



***APLICAÇÃO TÉCNICA DE MARCADORES
MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE
PLANTAS***

Antônio Carlos Baião de Oliveira
Eveline Teixeira Caixeta
Eunize Maciel Zambolim
Laércio Zambolim
Ney Sussumu Sakiyama

***Instituto Agrônomo
Campinas (SP)
agosto, 2007***



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Agronômico

Governador do Estado de São Paulo
José Serra

Secretário de Agricultura e Abastecimento
João de Almeida Sampaio Filho

Secretário-Adjunto
Antonio Júlio Junqueira de Queiroz

Chefe de Gabinete
Antonio Vagner Pereira

Coordenador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
João Paulo Feijão Teixeira

Diretor Técnico de Departamento do Instituto Agronômico
Orlando Melo de Castro

APLICAÇÃO TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Antonio Carlos Baião de **OLIVEIRA**

Eveline Teixeira **CAIXETA**

Eunize Maciel **ZAMBOLIM**

Laércio **ZAMBOLIM**

Ney Sussumu **SAKIYAMA**

Ficha elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

A642 Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas / Antonio Carlos Baião de Oliveira; et al. Campinas: Instituto Agronômico, 2007.
17p. (Documentos IAC, 81)

ISSN: 1809 - 7693
Publicação on-line

1. Melhoramento de plantas 2. Melhoramento vegetal
3. Marcadores moleculares 4. Mapeamento I. Oliveira, Antonio Carlos Baião de II. Caixeta, Eveline Teixeira III. Zambolim, Eunize Maciel IV. Zambolim, Laércio V. Sakiyama, Ney Sussumu VI. Campinas. Instituto Agronômico. VII. Título

CDD. 631.522

A eventual citação de produtos e marcas comerciais, não expressa, necessariamente, recomendações do seu uso pela Instituição.

É permitida a reprodução, desde que citada a fonte. A reprodução total depende de anuência expressa do Instituto Agronômico.

COMITÊ EDITORIAL DO IAC

OLIVEIRO GUERREIRO FILHO - EDITOR-CHEFE

RICARDO MARQUES COELHO

CECILIA A. F. P. MAGLIO

EQUIPE PARTICIPANTE DESTA PUBLICAÇÃO

REVISÃO DE VERNÁCULO: MARIA ANGELA MANZI DA SILVA

COORDENAÇÃO DA EDITORAÇÃO: MARILZA RIBEIRO A. DE SOUZA

EDITORAÇÃO ELETRÔNICA: GUSTAVO PEREIRA VARGAS DE SOUZA

CRIAÇÃO DA CAPA: GUSTAVO PEREIRA VARGAS DE SOUZA

INSTITUTO AGRONÔMICO

Centro de Comunicação e Transferência do Conhecimento

Avenida Barão de Itapura, 1.481

13020-902 Campinas (SP) - BRASIL

Fone: (19) 3231-5422 (PABX)

Fax: (19) 3231-4943

www.iac.sp.gov.br

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. PRINCIPAIS TIPOS DE MARCADORES DE DNA	3
2.1 Marcadores de DNA indentificados por hibridização	3
2.2 Marcadores embasados na amplificação de DNA via PCR	4
3. APLICAÇÕES DOS MARCADORES DE DNA NO MELHORAMENTO GENÉTICO	6
3.1 Importância do melhoramento genético na agricultura	6
3.2 Caracterização molecular de genótipos	7
3.3 Desenvolvimento de mapas de ligação gênica	8
3.4 Identificação de genes controlando características qualitativas	9
3.5 Mapeamento de genes controlando características quantitativas (QTLs)	9
3.6 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)	10
3.6.1 Retrocruzamentos assistidos por marcadores	10
3.6.2 Piramidação de genes de resistência	11
3.6.3 Seleção assistida para características quantitativas	12
4. PERSPECTIVAS DOS PROJETOS GENOMA NA IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
REFERÊNCIAS	15

APLICAÇÃO TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Antonio Carlos Baião de **OLIVEIRA** ^{(1)*}

Eveline Teixeira **CAIXETA** ⁽²⁾

Eunize Maciel **ZAMBOLIM** ⁽³⁾

Laércio **ZAMBOLIM** ⁽⁴⁾

Ney Sussumu **SAKIYAMA** ⁽⁵⁾

Resumo

O uso de cultivares geneticamente melhorados, com elevado desempenho agrônômico nos ambientes de cultivo, é um dos responsáveis pelo sucesso da agricultura nos últimos anos. Assim, o melhoramento de plantas tem-se mostrado fundamental no desenvolvimento de novas cultivares das várias espécies de interesse econômico. Os melhoristas têm buscado constantemente aumento na eficiência da seleção e maximização dos ganhos genéticos. Uma forma de alcançar esses objetivos é a introdução, nos programas de melhoramento, de tecnologias atuais que tornem o processo de seleção de novas cultivares mais eficiente. Uma das alternativas tem sido a utilização de marcadores moleculares, que permitem selecionar indivíduos superiores com base no genótipo, pois não são afetados pelo ambiente e não mudam durante o ciclo de vida do indivíduo. Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis variam conforme a tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, habilidade para detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais marcadores moleculares são detectados por hibridização com sondas específicas ou por amplificação do DNA via PCR. As mais importantes aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento são: caracterização molecular de genótipos, desenvolvimento de mapas de ligação gênica, identificação de genes controlando características qualitativas, mapeamento de genes controlando características quantitativas e seleção assistida por marcadores moleculares. Portanto, os melhoristas podem adotar rapidamente qualquer aplicação de marcadores moleculares que venha melhorar a eficiência de seleção e diminuir custos em seus programas de melhoramento.

Palavras-chave: Tipos de marcadores, melhoramento vegetal, mapeamento, seleção assistida.

(1) Pesquisador Científico, Centro de Café 'Alcides Carvalho', IAC, Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas (SP). E-mail: baiao@iac.sp.gov.br *Autor correspondente.

(2) Pesquisadora da Embrapa-Café, Universidade Federal de Viçosa/BIOAGRO/Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, 36570-000, Viçosa (MG). E-mail: eveline.caixeta@embrapa.br

(3) Pesquisadora da UFV, Universidade Federal de Viçosa/BIOAGRO/Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, 36570-000, Viçosa (MG). E-mail: eunize@ufv.br

(4) Professor da UFV, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 36570-000, Viçosa (MG). E-mail: zambolim@ufv.br

(5) Professor da UFV, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 36570-000, Viçosa (MG). E-mail: ney@funarbe.org.br

Abstract

The use of genetically improved cultivars, exhibiting high agronomic performance in cultivation environments, is one of the factors responsible for the agriculture success during the last years. Therefore, crop breeding proved to be essential for the development of new cultivars from several species of economical interest. Breeders are constantly looking for increasing selection efficiency and maximizing genetic gain. One way for reaching those goals is the introduction in breeding programs of new technologies that results in more efficient selection of new cultivars. One of these technologies is use of molecular markers, which allows selecting individuals strictly based on genotype superiority, once they are not affected by environment and they do not change during individual life cycle. Different types of available molecular markers vary according to the technology used to reveal DNA variability, the ability to detect differences among individuals, cost, use easiness, consistence and repeatability. Major molecular markers are detected by specific probes hybridization or by DNA amplification through PCR. The most important applications of molecular markers in crop breeding are: genotype molecular characterization, genetic linkage maps development, identification of genes that control qualitative characteristics, mapping of genes coding for quantitative traits, and molecular markers assisted selection. Therefore, breeders can quickly adopt any application of molecular markers that improve the selection efficiency and reduce costs in their breeding programs.

Key-words: DNA markers, crop breeding, mapping, assisted selection.

1. INTRODUÇÃO

Marcadores genéticos são definidos como elementos capazes de diferenciar, prever e caracterizar um indivíduo e que também sejam reproduzidos na descendência. Características morfológicas, fisiológicas ou moleculares podem ser usadas como marcadores genéticos. Até meados da década de 60, as análises genéticas eram realizadas com a utilização de marcadores morfológicos de fácil identificação no organismo e, geralmente, controlados por um único gene. Apesar de os marcadores morfológicos terem contribuído significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a falta de ligação com caracteres de importância econômica, a influência do ambiente e os efeitos deletérios das mutações limitaram sua utilização (Guimarães e Moreira, 1999).

O grande impulso no uso de marcadores na genética e no melhoramento ocorreu com o aparecimento dos marcadores moleculares. Os primeiros a serem desenvolvidos foram os marcadores embasados em variantes alélicas de isoenzimas, o que permitiu a ampliação do uso de marcadores de, pelo menos, uma ordem de magnitude em relação aos marcadores morfológicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto, os marcadores isoenzimáticos possuem a desvantagem de evidenciar um número limitado de polimorfismo entre genótipos próximos. Com o aprimoramento das técnicas de biologia molecular, o DNA passou a ser ponto focal no desenvolvimento de novos marcadores, os chamados marcadores de DNA. O grande impacto é que, nesse caso, foi desenvolvido um número quase ilimitado de marcadores polimórficos, distribuídos aleatoriamente no genoma, independentemente do estágio de desenvolvimento da planta e de variações ambientais.

A tecnologia dos marcadores moleculares oferece a possibilidade ao melhorista de acessar o genótipo da planta ao invés de simplesmente o fenótipo, como normalmente ocorre. Em razão de o fenótipo ser a expressão do genótipo, sob condições ambientais específicas, este pode mudar com o ambiente. No entanto, o genótipo, ou a constituição do DNA de um indivíduo permanece constante durante todo o seu ciclo de vida. Selecionar com base no fenótipo é como perseguir um alvo móvel, que muda conforme a variação do ambiente. Já a seleção baseada no genótipo do indivíduo pode contornar esse problema.

Os marcadores de DNA são livres de efeitos pleiotrópicos, permitindo, dessa forma, que qualquer número de marcadores seja monitorado em uma única população. A análise de marcadores moleculares pode ser executada em qualquer estágio do ciclo de vida de um organismo e a partir de quase qualquer tipo de tecido, incluindo tecidos de herbários e mumificados. Muitos marcadores de DNA apresentam expressão co-dominante, permitindo que genótipos sejam determinados em qualquer esquema de melhoramento (Kumar, 1999).

Conforme discutido por Federizzi (1998), toda nova tecnologia tem vantagens e desvantagens no seu emprego. Além das vantagens citadas acima, os marcadores de DNA podem ser utilizados, no melhoramento de plantas, em gerações altamente segregantes, permitindo a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção. Podem, também, minimizar os problemas associados aos métodos de melhoramento clássico, como enorme trabalho e tempo, principalmente, em se tratando de culturas perenes. A principal desvantagem é ainda o custo, que pode dificultar seu uso na rotina dos programas de melhoramento.

Com o rápido avanço das técnicas, simplificação e redução dos custos, os marcadores de DNA vêm-se tornando de uso rotineiro nos programas de melhoramento genético de plantas, aumentando a eficiência e proporcionando maiores ganhos genéticos nas principais culturas de interesse econômico. O papel dos marcadores moleculares não é substituir as atuais técnicas de seleção e sim, auxiliá-las, visando incrementar os ganhos genéticos do programa. Sua implementação de maneira eficiente vai depender do planejamento e desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento genético (Federizzi, 1998).

2. PRINCIPAIS TIPOS DE MARCADORES DE DNA

Marcadores de DNA são caracterizados pela detecção de variação natural nas seqüências de DNA entre indivíduos e são herdados geneticamente. Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade ao nível do DNA. Esses marcadores distinguem-se ainda quanto à capacidade de gerar diferenças entre indivíduos (polimorfismo), custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade.

Os principais marcadores de DNA podem ser classificados em dois tipos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los, a saber: marcadores baseados na hibridização com sondas específicas e aqueles com base na amplificação do DNA via reação de polimerização em cadeia (PCR-Polymerase Chain Reaction). Serão citados abaixo apenas os principais marcadores de DNA, apesar de diversos variantes deles estarem disponíveis na literatura.

2.1 Marcadores de DNA identificados por hibridização

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A técnica de RFLP foi descrita, inicialmente, por Botstein et al. (1980) e consiste das seguintes etapas: extração de DNA; digestão com enzimas de restrição; separação dos fragmentos por eletroforese; transferência do DNA para uma membrana; hibridização com sondas homólogas a determinados fragmentos de DNA conhecidos e, em seguida, revelação dos fragmentos hibridizados. O polimorfismo é detectado pela presença e/ou ausência do sítio de restrição em um dos alelos. Como vantagens, esses marcadores são co-dominantes, o que possibilita a identificação de indivíduos homocigotos e heterocigotos, mostram polimorfismo em regiões transcritas e não transcritas, com número praticamente ilimitado e alta estabilidade do DNA e utilizam sondas heterólogas. Devido a tais características, o RFLP foi o marcador escolhido para a expansão dos mapas de ligação genética em várias espécies.

No entanto, sua utilização pelos melhoristas ficou restrita devido ao seu alto custo e uso de sondas radioativas. O desenvolvimento de marcadores RFLP envolve um processo caro e com muitas etapas, que requer considerável investimento em pessoal, equipamentos, reagentes químicos e cuidados especiais quando sondas radioativas são utilizadas.

2.2 Marcadores embasados na amplificação de DNA via PCR

A concepção da tecnologia da reação em cadeia da polimerase ou PCR por Kary Mullis (Mullis e Faloona, 1987), que lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina, revolucionou as pesquisas biológicas fundamentais e as áreas aplicadas, como o melhoramento de plantas. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR tornam esta técnica particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os principais marcadores de DNA derivados de PCR são:

RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*)

RAPD foi um dos primeiros marcadores desenvolvidos com base em PCR (Williams et al., 1990). O RAPD envolve as seguintes etapas: desnaturação do DNA; pareamento de oligonucleotídeo iniciador (ou simplesmente oligo) à fita de DNA molde; extensão do oligo pela DNA polimerase; e separação dos fragmentos amplificados por eletroforese. O oligo utilizado tem seqüência arbitrária, não sendo necessário o conhecimento prévio da seqüência de DNA a ser amplificada. Em razão de os oligos serem de 10 nucleotídeos de comprimento e de seqüência aleatória, eles têm a possibilidade de se anelar em muitos locais no genoma. Para que a amplificação ocorra, a ligação dos oligos deve ocorrer nas duas fitas do DNA, com os sítios de anelamento afastados, geralmente, de 150 a 4.000 pares de base. Os polimorfismos revelados pela técnica RAPD são oriundos de mutações de ponto, deleções no sítio de pareamento do oligo ou inserções entre os sítios de pareamento. Esse marcador possui algumas vantagens sobre outros métodos: (a) envolve um processo mais simples e rápido; (b) um conjunto único universal de oligos arbitrários pode ser utilizado e rapidamente rastreado em vários organismos; (c) a análise pode ser feita em gel de agarose; (d) não requer sondas isoladas; (e) uma menor quantidade de DNA é utilizada; (f) mais sensível na detecção de polimorfismo ao nível de DNA, quando comparado aos RFLPs e isoenzimas; e (g) menor custo da técnica. Portanto, a tecnologia de RAPD é bastante acessível, e pode ser transferida diretamente para estações experimentais de melhoramento, para laboratórios avançados de pesquisa e ser utilizada rotineiramente pelos geneticistas. Contudo, observa-se uma grande desvantagem que é a baixa repetibilidade dos resultados, além de serem marcadores dominantes e, por isso não distinguem locos em heterozigose.

SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, as quais consistem em 1 a 5 nucleotídeos repetidos em seqüência. Essas regiões repetidas têm sido denominadas de microssatélites ou, SSR. As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de oligos específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de oligos complementares às seqüências únicas que os flanqueiam, quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR é uma consequência advinda de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do SSR (Cregan et al., 1999). Dessa forma, cada microssatélite, independentemente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (Akkaya et al., 1992).

O polimorfismo dos microssatélites é consequência dos diferentes números de unidades repetitivas presentes no genoma e o resultado pode ser visualizado em gel de poliacrilamida ou géis de agarose concentrados. São marcadores co-dominantes, facilmente reproduzíveis, hipervariáveis e têm as vantagens de ser de rápida detecção e de permitir a análise de grande número de combinações de oligos por amostras em géis multiplex. A grande limitação é o desenvolvimento dos oligos, que dependem do conhecimento das seqüências que flanqueiam as bases repetidas (McCouch et al., 1997).

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os marcadores AFLP combinam a especificidade, resolução e poder da digestão com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Essa técnica envolve as seguintes etapas: digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte freqüente, ligação a adaptadores específicos; amplificação seletiva por PCR com oligos específicos e separação dos fragmentos em géis de poliacrilamida. O polimorfismo identificado se baseia nas diferenças entre genótipos quanto à distribuição dos sítios de restrição das enzimas e de acordo com complementariedade ou não dos oligos de amplificação seletiva. Esse processo tem a vantagem de detectar um grande número de bandas e com isso verificar vários locos ao mesmo tempo. Esses marcadores revelam grande variabilidade genética e não requerem informação prévia de seqüência. As desvantagens desse processo são o custo elevado e a necessidade de DNA de alta pureza, além de envolver várias etapas para obtenção dos resultados.

STS (*Sequence Tagged Sites*)

STS é a conversão de RFLP em marcadores com base em PCR. Essa idéia surgiu a partir da facilidade no seqüenciamento de fragmentos de DNA, com o surgimento dos seqüenciadores automáticos. No desenvolvimento da técnica, as extremidades das sondas utilizadas para detectar os fragmentos RFLP são seqüenciadas e desenhados pares de oligos específicos, complementares a essas seqüências, que serão utilizados para amplificar os fragmentos polimórficos de interesse via PCR.

SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*)

Os marcadores RAPDs podem ser convertidos em outros tipos de marcadores mais aplicáveis, tais como marcadores SCAR. Essa técnica foi proposta por Paran e Michelmore (1993) e envolve, basicamente, as seguintes etapas: (1) isolamento da banda de interesse do gel e clonagem em um plasmídeo-vetor; (2) seqüenciamento do fragmento clonado; (3) desenho dos oligos específicos, com base na seqüência; (4) validação dos oligos.

As técnicas STS e SCAR diferem do RAPD pelo tipo de oligos utilizados, com a vantagem de serem mais consistentes e a desvantagem de envolver seqüenciamento e desenvolvimento dos oligos, o que onera o processo. A partir do momento em que os oligos estejam desenvolvidos, os custos são similares ao RAPD. Tais considerações, associadas à consistência desses dois tipos de marcadores, tornam essas técnicas promissoras para utilização rotineira nos programas de melhoramento.

Utilização de Oligonucleotídeos Iniciadores Heterólogos

A partir dos projetos de seqüenciamento genômico de várias plantas nos últimos anos, e da utilização de ferramentas de bioinformática, os pesquisadores chegaram à conclusão que muitas seqüências de bases presentes no DNA de diferentes espécies vegetais são muito parecidas e muitas vezes idênticas entre essas espécies. A descoberta desse paradigma ventilou a possibilidade de utilização de informações contidas em espécies mais estudadas, como desenho de oligos (heterólogos) específicos em outras espécies afins.

A sintenia, termo usado para descrever a conservação na ordem de genes ou seqüências de DNA em cromossomos entre espécies relacionadas, é grande para determinadas espécies de plantas. Por exemplo, a sintenia e homologia gênica entre arroz e os genomas de outros cereais são significativas. Noventa e oito por cento de proteínas homólogas de milho, trigo, e cevada foram também encontradas em arroz. Por outro lado, a sintenia com *Arabidopsis* é limitada, embora seja possível identificar e atribuir a funcionalidade de genes candidatos de arroz ortólogos aos genes de *Arabidopsis* (Goff et al., 2002; The International Rice Genome e Sequencing Project, 2005). O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado planta-modelo entre as monocotiledôneas para estudos de genômica funcional e estrutural, enquanto *Arabidopsis thaliana* é a espécie-modelo entre as dicotiledôneas. Essas duas espécies tiveram o seu genoma completamente seqüenciado e a função das várias seqüências caracterizada (Rossini et al., 2006).

Neste contexto, vários oligos desenhados a partir de seqüências dos bancos de dados de arroz estão sendo testados e utilizados em outros cereais, como milho, trigo, cevada, aveia, etc. Em projetos de seqüenciamento parcial do genoma do café (*Rubiaceae*) e análise das seqüências, tem-se verificado grande sintenia dessa espécie com plantas da família *Solanaceae*, principalmente tomate (Lin et al., 2005). Dessa forma, informações adquiridas em espécies de solanáceas poderão ser utilizadas em café, principalmente oligos SSR e de genes específicos, para serem incorporados nas análises moleculares dessa espécie.

3. APLICAÇÕES DOS MARCADORES DE DNA NO MELHORAMENTO GENÉTICO

A tendência geral do melhoramento genético vegetal é a integração das técnicas clássicas com aquelas modernas da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Nesse contexto, a tecnologia dos marcadores de DNA pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e da característica estudada, bem como para a geração e o desenvolvimento de produtos melhorados. Com o advento dos marcadores de DNA, vários trabalhos foram realizados visando utilizá-los como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento. Os marcadores sempre foram empregados com a expectativa de 'etiquetar' os genes de interesse e auxiliar a selecioná-los, quando a análise fenotípica fosse ineficiente (Kumar, 1999).

As principais possibilidades de uso dos marcadores moleculares, para auxiliar os programas de melhoramento serão discutidas a seguir. Antes, porém, será feita uma breve abordagem a respeito da importância do melhoramento de plantas para a agricultura moderna.

3.1 Importância do melhoramento genético na agricultura

O melhoramento de plantas tem sido definido como a arte e a ciência de modificar geneticamente as plantas, visando torná-las mais úteis ao homem. O melhoramento vegetal como arte depende da intuição e das experiências acumuladas, inerentes a cada indivíduo. Apesar de toda a evolução nas técnicas de melhoramento, a arte continua a ser um componente muito importante na carreira de um melhorista (Borém, 2001 e Federizzi, 1998).

Como ciência, o melhoramento genético de plantas é relativamente recente e depende fundamentalmente dos princípios da genética e de outras ciências correlatas como bioquímica, botânica, estatística, fisiologia vegetal, informática e, mais recentemente, técnicas de biologia molecular.

O melhoramento é um processo evolutivo, cuja base foi lançada no início do século XX, onde foram combinadas duas correntes do pensamento: a idéia de Darwin do maior número de progênies deixado por indivíduos mais adaptados, com as leis da herança de Mendel. A adaptação em populações é obtida pela sucessiva substituição de genes e/ou alelos. Em termos de melhoramento,

adaptação significa o incremento na produção na parte da planta economicamente importante, como produtividade, teor de proteína ou quantidade de massa verde, por exemplo. O mecanismo fundamental do melhoramento é a substituição de alelos sob seleção, seguido do isolamento diferenciado dos produtos de seleção. A principal diferença entre a evolução de plantas e o melhoramento é que a seleção é predominantemente artificial nesse último e os objetivos e estratégias são definidos com base no conhecimento científico (Federizzi, 1998).

Pode-se dizer que o melhoramento de plantas como arte, praticado no início das civilizações, foi o responsável pela mudança de hábito das populações humanas primitivas do nomadismo para o sedentarismo, quando decidiram abandonar o extrativismo para iniciar o plantio dos tipos de plantas que lhes eram mais adequados. O fato de se plantar os tipos desejáveis provocou mudanças nas frequências alélicas das espécies escolhidas, embora toda a teoria do melhoramento de plantas só tenha progredido após os clássicos experimentos de Mendel e seus redescobrimientos no início do século passado.

Com o advento da teoria do melhoramento genético, a ciência passou a desempenhar papel fundamental no desenvolvimento de plantas de importância para a humanidade. Para os produtores, o melhoramento busca aumentar a produtividade das culturas, melhorar a uniformidade para permitir o uso de máquinas na colheita e no beneficiamento, adaptação a novos ambientes para permitir a expansão de fronteiras agrícolas, bem como resistência a doenças e pragas.

Nos dias atuais, com o propósito de atender a consumidores cada vez mais exigentes, as ações do melhoramento de plantas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de produtos com qualidades superiores, como alimentos com características nutricionais especiais (teor de proteínas, vitaminas, sais minerais, baixo teor de gordura) e sabores e aparência específicos; frutos sem sementes; fibras mais longas e resistentes; e, principalmente, preços competitivos, o que tem íntimo relacionamento com aspectos de produtividade e outros itens relevantes na redução de custos de produção. Todas essas características têm caráter decisivo no melhoramento de plantas, obrigando o melhorista a estabelecer uma estratégia de visão do futuro sobre o seu trabalho, principalmente enfocando os aspectos relacionados ao agronegócio (Queiroz, 2001).

As atividades dos melhoristas de plantas durante décadas foram responsáveis diretas pelo crescimento da agricultura brasileira. Como exemplo, a soja, uma espécie originalmente de clima temperado, pode ser cultivada atualmente de norte a sul do Brasil, com rendimentos até superiores aos obtidos por países setentrionais. A utilização de híbridos e variedades melhoradas de milho tem proporcionado produtividade nessa cultura nunca antes imagináveis. O café obteve em mais de 70 anos de pesquisa incrementos da ordem de 295% em produtividade das cultivares modernas, em relação aos materiais genéticos originais, introduzidos no Brasil. Em termos qualitativos, atualmente, hortaliças e frutos estão muito mais atrativos aos olhos dos consumidores, com melhores qualidades organolépticas, além de melhor conservação pós-colheita. Os melhoristas do algodoeiro conseguiram obter fibras mais longas, resistentes e até coloridas naturalmente. Todo esse processo é proporcionado por ações, na maioria das vezes, silenciosas de melhoristas de plantas, que dedicam a vida inteira a um árduo trabalho na expectativa de tornar a atividade agrícola mais eficiente sobre vários aspectos.

3.2 Caracterização molecular de genótipos

Todo indivíduo possui uma seqüência característica de nucleotídeos que compõe o conteúdo do seu DNA. A identificação de diferenças entre essas seqüências, por meio de marcadores moleculares, revela um padrão único, uma impressão digital genética, denominada DNA *fingerprint*, que pode ser utilizada para detectar diferenças e similaridades entre indivíduos.

O DNA *fingerprint* tem sido muito utilizado para revelar a diversidade genética dos acessos de bancos de germoplasma de várias espécies vegetais, fornecendo novas ferramentas para a conservação e utilização mais eficiente dos recursos genéticos pelos melhoristas (Etienne et al., 2002).

A caracterização molecular da diversidade genética entre os genótipos permite informações fundamentais para auxiliar os melhoristas na escolha de genitores, que poderão integrar esquemas de cruzamentos, visando à constituição de populações básicas no estabelecimento de esquemas de seleção. Tais cruzamentos são direcionados para maximizar a distância genética com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações favoráveis. Os marcadores moleculares geram grandes quantidades de informações que, combinadas às características morfoagronômicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos.

As informações moleculares a respeito da diversidade genética podem, ainda, auxiliar no direcionamento do enriquecimento da base genética durante o andamento de um programa de melhoramento, bem como na avaliação de redundância e deficiências das coleções de germoplasma, gerando informações sobre a eficiência do processo de coleta, manutenção e ampliação de um banco de germoplasma. Esses dados podem ser utilizados no estabelecimento de coleções nucleares de espécies (*core collection*), que podem minimizar a repetibilidade da diversidade genética recolhida ao banco de germoplasma da cultura e facilitar o acesso dos melhoristas a tais coleções (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

3.3 Desenvolvimento de mapas de ligação gênica

Os mapas genéticos ou mapas de ligação refletem a localização relativa de marcadores genéticos dentro de um determinado intervalo do DNA. Esses mapas têm um significado abstrato, pois a distância entre marcadores é estabelecida com base em padrões de herança ao invés de distâncias físicas (Green e Waterston, 1993). A construção de mapas genéticos envolve o estabelecimento da relação entre diferentes marcadores à medida que eles prosseguem através da meiose. Se dois conjuntos de marcadores estão presentes em cromossomos diferentes, eles distribuem-se ao acaso na meiose e, conseqüentemente, na próxima geração. Se, entretanto, os marcadores estão presentes no mesmo cromossomo, eles são herdados juntos, exceto quando ocorre recombinação durante a meiose. Quanto mais próximo os dois marcadores estiverem um do outro no cromossomo, menos provável será a ocorrência do evento de recombinação entre eles. Medindo-se a frequência de eventos de recombinação, é possível estimar a distância genética entre os marcadores e sua ordem relativa, permitindo, assim a construção de mapas genéticos.

Os mapas genéticos possibilitam a representação da ordem e da distância relativa entre os locos nos grupos de ligação. A distância genética é medida em termos de frequência de recombinação entre marcadores, que é transformada em distância de mapa (centiMorgans) por meio de algoritmos apropriados. A frequência de recombinação é variável entre diferentes regiões do cromossomo, entre tipos de cromossomos e entre espécies. Assim, mapas genéticos e físicos fornecem informações diferentes sobre o DNA. Os dois mapas são colineares em relação à ordem dos marcadores; entretanto, não existe relação simples entre frequências de recombinação (distâncias genéticas) e distâncias físicas.

O desenvolvimento de mapas de ligação genética é uma das aplicações de maior importância da tecnologia dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas, pois esses mapas podem ser usados para determinar a localização de genes responsáveis por caracteres simples e complexos. Para o caso de caracteres de herança simples, a identificação de marcadores ligados a genes que controlam tais características permite monitorar e acelerar a introgressão desses genes em

cultivares comerciais. Marcadores ligados a genes de interesse também podem fornecer um ponto de partida para a clonagem de genes baseada no mapa.

Outra aplicação dos mapas de ligação é determinar a localização dos genes nos cromossomos, fornecendo subsídios ao melhorista na escolha das melhores estratégias de ação e planejamento dos métodos de seleção. Em vista da localização dos genes no genoma, o melhorista vai definir, com mais segurança, por exemplo, quais genitores cruzar e qual o tamanho ideal das populações segregantes a serem manipuladas, que fornecerão maiores oportunidades para que os recombinantes de interesse sejam identificados nas populações de seleção.

3.4 Identificação de genes controlando características qualitativas

Os marcadores moleculares têm sido muito utilizados para a sinalização de regiões do genoma associadas a características monogênicas, principalmente resistência a pragas e doenças, valendo-se do fenômeno da ligação gênica. A identificação de genes que controlam características qualitativas de importância agrônômica pode auxiliar os programas de melhoramento, pela seleção indireta de tais características. Esse tipo de seleção tem aplicação em programas em que se pretende promover, por exemplo, a piramidação de genes de resistência a doenças, a qual é quase impossível de ser executada pelos métodos convencionais.

3.5 Mapeamento de genes controlando características quantitativas (QTLs)

A grande maioria dos caracteres de importância econômica está sob controle genético complexo, envolve a ação de vários genes, e é altamente influenciada pelas condições ambientais, sendo de difícil manipulação e compreensão. Esses locos são denominados locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs - *Quantitative Trait Loci*), sendo que, para a maioria desses caracteres existem poucas informações sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações entre os locos que controlam sua expressão. Com o uso de mapas genéticos e técnicas de mapeamento de QTLs é possível obter tais informações.

No mapeamento de QTLs há necessidade de se produzir mapas genéticos saturados com base em análise de grande número de marcadores. A seguir, esses marcadores são associados à distribuição fenotípica das diversas características de importância econômica e/ou agrônômica. Como se conhece a posição dos marcadores no genoma, aqueles que tiverem associados às características terão, em sua vizinhança, locos que controlam esses caracteres (Lee, 1995). Essas regiões, então, podem ser monitoradas e selecionadas em uma população ou transferidas para materiais-elite que não possuem os alelos favoráveis dessa região.

É importante salientar que os QTLs representam um avanço no conhecimento da herança das características. Em vez de conhecer essa herança, determina-se o controle genético dos componentes determinantes de tal característica, permitindo para cada QTL a localização genômica, a quantificação de seu efeito e o conhecimento da ação gênica. Além disto, permite-se determinar a existência ou não de epistasias, ou seja, de interações entre os distintos QTLs relacionados com uma determinada característica.

A análise de marcadores moleculares tem demonstrado que as características quantitativas podem ser condicionadas por QTLs com efeitos diferentes. O uso de mapas de ligação possibilita a identificação de QTLs que explicam proporções significativas das variações fenotípicas das características quantitativas estudadas. Uma aplicação imediata do mapeamento de QTLs em programas de melhoramento é a escolha de genitores com QTLs complementares, que terão maiores chances de manifestar efeitos heteróticos em combinações híbridas e de recombinações favoráveis nas gerações segregantes (Sakiyama, 1999).

3.6 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)

A seleção assistida por marcadores moleculares pode, potencialmente, acelerar o progresso genético pelo aumento na eficiência de seleção, redução no intervalo de gerações e identificação de quebra de ligações indesejáveis.

A SAM baseia-se na concepção de que é possível inferir a presença de um gene por meio da presença de um marcador fortemente ligado a esse gene. Inicialmente, são identificados marcadores moleculares ligados ao gene de interesse e por meio desses marcadores, a herança e a introgressão do gene pode ser analisada nos programas de melhoramento. Usando os marcadores é possível não só selecionar plantas que contêm os genes de interesse, mas também que carregam o mínimo do genoma do genitor doador (Kumar, 1999). O uso de marcadores moleculares possibilita a seleção de vários caracteres ao mesmo tempo, permite a identificação rápida de plantas geneticamente superiores em cada geração e reduz o tamanho da população a ser desenvolvida em cada geração, minimizando esforços e recursos nas avaliações.

O uso de marcadores visando introduzir resistência a doenças oferece a vantagem adicional de permitir a seleção para a resistência na ausência do patógeno ou de uma raça do patógeno (Kelly, 1995). A identificação de genes conferindo resistência a diferentes raças ou isolados de determinado patógeno pode também ser limitada pelas técnicas de inoculações tradicionais, que podem não detectar certas combinações de genes. Além disso, as raças discriminadas do patógeno podem não estar disponíveis aos melhoristas. Entretanto, esses genes de resistência desconhecidos e combinados em um único genótipo podem ser distinguidos uns dos outros por marcadores ligados a um dos genes. Mesmo quando as diferentes raças do patógeno estão disponíveis aos melhoristas, a identificação de linhagens que apresentam diferentes genes de resistência é limitada pela dificuldade de realização dos testes de inoculação com diferentes patógenos, em um mesmo indivíduo, e pelo efeito epistático desses genes. Os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência possibilitam a identificação dessas linhagens, bem como facilitam a piramidação desses genes em variedades de interesse (Alzate-Marin et al., 2001).

Atualmente, a seleção assistida por marcadores constitui-se na estratégia mais poderosa de uso dos marcadores para fins de melhoramento genético. Dentro dessa estratégia, pode-se incluir a transferência de um ou mais alelos de interesse de espécies selvagens para cultivares-elite. Considerando a diversidade genética presente na natureza e nos bancos de germoplasma, tais resultados oferecem grandes oportunidades para a pesquisa baseada na seleção assistida por marcadores. Um bom exemplo da utilização de SAM é a transferência de genes de resistência à antracnose do feijoeiro para cultivares suscetíveis a essa doença (Geffroy et al., 1998).

3.6.1 Retrocruzamentos assistidos por marcadores

A introgressão de genes via retrocruzamento assistido por marcadores é uma forma eficiente para incorporar um alelo desejado, de uma população doadora, em uma população comercial ou elite. Marcadores são usados para identificar e garantir a presença do alelo a ser introgridido e para selecionar contra o genoma remanescente do doador, pois este geralmente está associado com características não desejadas, excluindo o alelo em particular. Após algumas gerações de retrocruzamentos, a população retrocruzada é autofecundada para obtenção de indivíduos homocigotos para o alelo desejado.

A eficiência da seleção assistida por marcadores tem sido descrita para muitos genomas de plantas. Quando a expressão de uma característica de interesse é regulada por um único gene, ou por um gene responsável por grande parte da variação fenotípica, a transferência de uma única região genômica de um genótipo doador para um receptor pode significar grande aumento na característica considerada. Pela construção de um mapa alélico do genoma com marcadores moleculares,

as plantas com a melhor composição genômica podem ser eficientemente identificadas. O genoma de interesse deve conter o alelo responsável pela característica que está sendo introgridida e regiões não-alvo, carregando a maior proporção possível do genoma recorrente. Comparado com o retrocruzamento convencional, o uso de marcadores moleculares oferece duas vantagens: recuperação acelerada do genoma recorrente e seleção mais eficiente de genótipos que apresentam eventos de recombinação mais próximos aos genes alvo (Junghans, 2003).

Com o objetivo de medir a eficiência da SAM, foram feitas simulações em computador, utilizando *Coffea arabica* como modelo. A SAM foi utilizada para a escolha de 2% dos genótipos mais semelhantes geneticamente ao genitor recorrente, para integrar o próximo ciclo de retrocruzamentos. Observou-se que com apenas dois retrocruzamentos assistidos foi possível recuperar a mesma proporção do recorrente que seria alcançada na quinta geração, na ausência da seleção assistida (Fernandez e Lashermes, 2002).

Na realidade, pesquisas comprovam que a eliminação de segmentos de DNA do genótipo doador pode demandar muitas gerações. Muitos exemplos da transferência de caracteres indesejáveis ligadas ao gene-alvo durante a execução de programas de seleção são conhecidos. Em café arábica, mesmo após seis gerações de retrocruzamentos, é esperado persistir uma região de aproximadamente 32cM flanqueando o gene-alvo. Nos genomas de muitas plantas, 32cM é DNA suficiente para conter centenas de genes. Marcadores de DNA poderiam ser utilizados para eliminar, ou pelo menos reduzir, significativamente, a transferência de características indesejáveis. Essas poderiam ser identificadas nos indivíduos recombinantes raros, os quais, usualmente, são selecionados apenas por chance no melhoramento clássico (Fernandez e Lashermes, 2002).

3.6.2 Piramidação de genes de resistência

Pode-se definir piramidação como o acúmulo de genes em uma linhagem ou variedade (Milach e Cruz, 1997), ou ainda, como a introgressão de vários genes de resistência em uma única variedade (Borém, 2001). A piramidação de genes tem sido sugerida como uma estratégia potencial para manter a resistência a doenças por um longo período, ou seja, para aumentar a durabilidade da resistência.

Apesar de considerada importância em programas de melhoramento visando resistência a doenças, a estratégia de piramidação não tem sido muito aplicada, devido a algumas dificuldades. Segundo Pedersen e Leath (1988), combinar três ou quatro genes em uma única variedade e manter outras características superiores não é um trabalho simples. Como o processo de piramidação requer a combinação de múltiplos genes de resistência, é muito difícil, por métodos convencionais de avaliação, diferenciar cada gene em um só indivíduo (Michelmore, 1995). Se vários genes são incorporados e todos conferem resistência completa ao mesmo patógeno, a presença de um fator de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais (Milach e Cruz, 1997). Uma série de cruzamentos-teste e de inoculações múltiplas podem ser necessárias para determinar a presença dos genes, o que torna o processo muito trabalhoso (Huang et al., 1997; Geffroy et al., 1998).

Tais limitações dificultaram, no passado, o uso da piramidação como alternativa ao melhoramento para resistência durável. Entretanto, a possibilidade de usar marcadores moleculares para monitorar a presença de gene de resistência em um genótipo levantou novamente a questão do uso dessa estratégia no melhoramento visando à resistência a doenças. A utilização de marcadores de DNA fortemente ligados a genes de resistência, permite que as progênies que contêm os genes desejáveis sejam identificadas. Uma vez que os genes que conferem resistência ao mesmo patógeno são identificados por meio dessa técnica, eles poderiam ser facilmente acumulados em um genótipo, via seleção assistida por marcadores moleculares. Dessa forma, os marcadores moleculares eliminariam a necessidade da realização de cruzamentos-teste e avaliação da segregação.

Além disso, esses marcadores podem aumentar a velocidade de recuperação do fenótipo do genitor recorrente no processo de retrocruzamento. Por esses motivos, a seleção assistida por marcadores moleculares possui grande potencial de utilização para a piramidação de genes de resistência. À medida que o uso desses marcadores se tornar rotineira nos programas de melhoramento, a estratégia de piramidação poderá ser mais amplamente aplicada.

3.6.3 Seleção assistida para características quantitativas

As características agrônômicas de maior importância são complexas e reguladas por muitos genes de pequeno efeito (QTLs). São denominadas características poligênicas ou quantitativas. Comparado com característica mais simples, controlada por um ou poucos genes, o melhoramento de características poligênicas, por meio da seleção assistida, levanta maiores questionamentos, como demonstrado pela abundância de estudos com base em simulações de computador e escassez de dados publicados sobre esse assunto. Para a SAM ser efetiva, são necessárias estimativas confiáveis da posição e efeito do QTL. Maior poder, precisão e acurácia só podem ser obtidos pela análise de grandes populações, usando um conjunto de marcadores com boa cobertura do genoma e valores fenotípicos obtidos de experimentos em diferentes ambientes.

A dificuldade de manipular características quantitativas está relacionada à sua complexidade genética - principalmente o número de genes envolvidos na sua expressão e as interações entre eles (epistasia). Como muitos genes estão envolvidos na expressão de características poligênicas, geralmente apresentam pequenos efeitos individuais no fenótipo. Esse fato implica que muitas regiões devem ser manipuladas ao mesmo tempo no sentido de obter impacto significativo, e que o efeito de regiões individuais não é facilmente identificado. Por essa razão, experimentos com repetição são necessários para caracterizar com acurácia os efeitos de QTLs e para avaliar sua estabilidade em diferentes ambientes.

Uma questão importante que merece atenção é como aumentar a eficiência da SAM de características quantitativas por meio da melhor caracterização de genes alvos. Felizmente, experimentos de campo e métodos estatísticos para mapeamento de QTLs têm sido progressivamente desenvolvidos durante a última década. Com os recentes métodos matemáticos, tais como mapeamento por intervalo composto, dados de campo oriundos de diferentes ambientes podem ser integrados em análise conjunta, para avaliar a interação Q x A e identificar os QTLs estáveis em diferentes ambientes. Além disso, quando combinados com um mapa de ligação detalhado, o mapeamento por intervalo composto permite uma identificação precisa do QTL no genoma e melhor identificação de QTLs adjacentes (QTLs ligados cujos alelos favoráveis são provenientes da mesma linhagem parental), além do efeito do QTL, ou seja, quanto da variação fenotípica é explicada pelo mesmo (Junghans, 2003).

4. PERSPECTIVAS DOS PROJETOS GENOMA NA IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES

Nos últimos anos, termos como genômica e bioinformática têm invadido as pesquisas em biologia, genética e melhoramento. Essa revolução está ligada a importantes progressos nos métodos e tecnologias que permitem o sequenciamento de DNA em grande escala.

Na era da genômica em plantas, um dos objetivos é buscar, no melhoramento, manipulações genéticas dirigidas, aumentando a eficiência de obtenção de variedades bem sucedidas. Essa nova revolução anuncia a obtenção de variedades resistentes a múltiplas doenças, mais adaptadas e produtivas, o que deve diminuir dramaticamente as perdas na agricultura, além de permitir o apro-

veitamento de solos até então não utilizáveis (Souza e Silva, 2002). Outro enfoque da genômica é buscar informações para melhorar a qualidade dos grãos e sementes, visando agregar valores aos produtos agrícolas.

As informações obtidas nos Projetos Genoma são úteis para o melhoramento de plantas e, conseqüentemente para a agricultura, pois permitem: (a) gerar novos e eficientes marcadores moleculares, que poderão ser usados para seleção assistida; (b) gerar informações que visam direcionar as manipulações genéticas nos programas de melhoramento; (c) clonar genes, permitindo incluir a engenharia genética entre as estratégias do melhoramento; e (d) gerar informações básicas.

O desenvolvimento de poderosos marcadores de DNA como os Microssatélites e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) tem sido beneficiado com a era da genômica, pois a identificação desses marcadores têm sido facilitada e viabilizada pelo seqüenciamento do DNA.

Os SNPs correspondem a posições do DNA onde existe uma alternância dos nucleotídeos, em uma freqüência alélica mínima de 1% em uma dada população (Brookes, 1999). Essas variações de ponto ocorrem com alta freqüência no genoma, sendo estimado um SNP a cada 600 bases. Essa alta freqüência possibilita a marcação próxima ou até mesmo no loco gênico de interesse, tornando o SNP um poderoso marcador de DNA. Com a era da genômica, a maior parte dos estudos que visam à identificação de SNPs em larga escala tem explorado as milhares de seqüências presentes nos bancos de dados. Os bancos de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tag*, ou Etiquetas de Seqüências Expressas) têm um elevado grau de redundância, e o fato de as seqüências serem derivadas de tecidos de vários indivíduos torna a utilização desses bancos muito promissora para a identificação de polimorfismos (Guimarães e Costa, 2002).

Outro marcador molecular beneficiado com o seqüenciamento em larga escala é o Microssatélite. Esses marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido a sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de seu uso, rapidez, grande poder de resolução, co-dominância e altos níveis de polimorfismo.

Apesar das vantagens apresentadas, relativamente poucos marcadores microssatélites estão disponíveis para plantas. A grande limitação da tecnologia está no desenvolvimento desses marcadores, que envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo. No entanto, a disponibilidade de milhares de seqüências, geradas pelos projetos genoma, tem proporcionado oportunidade de desenvolver esses poderosos marcadores de forma direta e simples, por meio de análise eletrônica (*data mining*). Com o auxílio de recursos computacionais, as seqüências depositadas nos bancos são analisadas, os microssatélites identificados e os oligos, que flanqueiam os microssatélites, são desenhados. Uma vez desenvolvidos, eles podem ser utilizados com as vantagens e a rapidez típica da técnica de PCR.

O conhecimento de seqüências de DNA permite, ainda, o desenvolvimento de um conjunto de oligos específicos, que correspondem a genes de interesse. Esses oligos são utilizados em uma simples reação de PCR para detectar seus respectivos genes, simplificando e otimizando o uso dos marcadores moleculares como ferramenta auxiliar no melhoramento.

Os oligos específicos e os novos marcadores moleculares obtidos a partir das seqüências dos Projetos Genoma podem ser utilizados em várias etapas do melhoramento, como: (a) conservação de germoplasma; (b) caracterização de germoplasma para identificar genes envolvidos em processos específicos, determinar variabilidade genética disponível, determinar a distância genética entre possíveis genitores e escolha dos mesmos para cruzamentos e formação de populações; (c) seleção assistida por marcadores; (d) *fingerprinting* de cultivares desenvolvidas e recomendadas, principalmente aquelas em que impraticável sua identificação apenas pela diferenciação de atributos fenotípicos morfoagronômicos; (e) monitorar a pureza genética das sementes produzidas e distribuídas aos produtores; e (f) proteção de variedades.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos trabalhos já foram feitos empregando os marcadores moleculares no estudo de diversidade entre genótipos e, principalmente, na identificação de grande número de genes ou regiões genômicas de interesse. Apesar disso, pouco se sabe da contribuição efetiva dos marcadores para o melhoramento. Pode-se considerar que essa situação é em decorrência de os marcadores moleculares estarem sendo utilizados ainda há pouco tempo. Como se sabe, o desenvolvimento dos métodos de melhoramento para atingir o nível de eficiência que conhecemos hoje gastou cerca de um século. Então, é necessário mais tempo para que os marcadores venham a ser mais eficientemente utilizados para auxiliar os programas de melhoramento.

A distância entre a geração de informação e sua utilização prática normalmente é grande em qualquer ramo da ciência, fato especialmente verdadeiro no caso de utilização de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. As razões para tal podem ser atribuídas ao fato que a maior parte das pesquisas é realizada pelo setor privado, que não disponibiliza os resultados, e também porque o melhorista (público ou privado) não é recompensado pelo método que utiliza, mas sim pelo resultado alcançado.

Vários tipos de marcadores moleculares estão hoje disponíveis diferenciando-se quanto à sua habilidade em detectar polimorfismo, custo de aplicação, facilidade de uso e consistência de resultados. Eles têm sido utilizados em estudos de diversidade genética, *fingerprinting*, análises de pureza genética de sementes, melhoramento assistido, mapeamento genético, isolamento de genes e outros. Não há mais dúvidas que a tecnologia de marcadores moleculares está madura e já pode ser utilizada em várias fases do melhoramento genético vegetal. Certamente, os melhoristas vão adotar rapidamente qualquer aplicação de marcadores moleculares que venha melhorar a eficiência de seleção e diminuir custos em seus programas de melhoramento. Estamos entrando na "Era Biológica" do melhoramento vegetal, e o grande desafio será incorporar essas novas tecnologias nos programas, cuja alta eficiência baseada em décadas de atividades organizadas é difícil de ser penetrada e modificada. É inquestionável que a tecnologia dos marcadores moleculares tem evoluído de maneira muito rápida nos últimos 15 anos, impactando de maneira surpreendente o conhecimento básico da genética molecular. Esse conhecimento básico gerado tem que ser agora testado, visando acessar sua aplicação prática nas diferentes etapas do melhoramento genético convencional.

Os importantes avanços que têm sido obtidos nas técnicas de biologia molecular de plantas, nos últimos anos, poderão beneficiar os melhoristas das diversas culturas vegetais e oferecer novas possibilidades para a obtenção de cultivares superiores. O desenvolvimento de marcadores moleculares em café, por exemplo, tem oferecido perspectivas para o melhoramento visando a resistência a estresses bióticos (pragas e doenças) e abióticos, principalmente frio, seca e solos de baixa fertilidade natural e elevada acidez. A abordagem dos marcadores de DNA também poderá facilitar a obtenção de cultivares de café com melhores características bioquímicas e físicas do grão, relativa à qualidade de bebida, e, por fim, aspectos ligados à colheita mecânica. A integração da seleção assistida por marcadores aos programas de melhoramento genético do cafeeiro promete incrementar de maneira significativa a eficiência desses programas, pelos seguintes aspectos: (1) possibilitar a seleção em estágios precoces e de um grande número de progênies; (2) reduzir o número de ciclos de retrocruzamentos requeridos para restaurar a qualidade dos cultivares tradicionais; e (3) combinar em uma única etapa a seleção para diferentes características ou a incorporação de vários genes de resistência.

REFERÊNCIAS

- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Pittsburgh, v.133, p.1131-1139, 1992.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, n.2, p.125-133, 2001.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 3ª edição, 2001. 500p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.H.; DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314-331, 1980.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, Orlando, v.234, n.2, p.177-186, 1999.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. 2002. 90f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa.
- CREGAN, P.B.; MUDGE, J.; FICKUS, E.W. et al. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p.919-928, 1999.
- ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S. et al. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Charlotte, v. 38, p.129-138, 2002.
- FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998. p.3-15.
- FERNANDEZ, D.; LASHERMES P. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. In: JAIN, S. M.; BRAR, D.S.; AHLOOWALIA, B.S. (Eds.). **Molecular techniques in crop improvement**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2002, p. 327-346.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SÉVIGNAC M.; ADAM-BLONDON, A.F.; BANNEROT, H.; GEPTS, P.; DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p.494-502, 1998.
- 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**, Washington, v.296, p.92-100, 2002.

- GREEN, E.D.; WATERSTON, R.H. O projeto do genoma humano: perspectivas e implicações para a medicina clínica. **Suplemento JAMA**, v.3, n.8, p.969-990, 1993.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.715-740.
- GUIMARÃES, P.E.M.; COSTA, M.C.R. SNPs: sutis diferenças de um código. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.26, p.24-27, 2002.
- HUANG, N.; ANGELES, E.R.; DOMINGO, J.; MAGPANTAY, G.; SINGH, S.; ZHANG, G.; KUMARAVADIVEL, N.; BENNETT, J.; KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, n.3, p.313-320, 1997.
- JUNGHANS, D.T. Seleção assistida por marcadores (Mesa redonda). In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **CD-Rom**. Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. Arquivo: mesa 7 coord.pdf.
- KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n.3, p.461-465, 1995.
- KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v.17, p.143-182, 1999.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Agronomy Journal**, Madison, v. 55, p.265-344, 1995.
- LIN, C.; MUELLER, L.A.; MCCARTHY, D.C.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S.D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, n.1, p.114-130, 2005.
- MCCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p.89-99, 1997.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, Tucson, v.15, p.393-427, 1995.
- MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.4, p.685-689, 1997.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a *polymerase catalysed* chain reaction. **Methods in Enzymology**, St. Louis, v. 55, n.2, p.335-350, 1987.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p.985-993, 1993.
- PEDERSEN, W.L.; LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, Tucson, v.26, p.369-378, 1988.
- QUEIRÓZ, M.A. Melhoramento genético no Brasil: realizações. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.1-28.
- ROSSINI, L.; VECCHIETTI, A.; NICOLOSO, L.; STEIN, N.; FRANZAGO, S.; SALAMINI, F.; POZZI, C.; Candidate genes for barley mutants involved in plant architecture: an *in silico* approach. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, n.6, p.1073-1085, 2006.

SAKIYAMA, N. S. Marcadores de DNA para melhoramento do cafeeiro. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, III, 1999, Londrina. **Anais**. IAPAR/IRD, 1999. p.115-119.

SOUZA, G.M.; SILVA, A.M. SUCAST: Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biociência**, Brasília, n.25, p.58-63, 2002.

THE INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (IRGSP). The map-based sequence of the rice Genome. **Nature**, London, v.436, p.793-800, 2005.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary oligos are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

Instituto Agrônômico

Centro de Comunicação e Transferência do Conhecimento

Avenida Barão de Itapura, 1.481

13020-902 Campinas (SP) - BRASIL

Fone: (19) 3231-5422 (PABX)

Fax: (19) 3231-4943

www.iac.sp.gov.br



**SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**



**GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO**
TRABALHANDO POR VOCÊ