade de discriminar entre os genótipos individuais tão estreitamente quanto possível, em termos de DNA.

Kesseli & Micheltore (1986) e Falcão & Contel (1991) abordam que as variações protéicas são de grande importância nos estudos genéticos como indicadores dos níveis de polimorfismo e relacionamento filogenético, bem como na identificação de raças, espécies e populações, representando, desse modo, uma valiosa ferramenta para estudos evolutivos e taxonômicos. Além disso, a diversidade alélica varia grandemente de loco para loco, sendo grande a variabilidade isoenzimática em organismos diplóides.

Cavalli-Molina (1984) destaca que numerosos estudos de locos enzimáticos mostram a existência de níveis significativos da variação gênica intra e interpopulacional em uma mesma espécie, além de uma diferenciação considerável entre espécies no grau de heterogeneidade isoenzimática intrapopulacional.

Torggler et al. (1995) enfatizam que em plantas, cujas características de valor adaptativo são, em sua maioria, controladas por muitos genes de pequeno efeito fenotípico, o estabelecimento da correspondência entre variação isoenzimática e variação fenotípica é difícil de ser compreendido claramente. Nos estudos de DNA, entretanto, essa relação estaria ainda mais distante, além de ser muito pouco

conhecida em plantas. Desse modo, o papel das isoenzimas como marcadores genéticos seria de valor indiscutível para as diversas áreas básicas de pesquisa genética em plantas e, para o futuro, as isoenzimas apresentariam potencial enorme para serem usadas junto com marcadores moleculares (Clegg et al., 1990), monitorando o mapeamento de características quantitativas (Tanksley & Orton, 1983).

Numerosas aplicações da eletroforese de isoenzimas têm sido feitas. Entre algumas dessas, pode-se ressaltar a distinção entre variedades de interesse econômico, a identificação do genoma das espécies, o estudo das isoenzimas e suas relações com resistência ou suscetibilidade a doenças, os estudos de mapeamento genético em cultivares e seus parentes selvagens, a investigação das relações entre as espécies e a resolução da origem e natureza de poliplóides de muitos gêneros.

Marcadores protéicos – gliadinas e gluteninas de alto e baixo peso molecular

Os marcadores protéicos constituem outra classe de marcadores que comumente são designados dessa forma por estarem relacionados com proteínas de reserva, diferenciando-os dos bioquímicos. Neste trabalho, são abordadas as proteínas de reserva de trigo e que mundialmente são usadas na seleção assistida para os programas de melhoramento genético.

Durante o processo de panificação, as proteínas do glúten são responsáveis, entre os componentes da farinha de trigo, pela formação de uma rede viscoelástica a qual, ao sustentar o gás produzido pela fermentação, dá forma ao pão. Essas proteínas de reserva estão presentes no endosperma da semente e são as principais responsáveis pela qualidade de panificação, representando 85 % das proteínas da farinha.

O glúten é formado por várias proteínas que podem ser visualizadas por meio de eletroforese, sendo constituídas por amplo espectro de peso molecular. Essas proteínas são classificadas em dois grupos: as gluteninas (alto e baixo peso molecular), responsáveis pela elasticidade, e as gliadinas, responsáveis pelas características de viscosidade. Cada proteína é produto de, pelo menos, um gene, sem haver modificações pós-traducionais, excetuando-se a formação de pontes de dissulfeto (Caldeira et al., 2000).

Os padrões eletroforéticos de alto peso molecular permitem prever a qualidade de panificação de um genótipo de trigo. Desse modo, é amplamente aceito que a qualidade industrial de trigo é determinada, principalmente, pela fração das proteínas do glúten do grão, a qual é extremamente influenciada pelos alelos dos locos que codificam essas proteínas, revestindo-se de grande importância prática a identificação desses alelos.

As gluteninas de alto peso molecular (Gs APM) são do tipo poliméricas e estabilizadas pelas pontes dissulfeto, resultantes da ligação dos resíduos de cisteína. As subunidades de Gs APM são codificadas por genes *Glu-1* localizados no braço longo do primeiro grupo homeólogo da espécie (cromossomos 1A, 1B e 1D), que podem codificar para um ou dois tipos de polipeptídeos. Numerosos alelos, responsáveis pela produção de subunidades diversas, têm sido descritos para cada loco. *Glu-1B* apresenta polimorfismo maior, com cinco alelos comuns e, pelo menos, seis alelos raros, *Glu-1D* apresenta dois alelos comuns e quatro alelos raros e *Glu-1A* é o loco menos polimórfico, com apenas três alelos, em que um é nulo e nos outros dois um tipo de polipeptídeo não é funcional. Essa variação na composição das subunidades de gluteninas (composição alélica) contribui para as diferenças genéticas em qualidade de panificação observada entre genótipos, seja por produzirem maior quantidade de Gs APM e/ou por produzirem subunidades mais efetivas (Payne et al., 1984; Caldeira et al., 2000).

A técnica SDS-PAGE, baseada na eletroforese em gel de poliacrilamida e o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS), permite que variantes alélicas dos locos *Glu-1* sejam facilmente detectadas. Isso permite que, em um programa de melhoramento visando à qualidade tecnológica de trigo, seja usada tal ferramenta tecnológica para seleção dos alelos Gs APM mais favoráveis.

Conforme Branlard & Darvelet (1985), numa progênie segregante não se pode avaliar facilmente a contribuição da variação alélica em outros componentes protéicos ou não. Por essa razão, as subunidades de gluteninas de alto peso molecular e a qualidade de panificação foram usadas para criar um escore para qualidade do loco *Glu-1*. O escore de *Glu-1* foi calculado baseado na relação entre subunidades de gluteninas de alto peso molecular e a qualidade determinada pelo teste de sedimentação com dodecil sulfato de sódio. Além disso, os padrões eletroforéticos obtidos com essas proteínas podem relacionar 69 % da variação da qualidade de panificação em um genótipo de trigo.

A qualidade tecnológica também pode ser estimada por meio das gluteninas de baixo peso molecular (Gs BPM). Diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos com essas proteínas, a fim de elucidar suas relações com a qualidade de panificação (Jackson et al., 1983; Payne et al., 1984; Singh & Shepherd, 1988; Gupta & Shepherd, 1990; Lew et al., 1992; Gupta & MacRitchie, 1994; Redaelli et al., 1995; Nieto-Taladriz et al., 1997; Rosa Filho, 1997). Além disso, o que muitas vezes dificulta a análise é que ocorre sobreposição das Gs BPM às gliadinas, quando submetidas à eletroforese unidimensional.

As gluteninas de baixo peso molecular também são do tipo poliméricas e apresentam-se constituídas por cerca de 15 subunidades de baixo peso molecular, variando de 31 a 48 kilodaltons, em comparação às de alto peso, que possuem de 3 a 5 subunidades, entre 97 a 136 kilodaltons (Kolster & Vereijken, 1993).

Quanto à localização cromossômica, Singh & Shepherd (1988) relatam que os genes que codificam as principais subunidades de baixo peso molecular estão mapeados no loco *Glu-3* do braço curto dos cromossomos 1A, 1B e 1D e próximo ao loco *Gli-1* que codifica as gliadinas.

As gliadinas, prolaminas de baixo peso molecular, têm composições características do genótipo e são independentes das condições de crescimento, sendo sua análise atrativa para identificação varietal (Wrigley, 1976). As gliadinas são proteínas monoméricas álcool-solúveis do endosperma de trigo e responsáveis pela extensibilidade da massa para produção de pão. Tais proteínas são subdivididas nos grupos alfa, beta, gama e ômega; os dois primeiros são codificados pelo loco *Gli-2*, localizado no grupo cromossômico 6, enquanto na maioria dos demais grupos são localizados no grupo cromossômico 1 e codificados pelo loco *Gli-1* (D'Ovidio et al., 1992; Ciaffi et al., 1993).

Na análise das gliadinas, os grupos são separados de acordo com seu decréscimo na mobilidade eletroforética em gel ácido de poliacrilamida (A-PAGE). Essa técnica baseia-se na extração dessa proteína do grão com solução de etanol e uso do lactato de alumínio na solução de extração, em vez de SDS (Bushuk & Zillman, 1978).

Recentemente, a caracterização de gliadinas para identificação varietal de cereais tem sido feita por técnica denominada HPCE - Eletroforese Capilar de Alta Resolução, "High Performance Capillary Electrophoresis" (Bietz & Zschmalzried, 1995; Bietz & Loohart, 1994; Werner et al., 1994). Conforme Loohart & Bean (1995), o método é eficiente também na diferenciação em casos de cultivares com parentesco próximo ("closed related"), como linhas irmãs e intercruzamentos.

Além de complementar outros métodos eletroforéticos e de cromatografia, vários fatores contribuem para o HPCE ser tido como vantajoso sobre os demais: pela

segurança, pois são usadas substâncias não tóxicas e poucos solventes orgânicos, pela rapidez da análise com alta resolução e pela possibilidade de análise quantitativa digital (Lookhart & Bean, 1995).

Marcadores moleculares – DNA

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA e representam o terceiro grupo de marcadores. Um marcador molecular é definido como *qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA* (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Milach (1998a) descreve que *marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente*. Esses autores citados acima apresentam extensa revisão sobre o assunto.

Existem diversas razões para que os marcadores moleculares apresentem vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais. Em contrastes com caracteres morfológicos, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos.

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando sua natureza genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1988a).

Marcadores moleculares de DNA têm sido usados para sinalização de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma; melhoramento dos pais de híbridos; introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose; reconstituição de *pedigrees*; testes de pureza genética; seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região; associação com caracteres quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente; processos legais; entre outros (Rafalski & Tingey, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a, 1998b).

Federizzi (1998) enfatiza que a área de maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal será através do emprego da seleção assistida para identificação de genótipos superiores em populações segregantes. Porém cita que alguns pré-requisitos devem ser levados em consideração, tais como: o marcador deve co-segregar ou estar associado ao gene de interesse; a técnica deve ser eficiente, de baixo custo para uso rotineiro, reproduzível e de fácil uso.

A seleção assistida por marcadores moleculares é realizada mediante a conversão de marcadores elaborados em um tipo de marcador simples, representando uma forma de seleção indireta na qual o caráter indireto apresenta herdabilidade próxima a 100 %, uma vez que a seleção poderá ser conduzida independente do ambiente. O uso de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores poderá incrementar a eficiência no melhoramento de plantas, pois menor número de progênies por combinação será necessário, bem como menor número de gerações para a estabilização dos genótipos (Barbosa Neto, 1998; Federizzi, 1998).

Contudo, os principais motivos para aplicação limitada de marcadores moleculares em programas de melhoramento ainda têm sido o custo e procedimentos elaborados da

maioria dos marcadores disponíveis. Assim, novos tipos de marcadores estão surgindo e abrindo novas perspectivas para seleção assistida.

Teoricamente, um número ínfimo de marcadores a serem analisados em uma população particular possibilita a construção de mapas genéticos de ligação com relativa facilidade. Além disso, o desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares de plantas.

A caracterização molecular de uma cultivar é um passo fundamental no processo de proteção legal dos materiais desenvolvidos por melhorista, contribuindo para a descrição detalhada desses materiais. O uso de marcadores moleculares tem sido importante em processos legais que envolvem disputas de direito autoral (Smith, 1989). O grau de similaridade entre cultivares pode ser empregado para reconstituir o *pedigree* de certos materiais, com fins de testar o conhecimento básico sobre o processo de desenvolvimento de uma cultivar e como subsídio à proteção legal (Dweikat et al., 1993).

O *fingerprinting* do DNA (caracterização molecular de uma espécie) tem sido usado para mapeamento de ligação do genoma, teste de identidade de cultivares, determinação da relação de parentesco e da variação genética, análise de populações e de *pedigree*, localização de loco para doenças e epidemiologia (Landegren et al., 1980).

Além disso, o estudo da diversidade genética de variedades e populações encontra aplicações diretas no melhoramento de plantas no que se refere à seleção e ao agrupamento dos materiais mais promissores para formação de populações básicas (Phillips et al., 1993).

Um dos grupos mais usados de marcadores moleculares, e que foi o primeiro a ser desenvolvidos, são os RFLPs (“Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição” - “Restriction Fragment Length Polymorphism”, Botstein et al., 1980). Quando clivados com enzimas de restrição, expressam, por eletroforese, as diferenças de comprimento de fragmentos de DNA, observadas por meio da hibridização desses fragmentos com seqüências homólogas do DNA marcado com radioatividade ou por luminescência. Os RFLPs podem ser causados por mudanças de pares de bases, rearranjo de DNA, inserção e/ou deleção ou diversidade natural na seqüência de nucleotídeos entre ou dentro de populações. Possibilitam a identificação de maior número de locos polimórficos e, por conseguinte, foram a primeira ferramenta eficaz para a seleção assistida por marcadores. A principal limitação da técnica é o uso intensivo da mão-de-obra e o tempo necessário para a análise genômica. Os RFLPs apresentam expressão co-dominante, e, por cobrirem todo o genoma, a probabilidade de associação de marcadores com genes de características agrônômicas importantes é grandemente aumentada.

Mais recentemente, o advento de técnicas baseadas em PCR (“Reação em Cadeia pela Polimerase” - “Polymerase Chain Reaction”) apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida em meados da década de 80 e alcançou uso disseminado e extenso em diversas áreas de biologia quase que imediatamente (White et al., 1989). PCR é uma técnica poderosa usada para ampliar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de ínfima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não. Tais *primers* delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (Mullis & Faloona, 1987; White et al., 1989).

Vários marcadores se baseiam no princípio do PCR. O RAPD (“Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso” - “Random Amplified Polymorphism DNA”, Williams et al., 1990), ou AP-PCR (“Polimorfismo Amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase” - “Amplified Polymorphism - Polymerase Chain Reaction”, Welsh & McClelland, 1990), oferece a oportunidade de gerar grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA, espalhados por todo o genoma (incluindo regiões de DNA repetitivo), usando *primers* escolhidos ao acaso, nas reações de amplificação.

Os marcadores RAPD, ao contrário dos RFLPs e daqueles obtidos com PCR, são baseados na amplificação do DNA, não requerendo conhecimento na seqüência do DNA-alvo, nem a seleção laboriosa de sondas.

Comparando com RFLPs, os marcadores RAPD não requerem *primers* espécie específicos, como é o caso das sondas usadas nos RFLPs, necessitam cerca de 100 vezes menos DNA, não é necessária digestão com enzimas de restrição, podem ser observados diretamente no gel, ao contrário de RFLP, que necessita *Southern blot* e hibridação com sondas marcadas (normalmente com fósforo radioativo), podendo cada *primer* amplificar diferentes locos do genoma (Devos & Gale, 1992; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A grande vantagem da técnica de marcadores RAPD está, sem dúvida, na sua capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, permitindo assim que possam ser usados como *fingerprinting*, distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones ou dentro destes. Além disso, os RAPDs são muito eficientes em identificar marcadores mais proximamente ligados, assim como podem mapear regiões constituídas por seqüências repetitivas.

Os marcadores denominados SSR (“Seqüências Simples Repetidas” - “Simple Sequence Repeats” ou “Microsatélites”, Hamada et al., 1982; Litt & Luty, 1989) são os mais polimórficos e consistem em pequenas seqüências com um a cinco pares de base que se repetem em série em número variável (geralmente de uma dezena a uma centena de vezes). Geralmente, os microsatélites identificam um único loco no genoma e, por sua alta taxa de mutação, são freqüentemente multialélicos, além de segregarem de modo co-dominante.

Os marcadores microsatélites têm eliminado a necessidade de cruzamentos distantes para maximizar o polimorfismo molecular, ou seja, qualquer cruzamento é potencialmente informativo para o mapeamento molecular. Isto é particularmente importante para espécies autógamas, como é o caso de trigo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Contudo, esses marcadores requerem a construção de biblioteca genômica enriquecida para seqüências microsatélites, sequenciamento desses clones e desenho dos *primers*. Microsatélites estão sendo desenvolvidos em alguns laboratórios do mundo para diversas culturas, como milho, arroz e trigo (Roder et al., 1995; Rongwen et al., 1995; Devos et al., 1995).

Os marcadores AFLPs (“Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados” - “Amplified Fragment Length Polymorphism” - Zabeau, 1993; Vos et al., 1995) constituem um dos mais recentes marcadores de DNA e combinam as vantagens dos RFLPs e RAPDs. Tais marcadores encontram-se distribuídos por todo o genoma de procariotos e eucariotos. A técnica dos AFLP consiste primeiramente na clivagem do DNA genômico do indivíduo usando duas enzimas de restrição, seguida do emprego de adaptadores específicos, que são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA que foram clivados. Após, são feitas as amplificações via PCR dos fragmentos do DNA. Por último, é realizada eletroforese em gel de alta resolução para visualização dos fragmentos gerados.

A vantagem desses marcadores é o grande número de fragmentos que são gerados e detectados em único gel, fazendo com que, apesar de ser um marcador essencialmente dominante, sejam capazes de analisar o maior número de locos em um único gel em relação aos outros marcadores, sendo, atualmente, considerados a mais eficiente entre as tecnologias de marcadores já desenvolvidas.

Devido ao polimorfismo gerado por esses marcadores ser muito amplo, há maior rapidez no mapeamento genético. Estão sendo usados em *fingerprinting*, na construção de mapas genéticos (Lin & Kuo, 1995; Eck et al., 1995; Vos et al., 1995; Becker et al., 1995; Maheswaran et al., 1997; Goodwin et al., 1998), na caracterização da diversidade genética (Barret & Kidwell, 1998; Barret et al.; 1998) e na detecção de mutações (Castiglioni et al., 1998), entre outros.

Além disso, qualquer dos marcadores citados pode ser usado para uma rápida identificação de ligação com alelos de genes que conferem importantes características para o melhoramento, se analisados pela técnica BSA, ou seja, Análise de Segregantes em Bulk - "Bulk Segregant Analysis" (Michelmore et al. 1991).

Conforme Ferreira & Grattapaglia (1998), a análise de segregantes em *bulk* é um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou região do genoma. O método envolve a comparação de 2 *pool* de amostras de DNA dos indivíduos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada *pool* ou *bulk*, os indivíduos são identificados para características ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois *pools* contrastantes para uma característica (por exemplo: resistência ou suscetibilidade a uma doença particular) são analisados para identificar marcadores que os distinguem. Marcadores que são polimórficos entre os *pools* serão geneticamente ligados ao loco que determina a característica usada para construir os *pools*.

Referências bibliográficas

- BARBOSA NETO, J.F. Seleção assistida por marcadores moleculares. In: MILACH, S.C.K., ed. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.75-80.
- BARRET, B.A.; KIDWELL, K.K. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. **Crop Science**, v.38, p.1261-1267, 1998.
- BARRET, B.A.; KIDWELL, K.K.; FOX, P.N. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity. **Crop Science**, v.38, p.1271-1278, 1998.
- BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular & General Genetics**, v.249, p.65-73, 1995.
- BIETZ, J.A.; SCHMALZRIED, E. Wheat varietal identification by acidic capillary electrophoresis. **Food Science and Technology**, v.28, p.174, 1995.
- BIETZ, J.A.; LOOKHART, G.L. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis: an inter laboratory comparison of methods. **Cereal Foods World**, v.39, p.603, 1994.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BRANLARD, G.; DARVELET, M. Diversity of grain proteins and bread wheat quality.

1. Correlation between gliadin bands and flow quality characteristics. **Journal of Cereal Science**, v.3, p.329-343, 1985.
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J., ed. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part.A, p.219-239.
- BUSHUK, W.; ZILLMAN, R.R. Wheat cultivar identification by gliadin electroforegrams. I. Apparatus, method and nomenclature. **Canadian Journal of Plant Science**, v.58, p.505, 1978.
- CALDEIRA, M.T.M.; LIMA, V.L.A.; SEKI, H.A.; RUMJANEK, F.D. Trigo. **BIOTECNOLOGIA Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.44-48, 2000.
- CASTIGLIONI, P.; POZZI, C.; HEUN, M.; TERZI, V.; MULLER, K.J.; ROHDE, W.; SALAMINI, F. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. **Genetics**, v.149, p.2039-2056, 1998.
- CAVALLI-MOLINA, S. **Variabilidade genética em populações naturais de *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae)**. Porto Alegre: UFRGS, 1984. 231p. Tese Doutorado.
- CIAFFI, M.; LAFIANDRA, D.; PORCEDDU, E.; BENEDETTELLI, S. Storage protein variation in wild emmer wheat from Jordan and Turkey. I. Electrophoretic characterization of genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.474-480, 1993.
- CLEGG, M.T.; ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L. Is the gene unit of selection? Evidence from two experimental plant population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.69, p.2474-2478, 1990.
- D'OVIDIO, R.; TANZARELLA, O.A.; PORCEDDU, E. Molecular analysis of gliadin and glutenin genes in *T. durum* cv. Lira. A model system to analyse the molecular bases of quality differences in durum wheat cultivars. **Journal of Cereal Science**, v.16, p.165-172, 1992.
- DEVOS, K.M.; BRYAN, G.J.; COLLINS, A.J.; STEPHENSON, P; GALE, M.D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage protein as molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90247-90252, 1995.
- DEVOS, K.M.; GALE, M.D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.567-572, 1992.
- DWEIKAT, I.; MACKENZIE, S.; LEVY, M.; OHM, H. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.497-505, 1993.
- ECK, H.J. van; VOORT, J.R. van der; DRAAISTRA, J.; ZANDVOORT, P. van; ENCKEVORT, E. van; SEGERS, B.; PELEMAN, J.; JACOBSEN, E.; HELDER, J.; BAKKAR, J. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. **Molecular Breeding**, v.1, p.397-410, 1995.
- FALCÃO, T.M.M.A; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in populations of Brazilian social bees: III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD, and IDH. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, n.1, p.61-72, 1991.
- FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K., ed. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.3-15.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

- GOODWIN, S.B.; HU, X.; SHANER, G. An AFLP marker linked to a gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatoon, Saskatchewan. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan, 1998. v.3, p.108-110.
- GUPTA, R.B.; SHEPHERD, K.W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. I. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid bread wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.665-674, 1990.
- GUPTA, R.B.; MacRITCHIE, F. Allelic variation at glutenin subunits and gliadin loci, Glu-1, Glu-3, and Gli-1 of common wheat. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. **Journal of Cereal Science**, v.19, p.19-29, 1994.
- HAMADA, H.; PETRINO, M.C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.79, p.6465-6469, 1982.
- JACKSON, E.A.; HOLT, L.M.; PAYNE, P.I. Characterisation of high molecular weight gliadin and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal location of their controlling genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.66, p.29-37, 1983.
- KESSELI, R.V.; MICHELMORE, R.W. Genetic variation and phylogenesis detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. **The Journal of Heredity**, v.77, n.5, p.324-331, 1986.
- KOLSTER, P.; VEREIJKEN, J.M. Evaluating APM glutenin subunits to improve bread making quality of wheat. **Cereal Foods World**, v.38, p.76-82, 1993.
- LANDEGREN, U.; KAISER, R.; CASKEY, C.T.; HOOD, L. DNA diagnostics. Molecular techniques and automation. **Science**, v.242, p.229-237, 1980.
- LEW, E.J.L.; KUZMICKY, D.D.; KASARDA, D.D. Characterisation of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal aminoacid sequencing. **Cereal Chemistry**, v.69, p.508-515, 1992.
- LIN, J.J.; KUO, J. AFLPTM: a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. **Focus**, v.17, p.66-70, 1995.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- LOOKHART, G.L.; BEAN, S.R. Separation and characterization of wheat protein by high-performance capillary electrophoresis. **Cereal Chemistry**, v.72, n.6, p.527-532, 1995.
- MAHESWARAN, M.; SUBUDHI, P.K.; NANDI, S.; XU, J.C.; PARCO, A.; YANG, D.C.; HUANG, N. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.39-45, 1997.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **BIOTECNOLOGIA Ciência e**

Desenvolvimento, v.5, p.14-17, 1998b.

- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.55, p.335-350, 1987.
- NIETO-TALADRIZ, M.T.; RUIZ, M.; MARTÍNEZ, M.C.; VÁZQUEZ, J.F.; CARRILLO, J.M. Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.1155-1160, 1997.
- PAYNE, P.I.; JACKSON, E.A.; HOLT, L.M.; LAW, C.N. Genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p.235-243, 1984.
- PHILLIPS, T.D.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M. Isozyme variation in germplasm accessions of the wild oat *Avena sterilis* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.54-64, 1993.
- RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines. **Trends in Genetics**, v.9, p.275-280, 1993.
- REDAELLI, R.; MOREL, M.H.; AUTRAN, J.C.; POGNA, N.E. Genetic analysis of low-Mr glutenin subunits fractionated by two-dimensional electrophoresis (A-PAGE x SDS-PAGE). **Journal of Cereal Science**, v.21, p.5-13, 1995.
- RODER, M.S.; PLASCHKE, J.; KONIG, S.U.; BORNER, A.; SORRELS, M.A.; TANSKLEY, S.D.; GANAL, M.W. Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular and General Genetics**, v.246, p.327-333, 1995.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWATT, A.A.; LAVI, U; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.43-48, 1995.
- ROSA FILHO, O. **Effect of the six glutenin loci on selected bread quality traits in wheat**. Corvallis: Oregon State University, 1997. Ph.D. Thesis.
- SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes, and evolution. In: MARKERT, C.L., ed. **Isozymes IV. Genetics and evolution**. New York. Academic, 1975. p.1-7.
- SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J., ed. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part A, p.443-468.
- SINGH, N.K.; SHEPHERD, K.W. Linkage mapping of the genes controlling endosperm protein in wheat. I. Genes on the short arms of group 1 chromosome. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.628-641, 1988.
- SMITH, J.S.C. The characterization and assessment of genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) hybrids that are widely grown in France: chromatographic data and isozymic data. **Euphytica**, v.43, p.73-85, 1989.
- TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part A.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas-variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE 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.

- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WERNER, W.E.; WICTOROWICZ, J.E.; KASARDA, D.D. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis: gliadin, and high molecular weight glutenin analysis. **Cereal Chemistry**, v.74, p.387, 1994.
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v.5, p.185-189, 1989.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, 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, p.6531-6535, 1990.
- WRIGLEY, C.M. Single-seed identification of wheat varieties use of grain hardness testing, electrophoretic analysis and a rapid test paper for phenol reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.27, p.429-432, 1976.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application** N° 0534858, 1993.
-



Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: **Rainoldo Alberto Kochhann**

Amarilis Labes Barcellos, Erivelton Scherer Roman, Geraldino Peruzzo, Irineu Lorini

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins

Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira

BRAMMER, S.P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p.html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 3). Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm