

# Utilização de Marcadores Moleculares em Programas de Ampliação da Base Genética de Espécies Cultivadas

## **República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

## **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

## **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa**

### **Conselho de Administração**

*José Amauri Dimarzio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Sérgio Fausto*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

### **Diretoria Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Gustavo Kauark Chianca*

Diretores-Executivos

### **Embrapa Arroz e Feijão**

*Pedro Antonio Arraes Pereira*

Chefe-Geral



ISSN 1678-9644

Dezembro, 2003

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## *Documentos 155*

# **Utilização de Marcadores Moleculares em Programas de Ampliação da Base Genética de Espécies Cultivadas**

Claudio Brondani  
Rosana PereiraVianello Brondani  
Paulo Hideo Nakano Rangel

Santo Antônio de Goiás, GO  
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Arroz e Feijão**

Rodovia Goiânia a Nova Veneza Km 12 Zona Rural

Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 533 2110

Fax: (62) 533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

Presidente: *Carlos Agustin Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membros: *Péricles de Carvalho Ferreira Neves*

*Rosângela Bevitori*

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*

Capa: *Luiz Antonio Passos*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

### **1ª edição**

1ª impressão (2002): 500 exemplares

### **Todos os direitos reservados.**

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Arroz e Feijão

---

Brondani, Claudio.

Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas / Claudio Brondani, Rosana Pereira Vianello Brondani, Paulo Hideo Nakano Rangel. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 36 p. – (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 155)

1. Melhoramento Genético – Banco de Germoplasma. 2. Análise Genômica – Método de Aplicação. 3. Marcador Molecular. Brondani, Rosana Pereira Vianello. II. Rangel, Paulo Hideo Nakano. III. Título. IV. Embrapa Arroz e Feijão. V. Série.

CDD 631.5233 (21. ed.)

---

© Embrapa 2002

# **Autores**

## **Claudio Brondani**

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Molecular  
Embrapa Arroz e Feijão, Rod. Goiânia Nova Veneza,  
Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás - GO  
brondani@cnpaf.embrapa.br

## **Rosana Pereira Vianello Brondani**

Engenheira Agrônoma, Doutora em Biologia Molecular  
Embrapa Arroz e Feijão  
rosanavb@cnpaf.embrapa.br

## **Paulo Hideo Nakano Rangel**

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhora-  
mento de Plantas, Embrapa Arroz e Feijão  
phrangel@cnpaf.embrapa.br



# Apresentação

Os programas de melhoramento genético do arroz no mundo todo são baseados na utilização de um número reduzido de genitores com arquitetura moderna e diversos atributos agronomicamente desejáveis, resultantes de décadas de seleção genética. Contudo, a obtenção destes genitores tem conduzido a um processo de estreitamento da base genética disponível para o programa de melhoramento. Com a redução da variabilidade genética, reduz-se também o ganho genético por ciclo de seleção.

Paradoxalmente a esta situação, a cultura do arroz possui um dos maiores acervos de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma, e que podem ser integrados nos programas de seleção genética visando o lançamento de cultivares melhoradas. A utilização conjunta de técnicas de análise genômica e metodologias clássicas de cruzamento e seleção, tem sido apontada freqüentemente como a melhor alternativa para entender e explorar a variabilidade genética de plantas de interesse econômico.

Este documento procura contribuir neste sentido, trazendo exemplos práticos do emprego de metodologias de análise genômica na Embrapa Arroz e Feijão, e que estão sendo aplicadas com sucesso na administração dos recursos genéticos do Banco de Germoplasma e no programa de melhoramento genético do arroz.

*Pedro Antonio Arraes Pereira*  
Chefe-Geral da Embrapa Arroz e Feijão



# Sumário

<b>Introdução</b> .....	<b>11</b>
Utilização de germoplasma em programas de melhoramento genético	12
<b>Determinação da variabilidade genética em acessos do banco de germoplasma</b> .....	<b>13</b>
Cruzamentos amplos .....	15
Marcadores moleculares no melhoramento de plantas .....	15
Obtenção de mapas moleculares .....	16
Mapeamento de QTLs .....	18
Análise de AB-QTLs .....	21
Seleção assistida por marcadores .....	26
<b>Considerações Finais</b> .....	<b>29</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>30</b>



# Utilização de Marcadores Moleculares em Programas de Ampliação da Base Genética de Espécies Cultivadas

---

*Claudio Brondani*

*Rosana Pereira Vianello Brondani*

*Paulo Hideo Nakano Rangel*

## Introdução

A grande maioria das espécies cultivadas possuem limitada variabilidade genética, decorrente principalmente da utilização de germoplasma muito aparentado como genitores nos programas de melhoramento, resultando no estreitamento da base genética das populações para a obtenção de novas cultivares e, conseqüentemente, diminuindo os ganhos genéticos com a seleção (Cooper et al., 2001). O nível de diversidade genética varia muito de espécie para espécie, desde a alta homogeneidade das linhas puras de espécies autógamas, como arroz, trigo, tomateiro e soja, até a alta variabilidade em espécies alógamas florestais, como o eucalipto. Em teoria, quanto menor a variabilidade genética, menores os ganhos genéticos com a seleção (Falconer, 1987). A perda de diversidade genética faz parte da história evolucionária durante a domesticação de grande parte das espécies vegetais cultivadas, seja por interferência do homem ou por seleção natural. Para todos os cultivos, os melhoristas têm utilizado somente uma fração dos recursos genéticos de plantas que estão disponíveis, e os ganhos obtidos até hoje são devidos justamente à exploração desta variabilidade genética limitada. Com o passar do tempo, os aumentos nos ganhos por seleção só serão possíveis se a variabilidade genética adicional for introduzida nas populações de melhoramento. A diversificação proveniente da ampliação da base genética permite o surgimento de novas combinações alélicas e adaptações a ambientes específicos, podendo proporcionar, por exemplo, uma redução da vulnerabilidade a doenças e insetos e maior estabilidade da produção.

Dentre os métodos de melhoramento, duas estratégias são particularmente importantes para maximizar a variabilidade genética: a) Seleção recorrente, que consiste na sintetização de uma população base geneticamente divergente, seleção dos melhores genótipos e recombinação para formar a nova população melhorada, e esta, por sua vez, poderá ser utilizada para iniciar um novo ciclo de seleção (Geraldi, 1997); e b) Cruzamentos amplos, envolvendo normalmente um genótipo elite e um genótipo exótico, que inclui todo material não-adaptado ou não-comercial (variedades antigas e espécies silvestres, parentes de espécies cultivadas) e que podem ser utilizados como fonte de novos genótipos para o melhoramento (Dekkers & Hospital, 2002). Neste caso, são necessários dois a três retrocruzamentos utilizando o genitor elite como parental recorrente, a fim de produzir uma progênie sem as características indesejáveis do germoplasma exótico. O produto final das duas metodologias é a obtenção de linhas puras que podem ser lançadas como novas cultivares, ou utilizadas como genitores em cruzamentos dentro do programa de melhoramento genético da cultura. A utilização de cruzamentos amplos em programas de melhoramento já foi reportada em diversas espécies, como tomateiro (Rick, 1969), pepineiro (Owens et al., 1985) e feijoeiro (Schettini et al., 1987).

## Utilização de germoplasma em programas de melhoramento genético

Como ponto essencial para os esforços de ampliação da base genética, Harlan & DeWet (1971) dividiram os recursos genéticos de uma espécie em três conjuntos gênicos, de acordo com a sua facilidade de uso para o melhoramento. O conjunto gênico primário refere-se ao germoplasma em que a recombinação é facilmente obtida mediante o cruzamento com a espécie cultivada, incluídas as variedades tradicionais e espécies silvestres mais próximas. O conjunto gênico secundário inclui espécies que apresentam certa dificuldade de fornecerem híbridos férteis com o germoplasma cultivado, e refere-se a espécies silvestres mais distantes e também espécies de outros gêneros. O conjunto gênico terciário refere-se a germoplasma cuja hibridação com o germoplasma cultivado só é possível mediante resgate de embriões ou outras técnicas, e inclui espécies do mesmo gênero, mas distantes, e também espécies de outros gêneros. Para exemplificar, o gênero *Oryza* possui duas espécies cultivadas, *O. sativa*, arroz cultivado no mundo todo, e *O. glaberrima*, cultivado em uma região

restrita da África, além de 21 espécies silvestres. O conjunto gênico primário do gênero *Oryza* inclui os dois cultigens e mais seis espécies silvestres, todas contendo o genoma diplóide AA. O conjunto gênico secundário inclui espécies contendo os genomas diplóides BB, CC, EE e FF, e os tetraplóides BBCC e CCDD. O conjunto gênico terciário inclui os genomas GG e HHJJ (Khush, 1997).

### *Determinação da variabilidade genética em acessos do banco de germoplasma*

Em geral, uma coleção de germoplasma é inicialmente caracterizada por descritores fenotípicos que sejam altamente herdáveis, que podem ser facilmente mensuráveis e que sejam expressos em todos os ambientes. Estas características incluem altura de plantas, morfologia da folha, cor de flor, dentre outras. Características quantitativas de interesse agrônomo, por serem geneticamente complexas e com pronunciado efeito da interação genótipo por ambiente, são caracterizadas em uma etapa posterior, geralmente quando se necessita identificar genótipos que possuam genes úteis para o melhoramento, tais como os relacionados à produção, qualidade de grãos, resistência a doenças ou tolerância a estresses abióticos. Marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados na caracterização de genótipos de plantas (Powell et al., 1995; Blair et al., 2002; Ni et al., 2002). Porém, um dos riscos de serem utilizados isoladamente na escolha de genótipos para o programa de melhoramento é que os marcadores são neutros, ou seja, o padrão molecular de determinado genótipo é o mesmo, independentemente do ambiente, sendo que para a maioria dos genes envolvidos na expressão de características quantitativas, o ambiente é determinante para a expressão ou não desses genes. Assim, quando confrontados os dados genotípicos com os dados fenotípicos, não necessariamente os mesmos genótipos serão categorizados como idênticos. Em suma, os marcadores moleculares dão uma idéia aproximada da variabilidade genética ao nível de genoma estrutural, mas para a maximização dessa variabilidade para uso no melhoramento, é fundamental que os genótipos sejam também caracterizados em ambientes preferencialmente contrastantes. A razão para esta discrepância é que os marcadores moleculares refletem padrões evolucionários e estes não acompanham necessariamente a pressão de seleção imposta por programas de melhoramento e agricultores, ou seja, o fenótipo selecionado não é neutro (FAO, 1998).

O conjunto das informações de descritores fenotípicos, características quantitativas de interesse agrônômico e de marcadores moleculares são de fundamental importância na determinação da variabilidade genética de bancos de germoplasma e no planejamento de programas de melhoramento genético. Esta metodologia vem sendo empregada com sucesso em cevada (Macaulay et al., 2001) e está em fase de implementação na Embrapa Arroz e Feijão, utilizando os acessos da coleção nuclear brasileira do arroz (Abadie et al., 2002). A coleção nuclear brasileira de arroz consiste em 550 genótipos, divididos em três grupos: variedades tradicionais (308 acessos), material melhorado no Brasil (94 acessos) e material introduzido (148 acessos) e está sendo caracterizada fenotipicamente para características de interesse agrônômico em cinco locais (Boa Vista – RR, Santo Antônio de Goiás – GO, Goianira – GO, Alegrete – RS e Pelotas – RS), além da caracterização genotípica por marcadores moleculares microssatélites (Figura 1). Coleções nucleares representam uma amostra da coleção completa de germoplasma de uma cultura, na qual se procura representar o máximo da variabilidade genética,



com um mínimo de genótipos geneticamente semelhantes (Frankel, 1984). A caracterização genotípica pode ser utilizada para estimar o grau de relacionamento genético entre diferentes acessos e auxiliar a administração de coleções inteiras de germoplasma ou de coleções nucleares, a partir da detecção de duplicatas, ou no processo de decisão sobre a inclusão de novos acessos a estas coleções, com a finalidade de maximizar a variabilidade disponível para uso de programas de melhoramento genético.

**Fig. 1.** Genótipos da coleção nuclear brasileira de arroz.

## Cruzamentos amplos

A principal causa apontada para a estagnação dos patamares de produtividade da maioria das espécies anuais de interesse comercial tem sido a utilização de um número reduzido de genitores nos programas de cruzamentos. É pouco provável que cultivares e linhagens elite possuam todos os genes favoráveis. Durante o processo de domesticação, somente uma pequena proporção da diversidade de populações silvestres foi selecionada, direcionando assim o processo evolutivo das espécies cultivadas. Portanto, muito da diversidade genética presente em bancos de germoplasma, principalmente o germoplasma exótico (espécies silvestres parentes de espécies cultivadas e variedades tradicionais), pode ser de extrema importância para o melhoramento (Tanksley & McCouch, 1997; Xiao et al., 1998). Assim, através de cruzamentos amplos, existe a possibilidade de se promover o resgate de alelos raros para serem introgrididos no germoplasma elite, possibilitando com isto a ocorrência de novas combinações alélicas. Contudo, a maioria dos programas de melhoramento não utilizam germoplasma não-adaptado devido ao efeito negativo ocasionado pela introdução de alelos deletérios e quebra dos complexos gênicos de genótipos elite obtidos através de várias gerações de seleção. A implementação de programas de pré-melhoramento pode ser uma alternativa importante para contornar este problema e consiste no desenvolvimento de linhagens com genes introduzidos de germoplasma exótico, ou populações inteiras onde exista a seleção e recombinação de genes ou blocos gênicos inteiros, de onde possam ser selecionadas linhagens. Estas, então, serão utilizadas como genitores em programas de melhoramento genético. Uma ampla série de fatores como platô de produtividade, base genética estreita, falta de genes de tolerância a estresses bióticos e abióticos devem ser considerados para decidir se o germoplasma elite de uma cultura requer a introdução de nova variabilidade genética (Spillane & Gepts, 2001).

## Marcadores moleculares no melhoramento de plantas

O desenvolvimento de marcadores de DNA proporcionou um grande impulso para a determinação da variabilidade genética dentro e entre espécies de um mesmo gênero, determinação da conservação e ordem de genes em espécies de gêneros diferentes (sintenia) e em estudos genômicos mais elaborados, como a identificação de genes específicos. A primeira técnica de visualização de fragmentos de DNA foi descrita por Southern (1975), derivando na técnica conhecida por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, (Botstein et al., 1980), que consiste na detecção de

polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA entre os indivíduos analisados.

Com o surgimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction; Mullis & Faloona, 1987), aliou-se o poder de informação gerada por marcadores moleculares e a rapidez da técnica baseada em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA mediados pela enzima DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinado pelo anelamento de *primers* (seqüência de nucleotídeos de tamanho pequeno, variando geralmente entre 20 a 30 bases) específicos de seqüências complementares a estes pontos. Várias outras técnicas utilizam o princípio da técnica de PCR, tais como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams et al., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Zabeau & Vos, 1993) e SSR (Simple Sequence Repeats; Weber & May, 1989), também conhecidos como microssatélites. Esta última classe de marcadores tem sido utilizada amplamente em análise genética, uma vez que se baseia na detecção da variação existente em locos de seqüências repetitivas (di-nucleotídeos AG/TC ou tri-nucleotídeos ATT/TAA, por exemplo). As seqüências que flanqueiam estes locos são mais conservadas, permitindo que *primers* específicos a elas sejam sintetizados e utilizados para amplificar especificamente esta região via PCR. Existem dois modos de serem obtidos marcadores SSR: o primeiro, através do desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas para seqüências microssatélites, seqüenciamento dos clones contendo o DNA repetitivo e, finalmente, o desenho dos *primers* complementares às seqüências flanqueadoras do DNA repetitivo; e o segundo, através da informação gerada por projetos de seqüenciamento genômico de uma espécie. Os marcadores microssatélites são altamente informativos, permitindo detectar polimorfismo molecular com grande eficácia. Por exemplo, estudos de diversidade alélica têm documentado mais de 25 alelos por loco entre diferentes acessos de arroz cultivado (McCouch et al., 1997). Olufowote et al. (1997) discriminaram 71 linhagens de arroz geneticamente relacionadas com apenas seis marcadores SSR.

### ***Obtenção de mapas moleculares***

A construção de mapas moleculares envolve a obtenção de uma população segregante, a análise com marcadores moleculares em cada um dos indivíduos desta população e a utilização de programa computacional apropriado para agrupar e ordenar os marcadores localizados em um mesmo cromossomo ou

grupo de ligação. Deste modo, um mapa genético nada mais é do que um modelo de arranjo linear ordenado de um grupo de genes ou marcadores. Se dois ou mais marcadores estão localizados próximos em um mesmo cromossomo, os respectivos alelos para cada cromossomo do par de homólogos serão na maioria das vezes herdados juntos durante a meiose. Os programas computacionais estimam todas as combinações de ligação de locos, dois a dois, através da comparação das frequências haplotípicas observada e esperada. A técnica de máxima verossimilhança é a mais utilizada para estimar a fração de recombinação a partir das frequências haplotípicas observadas. Em seguida, os marcadores são agrupados em diferentes grupos de ligação, utilizando critérios como fração de recombinação e o nível de significância da fração de recombinação, e finalmente, é determinada a posição relativa dos marcadores dentro de cada grupo de ligação (Lander et al., 1987; Liu, 1998). Cada população de mapeamento fornece diferentes distâncias entre marcadores de um grupo de ligação, resultante de uma maior ou menor taxa de recombinação entre os locos. O principal critério para a escolha dos parentais para obtenção de uma população segregante na construção de mapas moleculares é que eles devem possuir características fenotípicas contrastantes, a fim de aumentar a probabilidade de serem encontrados marcadores moleculares polimórficos relacionados com as diferenças alélicas dos parentais em um loco cromossômico, permitindo observar a segregação destes marcadores na progênie e a construção do mapa de ligação. Em arroz, cuja base genética é estreita, os mapas genéticos envolvem na maioria das vezes o cruzamento entre as subespécies *Oryza sativa* subespécie *indica* e *O. sativa* subespécie *japonica* (Harushima et al., 1998), ou cruzamentos interespecíficos, como, por exemplo, envolvendo as espécies *O. sativa* e *O. glumaepatula* (Brondani et al., 2001).

Populações F2 e de retrocruzamento e linhagens recombinantes (Recombinant Inbred Lines, RILs) são os tipos de populações mais utilizadas para a construção de mapas moleculares. Uma população F2 é desenvolvida pela autofecundação dos indivíduos F1, os quais são obtidos pelo cruzamento de dois parentais que mostram um polimorfismo significativo para qualquer tipo de marcador que está sendo avaliado. Populações de retrocruzamento são desenvolvidas pelo cruzamento do híbrido F1 com um dos parentais utilizados no cruzamento inicial. A maior limitação para se utilizarem populações F2 ou de retrocruzamento é que elas não são eternas, a não ser que cada indivíduo seja mantido via propagação vegetativa, como realizado por Li et al. (2000), que mantiveram, por dois anos, 250 plantas F2 de arroz, para posteriormente conduzir a análise de

QTLs. Populações de RILs são derivadas de autofecundações sucessivas (oito a nove ciclos), obtendo-se, ao final do processo, uma série de linhagens de cada planta F2 original. Apesar de ser bastante trabalhoso obter uma população RIL, estas são extremamente úteis para a análise genética, por terem fixado os eventos de recombinação, originando um mapa de ligação que pode servir como referência para análises de QTLs para várias características, locais e anos, aumentando a confiabilidade dos resultados. De modo semelhante, porém com maior rapidez e economia, plantas totalmente homocigotas podem ser obtidas a partir da duplicação cromossômica do genoma haplóide contido nos grãos-de-pólen, resultando plantas duplo-haplóides.

### ***Mapeamento de QTLs***

A disponibilidade de marcadores moleculares tem possibilitado estudos de genética quantitativa, tais como a determinação do número de genes afetando um caráter, a localização e o percentual da variância explicada por tais genes, o tipo de ação gênica associada, a importância da epistasia e o efeito ambiental em cada gene. Para características quantitativas, vários marcadores são geralmente envolvidos (Saghai-Marouf et al., 1996; Dudley, 1997). QTLs têm o mesmo significado da herança quantitativa para o melhoramento clássico, ou seja, seu controle é condicionado por vários genes, e o fenótipo dos indivíduos é definido em termos de variâncias. O propósito do mapeamento de QTLs é inferir os genótipos de um QTL, a fim de poder estimar os efeitos e a localização de QTLs a partir das associações com marcadores genéticos conhecidos (Liu, 1998).

Para o mapeamento de QTLs, são criados mapas de ligação com marcadores moleculares, que fornecem os dados de ordenamento e as distâncias de mapa entre estes marcadores na população segregante estudada. A análise de QTLs tem prosseguimento com a construção de duas planilhas de dados, uma com a caracterização genotípica de cada indivíduo da população através de marcadores moleculares, e a outra com seu respectivo valor fenotípico. Se determinado marcador se correlaciona favoravelmente a determinada característica mais seguidamente do que se esperaria por acaso, provavelmente este marcador estará muito próximo ao gene responsável pela expressão desta característica. Os marcadores independentemente associados a um QTL para uma determinada característica contribuem apenas com uma porção variável no valor final da característica. Os marcadores identificados podem ou não corresponder a genes de fato, podendo ser compostos por parte do gene ou, inclusive, por uma região

adjacente ao gene de interesse. Neste caso, quanto mais afastado estiverem estes marcadores dos genes responsáveis pela expressão da característica, maior a chance de que, em uma meiose, estes marcadores segreguem independentemente do gene, perdendo-se a relação entre a presença do marcador e o alelo favorável. Em um estudo com simulação em população de retrocruzamento, foi demonstrado que, para QTLs de grande efeito, em experimentos com populações grandes e mapas de ligação de alta densidade de marcadores, o intervalo de confiança para o mapeamento de QTL é da ordem de 10 centimorgans (cM) (Darvasi et al., 1993). Também por simulação, o grau de resolução genética não aumentou com o uso de mais marcadores (1 a 2 cM de espaçamento) e grandes tamanhos de populações (1000 gametas) (Lee, 1995). Deste modo, para estudos de QTL ou clonagens baseadas em informações de mapas moleculares, recomenda-se trabalhar com espaçamento mínimo de 10 cM entre marcadores adjacentes em todo o genoma. Marcadores espaçados por 10 cM podem conter vários QTLs neste intervalo, inclusive com efeitos opostos para a característica de interesse. Tarchini et al. (2000), analisando a região genômica que continha o gene *adh1* em arroz, observaram que dez unidades de mapa foi equivalente a 1,15 Mpb, contendo 147 genes potenciais. Por esta razão, considera-se que uma análise de QTLs seja apenas o ponto inicial na busca por genes. Posteriormente, podem ser geradas populações segregantes a partir de linhagens derivadas do cruzamento onde foi efetuada a análise de QTLs, procedendo-se ao mapeamento fino de QTLs para identificar marcadores mais próximos ao gene de interesse, como descrito para o tomateiro por Monforte & Tanksley (2000). Em arroz, Hittalmani et al. (2000) saturaram três regiões genômicas próximas a três genes de resistência à brusone do arroz, com distâncias variando de 2,1 a 7,9 cM, obtendo marcadores para facilitar o processo de introgressão destes genes em outras variedades de arroz.

A análise de QTLs, como visto anteriormente, envolve a procura por associações significativas entre a expressão do caráter e os marcadores moleculares mapeados. Existem várias metodologias para detectar estas associações, baseadas em procedimentos estatísticos, como teste-t, regressão linear simples ou múltipla, regressão não-linear e mapeamento por intervalo. A identificação de associações significativas entre QTLs e marcadores nem sempre tem significado biológico devido à multiplicidade de problemas que envolvem os testes estatísticos. Outros fatores podem influenciar na detecção de QTLs, como o número de genes envolvendo a expressão do caráter, a existência de interações gênicas, a herdabilidade do caráter, o número de genes segregando na população

de mapeamento, o tipo e tamanho da população de mapeamento e o número de marcadores presentes no mapa de ligação (Liu, 1998).

O mapeamento de QTLs é considerado uma importante ferramenta de apoio ao melhoramento genético por possibilitar que regiões do genoma responsáveis pela expressão de caracteres importantes sejam identificadas. Uma das estratégias para aumentar o poder de identificação de QTLs é justamente o modo pelo qual são construídas as populações de mapeamento. A utilização de populações F<sub>2</sub> permite obter as três dosagens gênicas de um loco (AA, Aa, aa, por exemplo), possibilitando estimar os efeitos aditivos e desvios de dominância para QTLs individuais. A resolução da localização de QTLs é fortemente influenciada pelo número de meioses estudadas, a qual depende do número de indivíduos analisados na população, efeitos ambientais, erros de medida, segregação de outros QTLs e interação entre QTLs. Populações F<sub>2</sub> são mais informativas do que de retrocruzamentos de mesmo tamanho, uma vez que o dobro de meioses são estudadas em cada indivíduo. Poderiam ser obtidas informações semelhantes utilizando uma população de linhagens recombinantes, mas se perderia a capacidade de distinguir fatores aditivos de fatores dominantes. Contudo, duas gerações de cruzamentos (F<sub>2</sub> e retrocruzamento, por exemplo) ou linhagens recombinantes, dariam somente uma localização aproximada dos QTLs. Localizações mais detalhadas podem ser obtidas utilizando retrocruzamentos adicionais, para produzir linhas isogênicas diferindo somente na região que contenha o QTL, o que poderia eliminar a maioria da variância genética, tornando possível dissecar o intervalo restante pelo exame de vários recombinantes por marcadores adjacentes (Carbonell et al., 1993; Liu, 1998).

Uma importante constatação é que os QTLs, na maioria das vezes, não são coincidentes entre populações constituídas por diferentes parentais. Estas variações detectadas pela análise de QTLs, segundo Huang et al. (1996), são devidas a: 1) Falta de expressão gênica em algumas populações devido aos diferentes conjuntos de genes; 2) não há variação entre os dois parentais para alguns QTLs, assim, não há segregação para estes QTLs; 3) efeitos ambientais confundem a expressão de alguns QTLs, especialmente para populações F<sub>2</sub> onde QTLs com efeitos muito pequenos não podem ser detectados sem experimentos replicados. Além disto, sob condições ambientais que variam de um experimento para outro, os QTLs variam até mesmo entre populações que utilizam os mesmos parentais.

## Análise de AB-QTLs

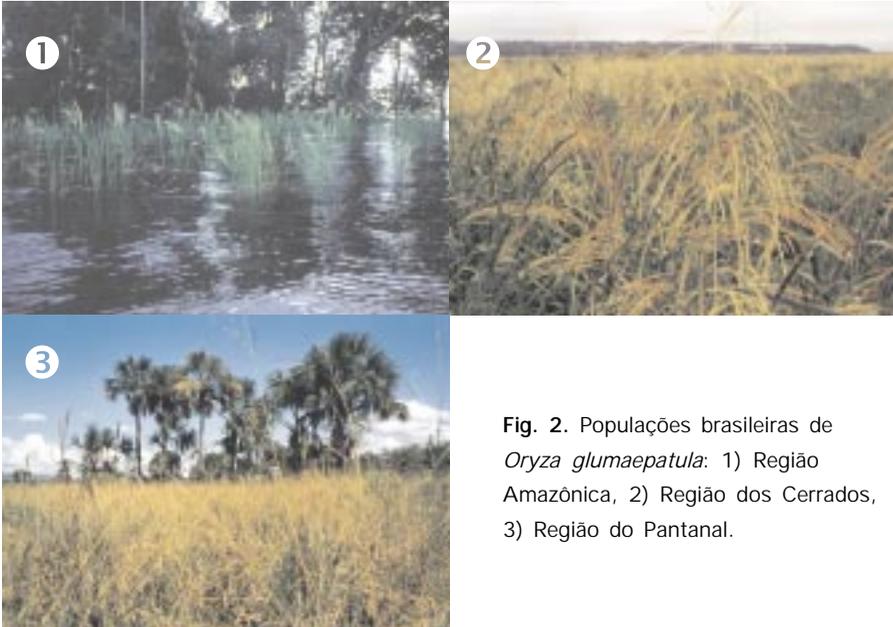
Uma estratégia de melhoramento que contempla o desenvolvimento varietal juntamente com a análise de QTL foi sugerida por Tanksley & Nelson (1996), conhecida como *Advanced Backcross QTL analysis*, ou AB-QTL. Esta técnica baseia-se fundamentalmente na técnica de *Inbred Backcross Lines* (IBL), sugerida por Wehrhahn & Allard (1965), em que são feitos repetidos retrocruzamentos na direção do parental recorrente em que se deseja inserir determinada característica proveniente do parental doador e, em seguida, são efetuadas autofecundações para que sejam obtidas linhas isogênicas que possam conter, cada uma delas, inserções de diferentes partes do genoma do parental doador. A análise de AB-QTL foi especialmente desenvolvida para auxiliar na introgressão de genes de interesse agrônomico presentes em espécies silvestres, parentes das espécies cultivadas, realizando-se duas ou três gerações de retrocruzamento a partir da geração F1, e em seguida, assistida por marcadores moleculares, proceder-se à seleção. No final do processo, são obtidas linhagens quase isogênicas ou NILs (*Near-Isogenic Lines*), possuindo a inserção de fragmentos de interesse provenientes do parental silvestre, e que podem ser responsáveis pelo fenótipo melhorado. A seleção positiva para os alelos favoráveis, e negativa para os fragmentos introgrididos indesejáveis é a principal aplicação dos marcadores moleculares nesta estratégia.

Diversos trabalhos utilizaram AB-QTLs com sucesso em tomateiro, utilizando como parental recorrente a espécie cultivada *Lycopersicon esculentum* e como parental doador as espécies silvestres *L. pimpinellifolium* (Tanksley et al., 1996), *L. peruvianum* (Fulton et al., 1997) and *L. hirsutum* (Bernacchi et al., 1998). Em arroz, a estratégia de AB-QTL foi utilizada para o mapeamento fino de QTLs relacionados com a data de florescimento, sendo que várias NILs foram também desenvolvidas via seleção assistida por marcadores (Yamamoto et al., 1998).

A grande contribuição dos cruzamentos interespecíficos para o melhoramento é que, apesar do aspecto fenotípico inferior do parental silvestre, quando determinado fragmento deste é inserido no genoma de uma variedade elite, observam-se alelos provenientes do parental silvestre aumentando favoravelmente o valor fenotípico para algumas características. Genes que melhoram as características agrônomicas podem ser encontrados em determinadas espécies, mesmo quando os efeitos positivos não são preditos pelo fenótipo parental (Vicente & Tanksley, 1993). Por exemplo, em um cruzamento interespecífico de tomateiro, apesar de a espécie *L. peruvianum* ter um fenótipo para formato de fruto inferior ao fenótipo da espécie cultivada *L. esculentum*, foi identificado um QTL

onde a presença do alelo silvestre melhorou o aspecto do fruto na progênie (Fulton et al., 1997). Xiao et al. (1998) detectaram 12 QTLs de importância agrônômica na geração retrocruzamento 2 de *O. sativa* x *O. rufipogon*, encontrando alelos provenientes do parental silvestre que não diminuíram o valor fenotípico para as demais características medidas, inclusive para a produção de grãos. Doi et al. (1998) também avaliaram a geração retrocruzamento 2 de *O. sativa* x *O. glaberrima*, e os alelos provenientes do parental silvestre foram relacionados com os caracteres macho-esterilidade e número de dias até o florescimento. O que existe em comum entre estes exemplos é a indicação de que o germoplasma exótico possui genes capazes de melhorar uma série de características de importância agrônômica, apesar de possuírem fenótipos inferiores. Além disso, estes genes somente foram identificados pelo auxílio do mapeamento de QTLs, facilitando o processo de introgressão gênica. Um mapa molecular pode ser construído a partir de mais de uma classe de marcadores moleculares, tanto dominantes quanto co-dominantes. Em determinadas ocasiões isto é bastante recomendável, principalmente quando se deseja aumentar o número de marcadores em uma região específica do genoma. Neste caso, pode-se saturar a região com marcadores RAPD e AFLP, ancorados por marcadores RFLP e SSR. A vantagem de se utilizarem marcadores co-dominantes para a construção de mapas moleculares é que eles podem identificar o valor fenotípico associado aos alelos provenientes dos dois parentais em uma análise de QTLs.

A Embrapa Arroz e Feijão vem conduzindo um trabalho de ampliação da base genética do arroz através da metodologia de AB-QTLs. A espécie doadora de genes para incorporação no genoma do arroz cultivado é a espécie silvestre *O. glumaepatula* (Figura 2), nativa da América Central e do Sul. Esta espécie, assim como o arroz cultivado, possui o genoma AA (conjunto gênico primário), ou seja, híbridos férteis podem ser obtidos entre elas. O acesso de *O. glumaepatula* utilizado como doador de genes nos primeiros cruzamentos com genitores elite de arroz foi o RS-16, proveniente de uma população coletada no Rio Solimões (Região Amazônica). Existem duas razões para a escolha da espécie *O. glumaepatula* em cruzamentos interespecíficos. A primeira é a provável presença de genes únicos, resultantes do processo adaptativo de *O. glumaepatula* às condições edafoclimáticas brasileiras. Como se sabe, o arroz cultivado *O. sativa* é originário do continente asiático, sendo que a adaptação ao cultivo no Brasil deu-se com o conjunto de genes selecionados naquele continente. A segunda razão diz respeito à necessidade de avaliar o potencial de transferência dos genes de interesse comercial de *O. glumaepatula* para o arroz cultivado.



**Fig. 2.** Populações brasileiras de *Oryza glumaepatula*: 1) Região Amazônica, 2) Região dos Cerrados, 3) Região do Pantanal.

O primeiro cruzamento interespecífico realizado foi entre o acesso RS-16 e o genitor elite BG 90-2, uma das linhagens mais produtivas do programa de melhoramento de arroz irrigado da Embrapa Arroz e Feijão. O desenho esquemático do cruzamento interespecífico está apresentado na Figura 3. Para proceder à análise de AB-QTLs neste cruzamento, inicialmente foi obtido um mapa de ligação, construído com 155 marcadores SSR e 7 STS (Sequence Tagged Sites), distribuídos ao longo dos 12 cromossomos de arroz, em uma população RC1F1 composta por 93 indivíduos (Brondani et al., 2001). Para proceder à análise de QTLs, 96 indivíduos RC2F1 foram analisados com 157 marcadores SSR e STS, os quais foram reunidos com os dados fenotípicos obtidos na geração RC2F2, ou seja, cada indivíduo RC2F1 foi genotipado, sendo que suas sementes deram origem às 96 famílias RC2F2, avaliadas em dois locais (Goiânia - GO e Formoso do Araguaia - TO), onde foram tomados os dados fenotípicos de características relacionadas à produção, tais como número de panículas, peso de 100 sementes, número de grãos cheios, dentre outras. Assim, para proceder à análise de QTLs, foram obtidos o mapa de ligação (geração RC1F1), que forneceu a distância de mapa entre os

marcadores moleculares, a genotipagem (plantas RC2F1) e fenotipagem (famílias RC2F2) (Brondani et al., 2002). Como resultado, descobriu-se que a única característica com fenótipo favorável oriunda da espécie silvestre *O. glumaepatula* detectada pela análise de AB-QTLs foi aumento no número de panículas, associada aos marcadores SSR RM 223 (cromossomo 8) e RM 4B (cromossomo 11) (Figura 4). Contudo, observou-se que diversas famílias RC2F2 apresentaram produtividades significativamente superiores ao parental cultivado BG 90-2, ou seja, apesar de não ter sido possível identificar segmentos de DNA de *O. glumaepatula* que pudessem aumentar o valor fenotípico nestas famílias, uma vez que mapas moleculares fornecem uma cobertura genômica reduzida. Para saber se esta transgressividade em relação ao genitor elite BG 90-2 era devido ao efeito de heterose ou do fragmento introgridido de *O. glumaepatula*, foi conduzido um experimento em três locais (Goiânia, Boa Vista e Formoso do Araguaia) com 18 famílias RC2F4. Comparando-se as médias de produtividade e o número de panículas obtidas nas gerações RC2F2 e RC2F4, observou-se que os valores não foram alterados, ou seja, o fenótipo favorável destas famílias foi resultante da incorporação de alelos de *O. glumaepatula*, e não da heterose (Rangel et al., 2001).

### Cruzamento *Oryza sativa* x *O. glumaepatula*

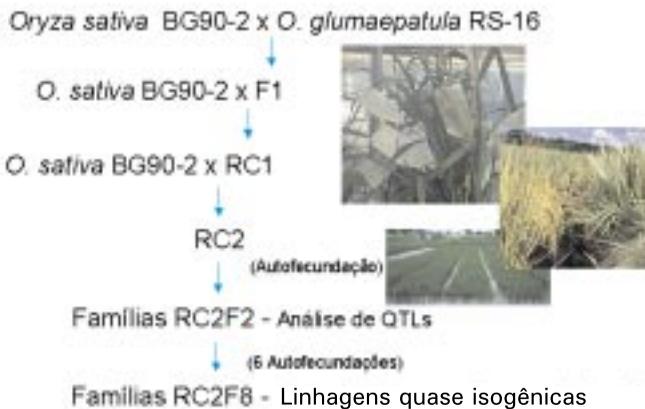


Fig. 3. Esquema de cruzamento para a análise de AB-QTLs.

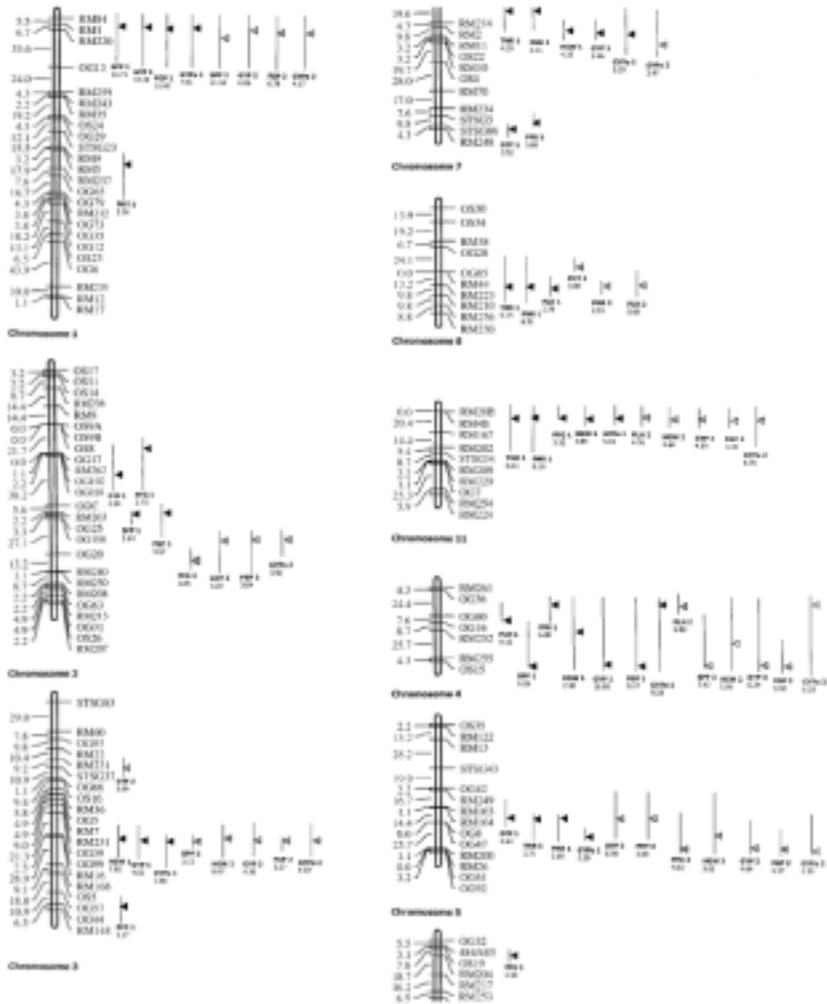


Fig. 4. Mapa de QTL do cruzamento *Oryza sativa* BG 90-2 x *O. glumaepatula* RS-16. As setas indicam regiões genômicas envolvidas na expressão de características avaliadas fenotipicamente (Brondani et al., 2002).

Outra característica interessante observada nas famílias com fragmentos incorporados de *O. glumaepatula* foi a sua capacidade de produção na rebrota, ou seja, na segunda colheita, 40 dias após a primeira. As plantas de arroz têm a capacidade de regenerar novos perfilhos férteis após o corte dos colmos na

colheita. Esta é uma característica herdável, porém os genótipos hoje utilizados pelos programas de melhoramento não possuem bom desempenho na rebrota. Deste modo, esta característica, proveniente da espécie silvestre *O.*

*glumaepatula*, tem ampla aplicação no cultivo do arroz, sobretudo em pequenas propriedades rurais. A utilização da soca reduz significativamente o custo de produção por unidade de área, o que é um fator a ser considerado, devido aos elevados custos de produção de uma lavoura de arroz irrigado, contabilizando-se os gastos com semente, fertilizantes, herbicidas e energia elétrica. A produção no cultivo principal e na rebrota foi avaliada em 35 linhagens BG 90-2 com fragmentos incorporados de *O. glumaepatula* em experimento conduzido em dois locais (Boa Vista – RR e Goiânia – GO). As principais linhagens produziram, na soma das duas produções, mais de 10.000 kg/ha, significativamente superiores à testemunha. Duas linhagens produziram na rebrota em torno de 2700 kg/ha, ou 35% do produzido no cultivo principal. Estudos realizados para qualidade do grão de arroz destas linhagens de incorporação indicaram, em todos os aspectos, para o tipo comercial de grão. Deste modo, a maioria das 35 linhagens podem ser utilizadas diretamente como genitores no programa de melhoramento genético do arroz e, no caso de um grupo de cinco linhagens, serem lançadas diretamente como novas cultivares de arroz (Figura 5).

## Seleção assistida por marcadores

Após a identificação de marcadores relacionados a características de interesse através da análise de QTLs, pode-se conduzir testes de DNA nas linhagens derivadas do cruzamento inicial, para descobrir e selecionar as plantas que possuam os alelos favoráveis em homozigose para os QTLs identificados. A este procedimento convencionou-se chamar de Seleção Assistida por Marcadores (SAM), e os exemplos mais marcantes envolvem características cujo controle genético é resultante da expressão de um ou poucos genes. Em arroz, a SAM tem sido utilizada para monitorar a introgressão de genes de resistência a doenças como brusone (Tabien et al., 2000) e bacteriose causada por *Xanthomonas oryzae* (Singh et al., 2001) e é mais efetiva quanto mais próximo do gene estiver o marcador molecular, reduzindo a possibilidade de ocorrer uma recombinação entre os dois. Durante o processo de seleção, as associações entre os locos marcadores e QTLs mudarão devido a recombinação, deriva genética ao acaso e seleção e, portanto, é importante realizar contínuas reavaliações das associações com o avanço das gerações. Características controladas por vários genes são mais difíceis para realizar a SAM, e um dos motivos é que em alguns

dos QTLs detectados em gerações precoces, o máximo desequilíbrio de ligação é devido, na verdade, a múltiplos genes ligados, que podem ser separados via recombinação, e assim dissipam os efeitos e reduzem o potencial de ganho da SAM (Austin & Lee, 1996). Algumas limitações da SAM podem reduzir o potencial de ganho genético em programas de melhoramento: 1) O baixo número de marcadores moleculares necessários para a existência de associações significativas (desequilíbrio de ligação) com os QTLs; 2) o menor tamanho da população segregante necessária para detectar QTLs para características de baixa herdabilidade; 3) erros de amostragem; 4) efeitos significativos de marcadores associados a QTLs podem ser falso-positivos; 5) quando marcadores individuais são selecionados, e não dois marcadores que flanqueiam um gene, pode ocorrer *crossing-over* entre o marcador selecionado e o QTL, reduzindo o ganho previsto; e 6) desvios de amostragem de QTLs não mapeados podem produzir estimativas de QTLs errôneas, podendo identificar falsos negativos ou falsos positivos (Lande & Thompson, 1990; Knapp, 1998). Por outro lado, a eficiência da SAM é aumentada e pode ser mais eficiente que a seleção tradicional sob as seguintes circunstâncias: 1) A característica sob seleção possui baixa herdabilidade; 2) há forte ligação entre QTL e marcadores (menos de 5 cM), com eficiência adicional quando se percebe que predominam as ligações em acoplamento; e 3) são utilizadas populações segregantes maiores para o mapeamento e seleção de QTLs, melhorando as estimativas dos efeitos dos QTLs (Lee, 1995).

Embora os ganhos da seleção assistida por marcadores sejam teoricamente maiores que os ganhos com a seleção fenotípica, os erros com as estimativas de parâmetros de QTL e SAM, deriva genética e desequilíbrio entre QTL selecionado e não-selecionados podem reduzir os ganhos da SAM em relação à seleção fenotípica. A seleção freqüentemente é retardada para gerações posteriores, porque a herdabilidade e poder estatístico das estimativas de médias de progênie tendem a aumentar com o aumento do número de repetições, gerações, locais e anos. A seleção em gerações muito precoces em programas de melhoramento tem uma série de problemas, como a escassez de sementes, e a chance de avançar genótipos superiores a partir de F2 ou F3 é baixa para algumas características. O desempenho médio em locais e anos é freqüentemente mau estimado a partir de observações fenotípicas de F2 e F3. Em F2, não há possibilidade de obter repetição, pois cada planta possui um genótipo único, por ter havido somente uma geração de auto-fecundação, não podendo-se tomar dados médios de cada genótipo, e impossibilitando fazer estimativas do efeito

ambiental na expressão do caráter. Se houver recursos limitados pode-se ter que descartar um grande número de linhagens ou atrasar a seleção até F4 ou posterior, analisando-se uma progênie menor. Com todos os recursos disponíveis, a situação ideal é atrasar a seleção até que testes suficientes tenham sido feitos para identificar, com algum grau de precisão, os genótipos mais destacados produzidos em cada cruzamento, e analisar um número suficiente de progênies para assegurar a presença de um ou mais genótipos superiores entre a progênie selecionada (Paterson et al., 1991; Knapp, 1998).

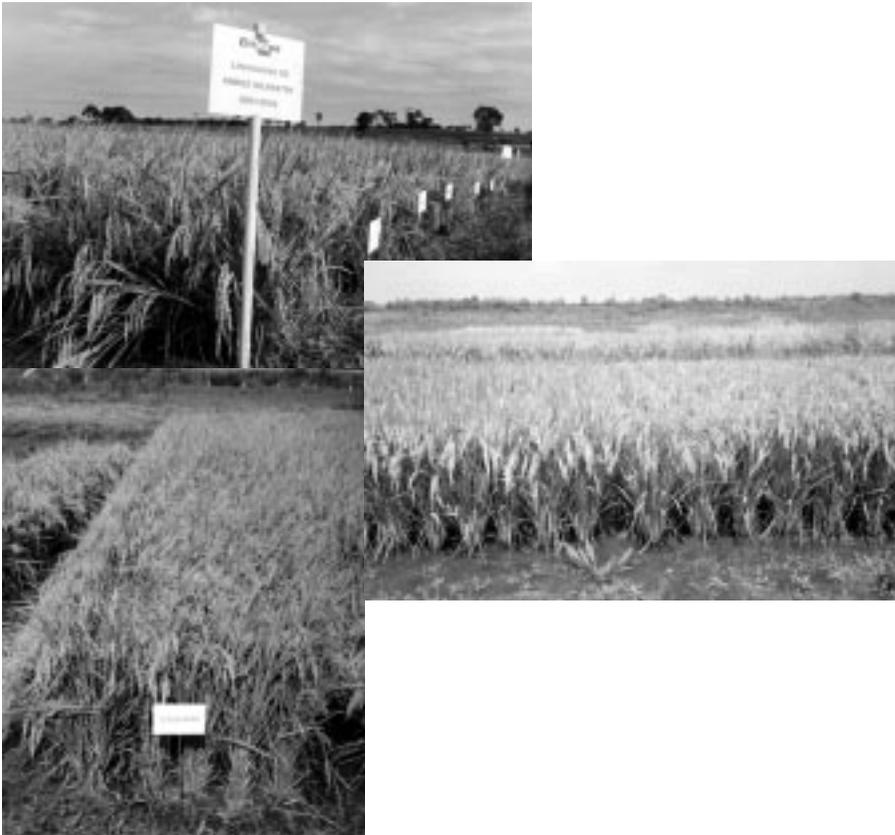


Fig. 5. Linhagens de incorporação obtidas do cruzamento *Oryza sativa* BG 90-2 x *O. glumaepatula* RS-16.

## Considerações Finais

Marcadores moleculares são imprescindíveis como auxílio na administração de bancos de germoplasma e programas de melhoramento que objetivam a ampliação da base genética por meio de cruzamentos amplos. Neste caso, a maior chance de sucesso envolve o cruzamento entre genótipos elite e germoplasma exótico, como variedades antigas e espécies silvestres. Contudo, antes de o germoplasma exótico ser utilizado efetivamente como genitor em programas de melhoramento, é necessária a etapa de pré-melhoramento, quando são identificados não só os genótipos mais contrastantes, mas também os genótipos que são capazes de produzir boas combinações genéticas com os genótipos elite. A importância do uso de marcadores moleculares aumenta na medida em que, mesmo em espécies com reduzida variabilidade genética, como arroz e soja, a base genética pode ser ampliada através da identificação de linhagens que possuam combinações inéditas de alelos.

A utilização de marcadores moleculares na análise de QTLs e seleção assistida deve ser vista com algumas ressalvas, apesar de alguns resultados serem bastante promissores. O fato de a análise de QTLs não identificar necessariamente um gene, mas uma região genômica que pode conter diversos outros genes, incluindo os desfavoráveis para uma certa característica, faz com que os resultados forneçam apenas uma idéia aproximada das regiões que a controlam. Estudos posteriores visando à identificação dos principais genes e o ambiente específico onde estes são expressos são necessários. No caso de cruzamentos amplos, a genotipagem de cada indivíduo da progênie com marcadores moleculares é extremamente útil na identificação dos fragmentos genômicos provenientes de espécies não-adaptadas que tenham sido incorporados no genoma de uma cultivar elite, com o propósito de selecionar os indivíduos que possuam os alelos que aumentem o valor fenotípico de uma característica.

## Referências Bibliográficas

ABADIE, T. E.; CORDEIRO, C. M. T.; FONSECA, J. R.; FREIRE, M. S.; ALVES, R. B. N.; BURLE, M. L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; CASTRO, E. da M. de; SILVA, H. T. Desenvolvendo uma coleção nuclear de arroz para o Brasil. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ – RENAPA, 7., 2002, Florianópolis. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 259-261. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 134).

AUSTIN, D. F.; LEE, M. Comparative mapping in  $F_{2:3}$  and  $F_{6:7}$  generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 7, p. 817-826, May 1996.

BERNACCHI, D.; BECK-BUNN, T.; ESHED, Y.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. D. Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 381-397, Aug. 1998.

BLAIR, M. W.; HEDETALE, V.; MCCOUCH, S. R. Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 2/3, p. 449-457, Aug. 2002.

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**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, May 1980.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, Lund, v. 134, n. 1, p. 59-71, Oct. 2001.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 6/7, p. 1192-1203, May 2002.

CARBONELL, E. A.; ASINS, M. J.; BASELGA, M.; BALANSARD, E.; GERIG, T. M. Power studies in the estimation of genetic parameters and the localization of quantitative trait loci for backcross and doubled haploid populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, n. 4, p. 411-416, May 1993.

COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. Broadening the genetic base of crops: an overview. In: COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. (Ed.). **Broadening the genetic base of crop production**. Wallingford: CABI, 2001. p. 1-23.

DARVASI, A.; WEINERB, A.; MINKE, V.; WELLER, J.; SOLLER, M. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. **Genetics**, Maryland, v. 134, n. 3, p. 943-951, July 1993.

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, Hampshire, v. 3, n. 1, p. 22-32, Jan. 2002.

DOI, K.; YOSHIMURA, A.; IWATA, N. RFLP mapping and QTL analysis of heading date and pollen sterility using backcross populations between *Oryza sativa* L. and *O. glaberrima* Steud. **Breeding Science**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 395-399, Dec. 1998.

DUDLEY, J. W. Quantitative genetics and plant breeding. **Advances in Agronomy**, New York, v. 59, p. 1-23, 1997.

FALCONER, D. S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.

FAO. **The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 1998. 510 p.

FRANKEL, O. H. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: ARBER, W.; LIMENSEE, K.; PEACOCK, W. J.; STARLINGER, P. (Ed.). **Genetic manipulation: impact on man and society**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p. 161-170.

FULTON, T. M.; BECK-BUNN, T.; EMMATTY, D.; ESHED, Y.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. D. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 5/6, p. 881-894, Oct. 1997.

GERALDI, I. O. Selección recurrente en el mejoramiento de plantas. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali: CIAT, 1997. p. 3-11. (CIAT. Publicación, 267).

HARLAN, J. R.; DEWET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, p. 509-517, 1971.

HARUSHIMA, Y.; YANO, M.; SHOMURA, A.; SATO, M.; SHIMANO, T.; KUBOKI, Y.; YAMAMOTO, T.; LIN, S. Y.; ANTONIO, B. A.; PARCO, A. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. **Genetics**, Maryland, v. 148, n. 1, p. 479-494, Jan. 1998.

HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T. V.; ZEIGLER, R. S.; HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 7, p. 1121-1128, May 2000.

HUANG, N.; COURTOIS, B.; KHUSH, G.; LIN, H.; WANG, G.; WU, P.; ZHENG, K. Association of quantitative trait loci for plant height with major dwarfing genes in rice. **Heredity**, Edinburg, v. 77, n. 2, p. 130-137, Aug. 1996.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 25-34. Sept. 1997.

KNAPP, S. J. Marker-assisted selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 5, p. 1164-1174, Sept./Oct. 1998.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Maryland, v. 124, n. 3, p. 743-756, Mar. 1990.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, n. 2, p. 174-181, Oct. 1987.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, New York, v. 55, p. 265-344, 1995.

LI, J. X.; YU, S. B.; XU, C. G.; TAN, Y. F.; GAO, Y. J.; LI, X. H.; ZHANG, Q. Analyzing quantitative trait loci for yield using a vegetatively replicated F<sub>2</sub> population from a cross between the parents of an elite rice hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1/2, p. 248-254, July 2000.

LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611 p.

MACAULAY, M.; RAMSAY, L.; POWELL, W.; WAUGH, R. A representative, highly informative genotyping set of barley SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6/7, p. 801-809, May 2001.

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, n. 1/2, p. 89-99, Sept. 1997.

MONFORTE, A. J.; TANKSLEY, S. D. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking lineage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 471-479, Feb. 2000.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 55, p. 335-350, 1987.

NI, J.; COLOWIT, P. M.; MACKILL, D. J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 601-607, Mar./Apr. 2002.

OLUFOWOTE, J. O.; XU, Y.; CHEN, X.; PARK, W. D.; BEACHELL, H. M.; DILDAY, R. H.; GOTO, M.; MCCOUCH, S. R. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 370-378, June 1997.

OWENS, K. W.; BLISS, F. A.; PETERSON, C. E. Genetic analysis of fruit length and weight in two cucumber populations using the inbred backcross line method. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 110, n. 3, p. 431-436, May 1985.

PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, New York, v. 46, p. 39-90, 1991.

POWELL, W.; OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K. J.; PROVAN, J.; WAUGH, R. Polymerase chain reaction-based assays for the characterisation of plant genetic resources. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 9, p. 1726-1730, Sept. 1995.

RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C.; ZIMMERMANN, F. J. P.; CORDEIRO, A. C. C.; FERREIRA, M. E. Obtenção de linhagens *Sativa* vetoras de genes de *Oryza glumaepatula*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2001. p. 18-20.

RICK, C. M. Controlled introgression of chromosomes of *Solanum pennellii* into *Lycopersicon esculentum*: segregation and recombination. **Genetics**, Maryland, v. 62, n. 4, p. 753-768, Aug. 1969.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; YUE, Y. G.; XIANG, Z. X.; STROMBERG, E. L.; RUFENER, G. K. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 4, p. 539-546, Sept. 1996.

SCHETTINI, T. M.; GABELMAN, W. H.; GERLOFF, G. C. Incorporation of phosphorus efficiency from exotic germplasm into agriculturally adapted germplasm of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: GABELMAN, W. H.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 559-568.

SINGH, S.; SIDHU, J. S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D. S.; DHALIWAL, H. S.; KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *xa21*) using marker assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6/7, p. 1011-1015, May 2001.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, Nov. 1975.

SPILLANE, C.; GEPTS, P. Evolutionary and genetic perspectives on the dynamics of crop gene pools. In: COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. (Ed.). **Broadening the genetic base of crop production**. Wallingford: CABI, 2001. p. 25-70.

TABIEN, R. E.; LI, Z.; PATERSON, A. H.; MARCHETTI, M. A.; STANSEL, J. W.; PINSON, S. R. M. Mapping of four major rice blast resistance genes from "Lemont" and "Teqing" and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 8, p. 1215-1225, Dec. 2000.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, Washington, v. 277, n. 5329, p. 1063-1066, Aug. 1997.

TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 1, p. 191-203, Feb. 1996.

TANKSLEY, S. D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T. M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECK-BUNNN, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 2, p. 213-224, Feb. 1996.

TARCHINI, R.; BIDDLE, P.; WINELAND, R.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 3, p. 381-391, Mar. 2000.

VICENTE, M. C. de; TANKSLEY, S. D. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. **Genetics**, Maryland, v. 134, n. 2, p. 585-596, June 1993.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, Mar. 1989.

WEHRHAHN, C.; ALLARD, R. W. The detection and measurement of the effects of individual genes involved in the inheritance of a quantitative character in wheat. **Genetics**, Maryland, v. 51, n. 1, p. 109-119, Jan. 1965.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

XIAO, J.; LI, J.; GRANDILLO, S.; AHN, S. N.; YUAN, L.; TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. **Genetics**, Maryland, v. 150, n. 2, p. 899-909, Oct. 1998.

YAMAMOTO, T.; KUBOKI, Y.; LIN, Y. S.; SASAKI, T.; YANO, M. Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 1/2, p. 37-44, July 1998.

ZABEAU, M.; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification**: a general method for DNA fingerprinting. Paris: European Patent Office, 1993. (European Patent Application n. 92402629.7; Publication n. EP 0534858 A1).