



CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas - MG, 35701-970
claudia@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: melhoramento assistido, SSR, AFLP, RFLP

INTRODUÇÃO

A genética quantitativa e os métodos estatísticos constituem as bases do melhoramento genético, cuja contribuição para o patamar de produtividade das culturas comerciais é inquestionável, e certamente continuará sendo a sustentação de qualquer programa que objetive a obtenção de ganhos genéticos. Portanto, abordar o tema "aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético" é sempre um desafio. Várias são as modernas estratégias moleculares disponíveis para essa finalidade, mas a grande maioria das cultivares disponibilizadas no Brasil e no mundo, ainda é obtida utilizando-se as técnicas convencionais que têm permitido progressos genéticos contínuos (Vencovsky & Ramalho, 2000).

Por outro lado, o avanço desencadeado pela biologia molecular e celular, a partir de meados da década de 70, revolucionou o conhecimento sobre os fenômenos biológicos e disponibilizou diversas técnicas biotecnológicas, que apresentam grande potencial para revolucionar o melhoramento genético de plantas. Dentre essas técnicas, podem ser destacadas as técnicas de micropropagação, hibridações interespecíficas via fusão de protoplastos, produção de di-haplóides, a cultura de anteras, os marcadores moleculares e, finalmente, a transformação genética e o seqüenciamento de genomas. Todas essas técnicas têm contribuído para os programas de desenvolvimento de cultivares, mas até o momento nenhuma delas isoladamente ou em conjunto se igualaram à eficiência obtida pelos chamados programas de melhoramento "tradicionais".

Resultados bastante controversos quanto à aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento genético são freqüentemente encontrados na literatura. No entanto, as vantagens do melhoramento têm sido demonstradas por vários autores, uma vez aplicados de forma consciente e com objetivos bem definidos. Assim, serão apresentados os tipos de marcadores de DNA atualmente disponíveis, desde os clássicos até aqueles baseados nas informações das seqüências de DNA, além das potencialidades dos marcadores moleculares direta e indiretamente em programas de melhoramento genético.

MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores de DNA clássicos, baseados nas técnicas de hibridização ou na amplificação de fragmentos por PCR, revolucionaram a genética e a biologia molecular desde a construção do primeiro mapa genético humano utilizando o RFLP (Botstein et al., 1980). A partir do advento da técnica de PCR vários marcadores foram desenvolvidos como o RAPD (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990), o AFLP (Vos et al., 1995) e os microssatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas).

Com os avanços nas técnicas de seqüenciamento de DNA e o acúmulo de informações de seqüências, uma nova geração de marcadores tem sido explorada: os SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos) e pequenas inserções ou deleções, variando de 1 a 3 nucleotídeos, conhecidas como *indels*. Pelo fato dos SNPs serem altamente abundantes no genoma de qualquer organismo e apresentarem uma lenta taxa de mutação dentro de gerações, esse marcadores prometem uma grande aplicação em processos de genotipagem em larga escala (Useche et al., 2001). Além deles, uma gama de estratégias têm viabilizado a conversão dos mesmos em produtos de amplificação por meio de *primers* específicos, os STS (*Sequence Tagged Sites*) (Paran e Michelmore, 1993; Meksem et al., 2001) e de microarranjos de DNA visando a genotipagem em larga escala (Jaccoud et al., 2001).

APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, quer pela maior produtividade, quer pela melhor adaptação aos ambientes adversos. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente de algumas etapas, que podem ser auxiliadas e aceleradas por meio da utilização mais efetiva dos marcadores moleculares. Uma vez apresentados os diferentes tipos de marcadores de DNA disponíveis atualmente, serão descritas algumas das suas aplicações em estudos de variabilidade genética, caracterização de cultivares, avaliação da pureza genética de sementes, mapeamento de genes ou regiões genômicas associadas à características de interesse e seleção assistida por marcadores. Tais estratégias podem ser utilizadas de forma direta ou indireta para auxiliar os programas de melhoramento genético.

A utilização dos marcadores moleculares na obtenção de perfis genéticos fornece uma elevada precisão na caracterização da diversidade genética dentro de germoplasmas melhorado ou exótico, uma vez que acessam a variabilidade diretamente ao nível do DNA. Uma caracterização detalhada com base em dados moleculares dos acessos que compõem os Bancos de Germoplasma pode contribuir estrategicamente para otimizar a organização das coleções núcleo, possibilitando uma maior utilização do germoplasma exótico em programas de melhoramento (Tanksley et al., 1996).

O conhecimento da diversidade genética dentro do germoplasma melhorado, auxilia na organização da variabilidade desses materiais e potencializa a maximização dos ganhos genéticos em programas de melhoramento. Os *fingerprintings* moleculares, de maneira rápida e precisa, podem ser utilizados na definição de relações genéticas entre os materiais, na alocação desses em grupos heteróticos (Parentoni et al., 2001), na redução da heterozigose residual de linhagens e em programas de conversão de linhagens (Duarte et al., 2003). Adicionalmente, a caracterização molecular de linhagens e cultivares tem sido amplamente utilizada em processos de proteção de cultivares e no monitoramento da pureza genética de sementes (Padilha, 2002), representando novas oportunidades tecnológicas devido às possibilidades de aumento de retorno dos investimentos aplicados nos programas de melhoramento.

A utilização de marcadores moleculares em programas de retrocruzamento tem sido bastante evidenciada. Além de monitorar a introgressão do gene de interesse, a genotipagem molecular dos indivíduos permite a seleção daqueles mais semelhantes ao genótipo recorrente e com melhor conversão na região próxima ao gene introduzido (Duarte et al., 2003). Deste modo, o número de ciclos de retrocruzamentos necessários para a recuperação do genótipo recorrente é reduzido, acelerando o desenvolvimento de variedades melhoradas (Openshaw et al., 1994).

A identificação de regiões genômicas associadas com características de interesse apresenta-se como outra grande aplicação dos marcadores moleculares. Tais estratégias têm sido favorecidas pelos avanços nas metodologias de mapeamento de genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e na saturação dos mapas genéticos de diferentes espécies. A maioria dos caracteres de importância econômica estão sob controle genético complexo, envolvendo a ação de vários genes, o que torna difícil sua manipulação e compreensão. No entanto, o mapeamento de QTLs possibilita a dissecação desses caracteres complexos em fatores mendelianos simples, estimando o número e a localização dos fatores que controlam a variação fenotípica da característica avaliada. A identificação de marcadores ligados a genes que conferem resistência a patógenos permite monitorar e acelerar a introgressão destes genes em cultivares comerciais, além de possibilitar a piramidação de dois ou mais genes de resistência em um cultivar comercial (Martin et al., 1991). Marcadores ligados a genes de interesse fornecem um ponto de partida para a clonagem de genes baseada em mapa (Martin et al., 1994).

CONCLUSÕES

O melhoramento genético tem dado inquestionáveis contribuições para o patamar de produtividade das culturas comerciais, e certamente continuará sendo a sustentação de qualquer programa que objetive a obtenção de ganhos genéticos. No entanto, o avanço alcançado pelas técnicas de biologia molecular aliado às informações advindas dos projetos de seqüenciamento e de prospecção gênica apresentam grande potencial para revolucionar o melhoramento genético de plantas, permitindo a seleção de combinações alélicas superiores de uma maneira mais eficaz, rápida e a direcionada. Para que tais técnicas sejam efetivamente implementadas de forma sistemática em programas de melhoramento é necessário uma forte interação entre ambas as áreas. Os elevados custos das técnicas moleculares podem ser reduzidos e otimizados pela formação de redes de laboratórios de genotipagem em larga escala, utilizando protocolos padronizados para a geração e a análise dos dados. Uma série de publicações apresentam revisões mais elaboradas e completas sobre o assunto, além de uma vasta disponibilidade de artigos especializados em todas os tópicos citados acima.

LITERATURA CITADA

- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- DUARTE, J.M; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; PACHECO, C.A.P.; GUIMARÃES, P.E.; PAIVA. Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares para conversão de linhagem de milho normal em QPM. In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro, BA. 2003.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.7, p.1-7, 2001

MARTIN, G.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R.; EARLE, E.D.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v.262, p.1432-1436, 1994.

MARTIN, G.B.; WILLIAMS, J.G.K.; TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance genes in tomato using random primer and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.88, p.2336-2340, 1991.

MEKSEM, K.; RUBEN, E.; HYTEN, D.; TRIWITAYAKORN, K.; LIGHTFOOT, D.A. Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. **Molecular and Genetic Genomics**, v. 265, p.207-214, 2001.

OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G. e BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium, 2, Corvallis Proceedings... Corvallis: Oregon State University. 1994.

PADILHA, L. Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e detmrinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese de Doutorado. UFLA, Lavras. 2002.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.985-993, 1993.

Parentoni, s.n.; magalhães, j.v.; pacheco, c.a.p.; santos, m.x.; abadie, t.; gama, e.e.g.; guimarães, p.e.o.; meirelles, w.f.; lopes, m.a.; vasconcelos, m.j.v.; paiva, e. Heterotic groups based on yield-specific combining ability data and philogenetic relationship determined by RAPD markers for 28 tropical maize open pollinated varieties. **Euphytica**, v.121, n.2, p.197-208. 2001.

TANKSLEY, S.D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T.M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECK-BUNN, 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**, v.92, p.213-224, 1996.

USECHE, F.J.; GAO, G.; HARAFEY, M.; RAFALSKI, A. High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in EST sequences. **Genome Informatics**, v.12, p.194-203, 2001.

VENCOVSKY R., RAMALHO, M.A. P. Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: Paterniani, E. (ed) Agricultura Brasileira e Pesquisa Agropecuária. Embrapa, Brasília, p.57-91. 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p.4407-4414, 1995.

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

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



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
