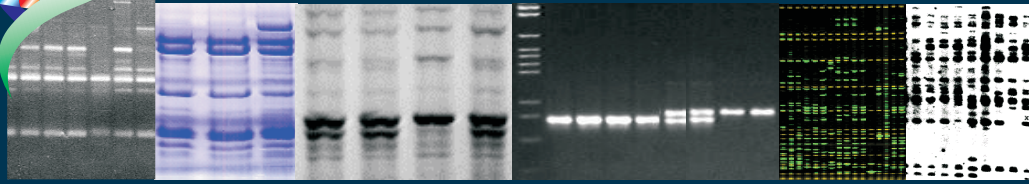




MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES

aplicados a programas de
conservação e uso de
recursos genéticos

Fábio Gelape Faleiro



MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES

aplicados a programas de
conservação e uso de
recursos genéticos

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES

aplicados a programas de
conservação e uso de
recursos genéticos

Fábio Gelape Faleiro

Planaltina, DF
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (final)

CEP 70770-901 Brasília, DF

Fone: (61) 3340-9999

Fax: (61) 3340-2753

vendas@sct.embrapa.br

www.sct.embrapa.br

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rodovia Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 – Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

sac@cpac.embrapa.br

www.cpac.embrapa.br

Supervisão editorial

Maria Helena Gonçalves Teixeira

Revisão de texto

Maria Helena Gonçalves Teixeira

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro

Projeto gráfico e editoração eletrônica

Leila Sandra Gomes Alencar

Capa

Chaile Cherne Soares Evangelista

Fotos da capa

Fábio Gelape Faleiro

Nilton Tadeu Vilela Junqueira

Impressão e acabamento

Embrapa Informação Tecnológica

1ª edição

1ª impressão (2007)

1000 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 Cerrados**

F187m Faleiro, Fábio Gelape.

Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos / Fábio Gelape Faleiro. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2007.

102 p. : il.

ISBN 978-85-7075-035-8

1. Marcador molecular. 2. Biologia molecular. 3. Melhoramento genético. I. Título.

572.838 - CDD 21

© Embrapa 2007

Autor

Fábio Gelape Faleiro

Engenheiro Agrônomo,

Doutor em Genética e Melhoramento

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília-Fortaleza

Cx. Postal 08223 CEP 73301-970, Planaltina, DF

ffaleiro@cpac.embrapa.br

Dedicatória

*A minha amada esposa Alessandra e minha querida filha Giovana.
Aos colegas que trabalham com a conservação e uso
de recursos genéticos no Brasil.*

Agradecimentos

À Escola Estadual Serafim Ribeiro de Rezende 1.4.0.B de Florestal pela base do conhecimento, à Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal pela confirmação de minha vocação agropecuária, à Universidade Federal de Viçosa pela formação profissional, ao Centro de Pesquisas do Cacau pelo primeiro emprego, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela oportunidade de trabalhar com ciência e tecnologia e à sociedade brasileira por ter financiado meus estudos do primário até o doutorado.

Apresentação

Com os avanços na área da genética e biologia molecular, foram e continuam sendo desenvolvidas poderosas técnicas para a obtenção de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais. Nos últimos anos, houve um aumento significativo das metodologias de genética molecular e suas variadas aplicações. Neste livro, é apresentada uma descrição resumida dos principais tipos de marcadores genéticos moleculares e suas aplicações práticas em programas de conservação e uso de recursos genéticos. Foi feita uma boa revisão de literatura, onde vários artigos científicos exemplificam cada aplicação dos marcadores moleculares. Um glossário com termos da genética molecular e dos programas de conservação e uso de recursos genéticos também é apresentado.

Roberto Teixeira Alves
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Prefácio

Este livro apresenta, de forma resumida, os principais tipos de marcadores genético moleculares, o princípio de sua obtenção e análise e algumas das aplicações práticas para resolver problemas e aumentar a eficiência de programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais. A finalidade deste livro é apresentar algumas das potencialidades práticas das técnicas de genética molecular, estimulando a sua utilização, em determinadas situações, por profissionais que trabalham com recursos genéticos vegetais. Pode-se dizer que os marcadores moleculares podem ser úteis em qualquer programa de conservação e uso de qualquer espécie, pelo menos em algumas fases desses programas ou para resolver determinado problema. Vários artigos científicos são citados no livro para exemplificar cada uma das aplicações práticas dos marcadores moleculares e um glossário é apresentado para fazer a interface e esclarecer termos utilizados por profissionais especializados em genética molecular e profissionais especializados em recursos genéticos.

O autor

Sumário

Introdução	17
Principais Marcadores Genético-Moleculares	18
Princípio da Análise dos Marcadores Genético-Moleculares ...	35
Principais Aplicações dos Marcadores Genético-Moleculares nos Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos	40
Análise da distribuição geográfica da variabilidade genética	41
Desenvolvimento de estratégias de amostragem para coleta de recursos genéticos	43
Análise de acessos duplicados ou redundantes	44
Análise da diversidade genética e frequência gênica populacional	45
Estudos de diversidade genética de acessos para subsidiar a escolha de genitores para programas de melhoramento	46
Análise de pureza genética de sementes e contaminação de germoplasma	48
Análise de <i>fingerprinting</i> e testes de paternidade	49
Auxílio em trabalhos de classificação botânica e filogenia	53

Composição e validação de coleções nucleares e de trabalho com base em estudos de diversidade genética	54
Obtenção de marcas moleculares associadas a características agronômicas como subsídio para o estudo da diversidade genética funcional	57
Considerações Finais	59
Glossário	60
Referências - Glossário	86
Referências	87

Introdução

Nos últimos anos, houve aumento significativo de metodologias da genética molecular e suas aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais a outros estudos relativos à conservação e ao uso de bancos de germoplasma.

Com o advento das tecnologias modernas de Genética e da Biologia Molecular, surgiram, por exemplo, diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. O princípio da utilização desses marcadores é baseado no dogma central da Biologia Molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (Figura 1). Entre as vantagens dos marcadores moleculares, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos. Há, ainda, a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes.

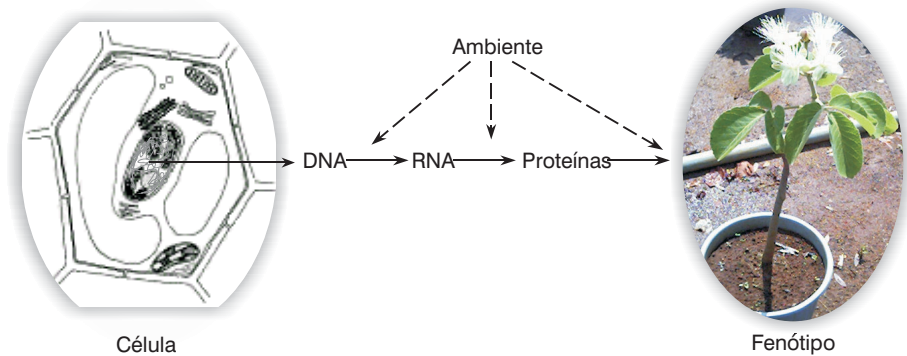


Figura 1. Dogma Central da Biologia Molecular, evidenciando a influência direta do DNA no fenótipo.



As diferentes metodologias da genética molecular têm permitido estudos de evolução, de diversidade genética inter e intra-específica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento.

Neste livro, é apresentada uma descrição resumida das principais técnicas da genética molecular e suas principais aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais.

Principais Marcadores Genético-Moleculares

Nos últimos anos, com os avanços da genética e da biologia molecular, principalmente, o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do seqüenciamento automático do DNA foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais. Há elevado número de artigos científicos que fazem referência a tais marcadores no estudo de várias espécies e com as mais diversificadas aplicações, evidenciando o impacto dessa tecnologia nos programas de conservação e uso dos recursos genéticos (Ayad et al., 1997).

Existem vários questionamentos sobre o uso apropriado das várias tecnologias disponíveis, incluindo questões metodológicas de obtenção e análise dos marcadores genéticos, principalmente, quando são analisados grande número de acessos, questões financeiras relacionadas à infra-estrutura e material de custeio necessário às metodologias e aquelas relacionadas a recursos humanos com treinamento e experiência. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as questões financeiras têm sido as mais importantes.

Para a obtenção de marcadores genético-moleculares, é exigida uma infra-estrutura apropriada para realizar as diferentes fases da metodologia que varia de acordo com o tipo de marcador. De modo geral, são necessários equipamentos para a extração de DNA, amplificação via reação em cadeia da



polimerase (PCR), separação por eletroforese, fotodocumentação e análise estatística dos marcadores gerados (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Na Figura 2, ilustra-se um laboratório de genética e biologia molecular com os principais equipamentos necessários à obtenção de marcadores moleculares. A infraestrutura também depende do número de acessos a serem analisados, sendo que equipamentos mais robustos são fundamentais para análises de grande número de acessos. No início do desenvolvimento das diferentes tecnologias, tanto os equipamentos quanto o material de custeio eram muito caros, contudo, com a concorrência entre as diferentes empresas que fornecem esses equipamentos e material e com a otimização das metodologias com menor gasto material, o preço das análises vem reduzindo a cada ano.



Figura 2. Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados onde se podem ver os equipamentos básicos utilizados na obtenção de marcadores moleculares.

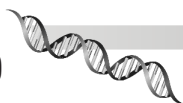


Atualmente, existe grande número de tecnologias da genética molecular que pode ser utilizado para fornecer informações úteis aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Cada tecnologia apresenta vantagens e desvantagens. O uso de uma ou de outra vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infra-estrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada.

Abaixo, uma pequena descrição das principais tecnologias disponíveis para a obtenção de marcadores genético-moleculares:

Isoenzimas – Grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima, resultante de variações alélicas dos genes codificadores. A obtenção de marcadores isoenzimáticos envolve a preparação da amostra do tecido, a separação por eletroforese dos polimorfismos em géis de poliacrilamida ou de amido e a visualização dos polimorfismos por meio de corantes enzimáticos específicos. As principais vantagens dessa técnica são o baixo custo, a facilidade e a rapidez da metodologia, bem como a obtenção de marcadores genéticos co-dominantes, ou seja, marcadores que permitem a diferenciação dos locos em homozigose dos locos em heterozigose. As principais desvantagens são o baixo número dos sistemas enzimáticos polimórficos e a influência das condições ambientais e dos tecidos vegetais nas atividades enzimáticas (Kephart, 1990; May, 1992; Alfenas, 1998).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – RAPDs são fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* curtos (geralmente dez nucleotídeos) de seqüência aleatória (Williams et al., 1990). Outra terminologia usada para esses marcadores é a AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) (Welsh & McClelland, 1990). A obtenção desses marcadores envolve a extração e a amplificação do DNA, eletroforese normalmente em gel de agarose corado com brometo de etídio e fotodocumentação sob luz ultravioleta. As principais vantagens da técnica são a facilidade e a rapidez para obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises.



Pode-se trabalhar com qualquer espécie, uma vez que não há a necessidade de conhecimento prévio de dados de seqüência de DNA para a construção dos *primers* utilizados. As principais desvantagens referem-se à dominância dos marcadores, não diferenciando os locos em heterozigose dos locos em homozigose e à baixa reprodutibilidade das marcas por causa da sensibilidade da técnica às condições experimentais, principalmente, quando elas não estão bem padronizadas (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Faleiro et al., 2004e). Para diminuir os problemas de reprodutibilidade do marcador RAPD, *primers* específicos (15 a 30 pb) podem ser desenhados a partir do seqüenciamento de determinado marcador RAPD ligado a uma característica de interesse do geneticista, de modo a produzir marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) (Paran & Michelmore, 1993; Corrêa et al., 2000).

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) – RFLPs são fragmentos de DNA obtidos de enzimas de restrição, separados por eletroforese, e visualizados por meio de hibridizações com sondas de seqüências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência. Marcadores RFLP podem ser obtidos de diferentes genes ou regiões genômicas, inclusive, de DNA ribossomal (rDNA) de mitocôndria (mtDNA), cloroplasto (cpDNA) (Awise, 1993). As etapas para a aquisição de RFLPs envolvem a extração do DNA, digestão com endonucleases de restrição, eletroforese, transferência dos fragmentos para uma membrana de *nylon*, hibridização dos fragmentos com sondas marcadas e visualização dos polimorfismos, normalmente, por auto-radiografia. As principais vantagens da técnica são a co-dominância dos marcadores e a alta reprodutibilidade deles. As desvantagens são a exigência de grande quantidade e qualidade do DNA a ser analisado, necessidade de sondas específicas para a hibridização e o fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara quando comparada a outras técnicas (Tanksley, 1983; Neale & Williams, 1991; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Microssatélites – Microssatélites são unidades muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em *tandem*, ou seja, uma após a outra. Os marcadores microssatélites são conhecidos, também, como SSR (*Simple Sequence Repeats*). A obtenção dos marcadores envolve a amplificação dos



microssatélites via PCR, utilizando-se *primers* específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites. Nesse sentido, para se conseguir marcadores microssatélites, é necessário, primeiramente o desenvolvimento dos *primers* específicos para a espécie em estudo. Esse desenvolvimento requer a construção de bibliotecas genômicas, seleção e seqüenciamento dos clones positivos e desenho dos *primers*. Tais *primers*, em alguns casos, podem ser utilizados para obtenção de marcadores microssatélites em espécies geneticamente relacionadas (Faleiro et al., 2003d). Uma vez desenvolvidos os *primers* específicos, as etapas de obtenção são parecidas com as utilizadas para marcadores RAPD: extração e amplificação via PCR do DNA, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por auto-radiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose). As principais vantagens dos marcadores microssatélites são a co-dominância dos marcadores, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado, a alta reprodutibilidade das marcas e a possibilidade de detecção de vários microssatélites (multiplex) no mesmo gel facilitando a operacionalização das análises, principalmente, quando é necessária a análise de grande número de acessos. As principais desvantagens são o alto custo requerido no desenvolvimento de *primers* específicos, quando eles não estão disponíveis para a espécie a ser estudada e o fato de bandas inespecíficas ou géis de baixa resolução poderem dificultar a acurada avaliação dos polimorfismos (Litt & Luty, 1989; Morgante & Olivieri, 1993; Queller et al., 1993; Faleiro et al., 2004e).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Os AFLPs são fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. Esse tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD e RFLP. As etapas de obtenção envolvem a extração do DNA, digestão com endonucleases de restrição, ligação de adaptadores, amplificação seletiva via PCR, eletroforese em géis de alta resolução e visualização dos fragmentos por auto-radiografia, coloração com prata ou fluorescência (Vos et al., 1995). As principais



vantagens dos AFLPs são a geração de grande número de polimorfismos por reação e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de seqüência de DNA para a construção dos *primers* utilizados (Faleiro et al., 2001). As desvantagens são a dominância dos marcadores, o alto custo e as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Minissatélites – Minissatélites são unidades de 10 a 100 pb repetidas em *tandem*, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição. Também são conhecidos por VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*). As etapas de obtenção envolvem a extração e digestão do DNA com endonucleases de restrição, transferência dos fragmentos para uma membrana de *nylon*, hibridização dos fragmentos com sondas de minissatélites marcadas e visualização dos polimorfismos, normalmente, por auto-radiografia (Jeffreys et al. 1985; Dallas, 1988). As principais vantagens desse tipo de marcador são a alta reprodutibilidade das marcas e a geração de muitas bandas informativas por reação (no caso de sondas para vários locos). As desvantagens são relacionadas à dominância dos marcadores (no caso de sondas para vários locos) e ao fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara, à semelhança dos marcadores RFLP (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) – CAPS são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de *primers* específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão com endonucleases de restrição (Williams et al., 1991). Esse tipo de marcador genético é também conhecido como PCR-RFLP (Hela et al., 2004). As etapas para a obtenção desses marcadores são a extração e amplificação de DNA via PCR, a digestão com enzimas de restrição, eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida e a visualização dos polimorfismos pela coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta ou com prata. As principais vantagens são a co-dominância e a alta reprodutibilidade dos marcadores e a principal desvantagem é a necessidade de conhecimento prévio de seqüência de DNA para a construção dos *primers*. A vantagem do PCR-RFLP em relação ao RFLP é que o primeiro não requer o tempo e os reagentes necessários às etapas de hibridização e visualização por auto-radiografia.



SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)- SSCP's são fragmentos de DNA de 200 a 800 pb amplificados via PCR usando *primers* específicos, desnaturados para fita simples e separados por eletroforese. O princípio desse tipo de marcador é que a eletroforese da fita simples do DNA permite a detecção da variação da seqüência de nucleotídeos de cada fragmento, responsável por sua estrutura secundária. Uma variação dessa técnica é a chamada DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electroforesis*) que utiliza géis desnaturantes usando concentrações de formamida e uréia. O procedimento metodológico para obtenção de SSCP's envolve a extração e a amplificação do DNA, a desnaturação dos fragmentos amplificados para fita simples, a separação dos fragmentos por eletroforese em géis de poliacrilamida e a visualização dos polimorfismos pela coloração com prata ou auto-radiografia (Hayashi, 1992). As principais vantagens dos SSCP's são a baixa quantidade de DNA requerida para as análises e a co-dominância dos marcadores. As desvantagens são a necessidade do conhecimento prévio de seqüência para a construção dos *primers* e a falta de reprodutibilidade quando as condições da eletroforese não estão bem padronizadas.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – ISSRs são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de seqüência de microssatélites. As etapas de obtenção desses marcadores são a extração e amplificação via PCR do DNA, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por auto-radiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose). As principais vantagens dos ISSR são a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de dados de seqüência de DNA para a construção do *primer* utilizado. A principal desvantagem é a dominância dos marcadores (Zietkiewicz et al., 1994; Godwin et al., 1997).

PCR-sequencing – Esse tipo de marcador genético-molecular envolve a determinação da seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado via PCR utilizando *primers* específicos (15 a 30 pb) para dada



região do genoma em estudo. Para a determinação da seqüência de nucleotídeos, existem hoje os seqüenciadores automáticos muito utilizados nos projetos genoma. Normalmente, dentro da mesma espécie não há muitas variações na seqüência de nucleotídeos e, por isso, o *PCR-sequencing* é mais útil em estudos taxonômicos interespecíficos, como por exemplo, estudos de reconstrução filogenética. As principais vantagens desse marcador genético são a alta reprodutibilidade e o nível de detalhamento do fragmento de DNA a ser estudado. As principais desvantagens são o baixo nível de variação em estudos intra-específicos e o custo da técnica.

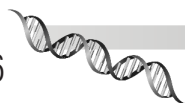
Marcadores baseados em retrotransposons – Os *retrotransposons* compreendem a classe mais comum de *transposons* e ocorrem em grande número de cópias em genomas de plantas. Vários desses elementos têm sido seqüenciados e tem sido verificado alto grau de polimorfismos intra e interespecífico. Como as inserções de *retrotransposons* são irreversíveis e ocorrem ao longo de todo genoma, os marcadores baseados nessas seqüências são considerados particularmente úteis em estudos filogenéticos e para o mapeamento genético. Os *retrotransposons* são freqüentemente observados em regiões adjacentes a genes de plantas já conhecidos e consistem em longas seqüências repetidas com região terminal altamente conservada. Tal região tem sido utilizada para o anelamento de *primers* específicos e desenvolvimento dos marcadores baseados em *retrotransposons*. Várias técnicas têm sido desenvolvidas, entre elas: S-SAP (*Sequence-Specific Amplified Polymorphism*) (Waugh et al., 1997), IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) (Kalendar et al., 1999), REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) (Kalendar et al., 1999) e RBIP (*Retrotransposon Based Insertional Polymorphism*) (Flavell et al., 1998).

Marcadores baseados em genômica funcional – A disponibilidade de seqüências gênicas tem aumentado muito nos últimos anos com o desenvolvimento dos projetos genoma. Tais seqüências têm estimulado o desenvolvimento de marcadores moleculares direcionados aos genes de interesse. Esses marcadores são particularmente úteis na avaliação de germoplasma, no estudo de diversidade funcional e na seleção assistida por

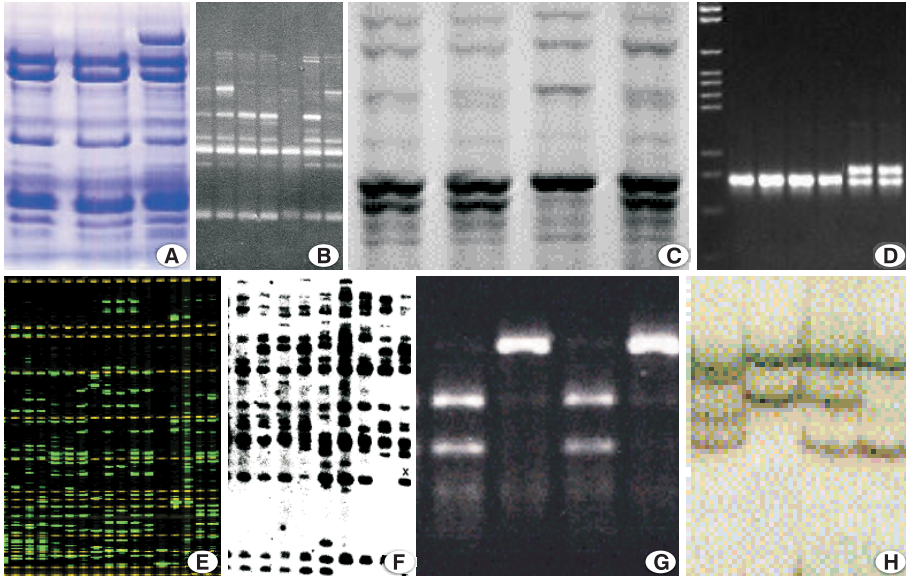


marcadores moleculares em programas de melhoramento genético. Entre os marcadores baseados em genômica funcional, podem-se citar os marcadores baseados em seqüências conservadas de genes de resistência como a NBS (*Nucleotide Binding Site*) e a LRR (*Leucine Rich Repeat*) (Chen et al., 1998; Sicard et al., 1999) e aqueles originados da tecnologia do *chip* de DNA, baseados na hibridização entre sondas e seqüências complementares de *microarrays* (microarranjos) de DNA que podem corresponder a mais de 250.000 seqüências ou características por cm². As aplicações dessa última técnica incluem diagnose de mutações, detecção de polimorfismos, descoberta de genes, estudos de expressão gênica e mapeamento genético (Lemieux et al., 1998; Ramsay, 1998).

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) – SNPs são marcadores moleculares do DNA utilizados para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo (Cho et al., 1999). Os polimorfismos de seqüência nucleotídica (SNP) são fontes abundantes de variação genética, sendo gerados por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção e deleção. Esse tipo de marcador genético é muito interessante para estudos filogenéticos de evolução dentro da espécie (Wolters et al., 2000), mapeamento genético e, principalmente, na diferenciação de alelos do mesmo gene (Melloto & Kelly, 2001, Quirino, 2003). Muitas vezes, a substituição de um único nucleotídeo leva à substituição do aminoácido na proteína e, em conseqüência, à perda da funcionalidade dela e à modificação fenotípica (Soori et al., 1999). As etapas de obtenção desses marcadores envolvem o conhecimento prévio de seqüência do gene de interesse para o desenho de *primers* e sondas específicas. Normalmente, com tais informações, são feitas etapas de amplificação, clonagem e seqüenciamento de fragmentos dos genes de interesse em diferentes indivíduos. As seqüências obtidas são analisadas considerando os SNPs. A principal vantagem dos SNPs, em comparação a outros marcadores, é a possibilidade de detecção de grande quantidade de polimorfismos entre alelos de determinado gene. As principais desvantagens são a necessidade de conhecimento prévio de seqüência do gene de



interesse e o custo/infra-estrutura da técnica envolvido nas etapas necessárias ao seqüenciamento dos diferentes fragmentos do DNA de interesse.



Na Figura 3, ilustram-se alguns dos padrões de polimorfismos de determinados marcadores genéticos descritos neste livro.

Figura 3. Polimorfismos dos marcadores genético-moleculares: isoenzimas (A), RAPD (B), RFLP (C), microssatélites (D), AFLP (E), minissatélites (F), CAPS (G) e SSCP (H).

Na Literatura, são citados outros tipos de marcadores genéticos como DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), MAA (*Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*), SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphisms*), STMS (*Sequence Tagged Microsatellites*), DAMD (*Directed Amplification of Minisatellite-region DNA*), SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*), TGGE (*Thermal Gradient Gel Electrophoresis*), SFLA (*Selective Fragment Length Amplification*), SRFA (*Selective Restriction Fragment Amplification*) cujos princípios são idênticos ou muito semelhantes aos marcadores genético-moleculares descritos neste livro. Um resumo das principais características dos marcadores genético-moleculares referenciados no trabalho é feito na Tabela 1.



Tabela 1. Marcadores genético-moleculares e suas principais características.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
Isoenzimas	Grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas. As diferentes isoenzimas são resultantes de variações alélicas dos genes codificadores	Co-dominante	Não	<i>Fingerprinting</i> e diversidade genética
RAPD	Vem do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> , ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso. São fragmentos de DNA amplificados pela PCR utilizando <i>primers</i> curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória. Como o <i>primer</i> possui sequência aleatória, a sequência alvo da amplificação é desconhecida	Dominante	Não	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético
RFLP	Vem do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , ou seja, polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição. São fragmentos de DNA obtidos com o uso de enzimas de restrição, separados por eletroforese e visualizados por meio de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, <i>fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético

Continua...

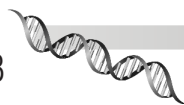


Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
Microsatélites SSR/SSLP / STMS	Marcadores microsatélites ou SSR (<i>Simple Sequence e Repeats</i>) ou SSLP (<i>Simple Sequence Length Polymorphisms</i>) ou STMS (<i>Sequence Tagged Microsatelites</i>) são sequências de DNA muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em <i>tandem</i> (lado a lado) cuja detecção é feita pela PCR, utilizando <i>primers</i> específicos	Co-dominante	Sim	Mapeamento genético, <i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, análise filogenética
AFLP / SFLA / SRLA	Marcador AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>) ou SFLA (<i>Selective Fragment Length Amplification</i>) ou SRLA (<i>Selective Restriction Fragment Amplification</i>) são polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados. São fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos da digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. Esse tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD (<i>ver</i>) e RFLP (<i>ver</i>)	Dominante	Não	Mapeamento genético, diversidade genética e <i>fingerprinting</i>
Minissatélites / VNTRs	Marcadores minissatélites ou VNTRs (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>) são sequências do DNA de 10 a 100 pb repetidas em <i>tandem</i> (lado a lado). O número de repetições de tais sequências em cada região	Co-dominante / Dominante (no caso de sonda para vários locos)	Sim	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, análise filogenética

Continua...



Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
CAPS/ PCR-RFLP	hipervariável pode chegar a 50. As regiões hipervariáveis estão distribuídas por todo genoma, constituindo vários locos nos diferentes cromossomos			
	Vem do inglês <i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i> , ou seja, sequência polimórfica amplificada e clivada. São fragmentos de DNA amplificados via da digestão com endonucleases de restrição. É um tipo de marcador genético-molecular também conhecido como PCR-RFLP	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, <i>fingerpringing</i> , diversidade genética, mapeamento genético
SSCP/ DGGE/ TGGE	Vem do inglês <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> . São fragmentos de DNA de 200 a 800 pb amplificados via PCR usando <i>primers</i> específicos os quais são desnaturados para fita simples e separados por eletroforese. O princípio desse tipo de marcador é que a eletroforese da fita simples do DNA permite a detecção da variação da sequência de nucleotídeos de cada fragmento, responsável por sua estrutura secundária. As técnicas de DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>) e TGGE (<i>Thermal Gradient Gel Electrophoresis</i>) são utilizadas na obtenção desses marcadores	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, <i>fingerpringing</i> , diversidade genética

Continua...

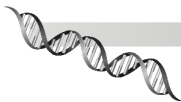


Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de seqüência	Principais aplicações
ISSR	Vem do inglês <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> . São fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR usando um único <i>primer</i> (16-20 pb) construído a partir de seqüência de microssatélites	Dominante	Não	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, análise filogenética
PCR sequencing	Este tipo de marcador genético-molecular envolve a determinação da seqüência de nucleotídeos de um fragmento de DNA amplificado via PCR utilizando <i>primers</i> específicos (15 a 30 pb) para determinada região do genoma em estudo	Seqüência de nucleotídeos	Sim	Taxonomia, interespecífica Análise filogenética
S-SAP	Vem do inglês <i>Sequence-Specific Amplified Polymorphism</i> . É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em fragmentos de DNA que flanqueiam sítios de inserção de <i>retrotransposons</i> . Os fragmentos são amplificados via PCR usando um <i>primer</i> desenhado a partir das regiões de terminação conservadas (LTRs - <i>Long Terminal Repeats</i>) e outro baseado na presença de um sítio de endonucleases de restrição próximo às LTRs.	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético
IRAP	Vem do inglês <i>Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism</i> . É um tipo de marcador molecular	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético

Continua...



Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
	baseado na detecção de variação em sítios de inserção de <i>retrotransposons</i> . Fragmentos de DNA são amplificados via PCR usando <i>primers</i> desenhados a partir das regiões de terminação conservadas (LTRs - <i>Long Terminal Repeats</i>)			genético
REMAP	Vem do inglês <i>Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism</i> . É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em sítios de inserção de <i>retrotransposons</i> . Fragmentos entre <i>retrotransposons</i> e microssatélites são amplificados via PCR usando um <i>primer</i> baseado nas regiões de terminação conservadas (LTRs - <i>Long Terminal Repeats</i>) e outro baseado em regiões de microssatélites	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético
RBIP	Vem do inglês <i>Retrotransposon Based Insertional Polymorphism</i> . É um tipo de marcador molecular amplificado via PCR utilizando <i>primers</i> desenhados a partir de <i>retrotransposon</i> e suas regiões flangeadoras. A presença ou a ausência da inserção de <i>retrotransposons</i> é investigada com base em duas PCRs: a primeira PCR usando um <i>primer</i> desenhado a	Co-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético

Continua...



Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
Genômica funcional	partir do <i>retrotransposon</i> e outro a partir de uma região flaqueadora e a segunda PCR usando <i>primers</i> desenhados a partir das duas regiões flaqueadoras É um tipo de marcador molecular do DNA utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados em informações de sequenciamento do DNA para o desenho de <i>primers</i> e sondas específicas. Entre esses marcadores, podem-se citar aqueles baseados em sequências conservadas de genes de resistência como a NBS (<i>Nucleotide Binding Site</i>) e a LRR (<i>Leucine Rich Repeat</i>) e aqueles baseados na tecnologia do <i>chip</i> de DNA os quais são baseados na hibridização entre sondas e sequências complementares de <i>microarrays</i> (microarranjos) de DNA.	Sequência de nucleotídeos	Sim	Diversidade funcional, mapeamento genético, estudos de expressão gênica
SNP	Vem do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> . É um tipo de marcador molecular do DNA utilizado para funcional, análise filogenética identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo, necessitando de informações de sequenciamento do DNA para o desenho de <i>primers</i> e sondas específicas	Sequência de nucleotídeos	Sim	Diversidade

Continua...

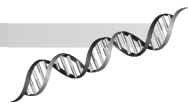
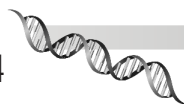


Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / Base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
DAF	Vem do inglês <i>DNA Amplification Fingerprinting</i> . É uma estratégia para detecção de diferenças genéticas entre organismos por meio da amplificação do DNA genômico, utilizando-se um único <i>primer</i> de sequência arbitrária	Dominante	Não	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético
MAAP	Vem do inglês <i>Multiple Arbitrary Amplicon Profiling</i> . É um termo coletivo para as técnicas de PCR que utilizam <i>primers</i> de sequência arbitrária, como os marcadores RAPD, AFLP, DAF, entre outros.	Dominante	Não	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético
DAMID	Vem do inglês <i>Directed Amplification of Minisatellite-region DNA</i> . É uma técnica de obtenção de marcadores genético-moleculares, amplificados via PCR, usando um único <i>primer</i> (16-20 pb) construído a partir de sequência de minissatélites	Dominante	Sim	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético
SPAR	Vem do inglês <i>Single Primer Amplification Reaction</i> , ou seja, reação de amplificação com <i>primer</i> único. É uma técnica para obtenção de marcadores genético-moleculares do DNA por meio da amplificação via PCR usando um único <i>primer</i> (16-20 pb) construído a partir de sequência de microsatélites	Dominante	Sim	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético



Princípio da Análise dos Marcadores Genético-Moleculares

Embora exista grande número de marcadores genético-moleculares, o princípio da análise desses marcadores é o mesmo: marcadores comuns aos acessos significam semelhança genética e marcadores não-comuns significam diferenças genéticas. Os dados sobre semelhança e diferença genética entre acessos de determinado banco de germoplasma permitem gerar grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos entre eles. Cada tipo de tecnologia da genética molecular permite a obtenção de grande número de marcadores genético-moleculares que representa uma amostra considerável do genoma de cada acesso sem influência do ambiente. Na maioria das análises realizadas, cada marcador genético-molecular representa um caráter fenotípico distinto e independente dos demais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O primeiro passo para a análise dos marcadores genético-moleculares é a codificação dos fragmentos moleculares em dados binários (no caso de marcadores dominantes) ou dados de coincidência alélica (no caso de marcadores co-dominantes). Os dados para marcadores dominantes, normalmente, são codificados como 1 (presença do marcador) e 0 (ausência do marcador). Os dados para marcadores co-dominantes normalmente são codificados como zero (ausência de alelos comuns no loco), $\frac{1}{2}$ (um alelo comum no loco) e 1 (os dois alelos comuns no loco). No caso de marcadores baseados na seqüência de nucleotídeos, a codificação é a própria seqüência de nucleotídeos, representada pelas quatro diferentes bases nitrogenadas do DNA (Adenina, Timina, Citosina e Guanina).

O segundo passo é utilizar os dados codificados para a estimativa de índices de similaridade ou de distância genética entre cada par de acessos. Existem vários índices descritos na literatura, como o índice de similaridade de Gower (1971) Sneath & Sokal (1973), Nei & Li (1979), também citado como coeficiente de similaridade de Jaccard, entre outros. Normalmente, os coeficientes de correlação entre os diferentes índices são muito altos (Corrêa



et al., 1999), embora existam algumas diferenças importantes entre eles (Dias, 1998). No caso de marcadores baseados na seqüência de nucleotídeos de determinado fragmento de DNA, os índices de similaridade ou de distância são calculados com base na homologia de seqüência (Kimura, 1980).

Com base nos índices, estabelece-se uma matriz de similaridade ou de distâncias entre os acessos a qual vai servir de base para as análises de agrupamento e de dispersão dos acessos (Figura 4). As análises de agrupamento normalmente são baseadas em métodos hierárquicos que podem utilizar diferentes critérios de agrupamento: vizinho mais próximo (*single linkage*), vizinho mais distante (*complete linkage*) e baseado na média das distâncias (*unweighted pair-group method using arithmetic average*). Dias (1998) descreve a aplicação de cada um desses critérios discutindo sobre as vantagens e desvantagens de cada um. No caso da análise de dispersão dos acessos, o método mais utilizado é aquele baseado em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais. Esse método tem sido denominado análise de coordenadas principais (*PCDA – principal coordinates analysis*) (Gower, 1966) e também é discutido por Dias (1998).

Na Figura 4, indicam-se as etapas e os procedimentos mais utilizados para as análises de marcadores genético-moleculares. A realização desses procedimentos seria quase impossível sem a ajuda computacional, sobretudo, quando vários acessos são analisados simultaneamente. Existem vários *softwares* disponíveis para a análise de marcadores moleculares, entre eles o GENES (Cruz, 1997), o STATISTICA (StatSoft, 1999), o NTSYS (Rohlf, 1992), o GQMOL (Cruz & Schuster, 2000), o SPSS (Norusis, 1993) e o SAS (SAS Institute, 1989) (Figura 5). As diferenças entre os vários *softwares* disponíveis estão relacionadas aos procedimentos e à abrangência das análises, aos formatos dos arquivos utilizados como entrada de dados, à robustez, à linguagem de programação e à qualidade gráfica dos resultados ou saída dos dados. Há, ainda que se destacar a facilidade ou não da utilização dos procedimentos de análises disponíveis na interface com o usuário. Embora o uso de cada *software* seja considerado difícil para os iniciantes, a maioria dos manuais ou sistemas de ajuda é didática e contém exemplos de cada procedimento de análise, facilitando, dessa forma, sua utilização.



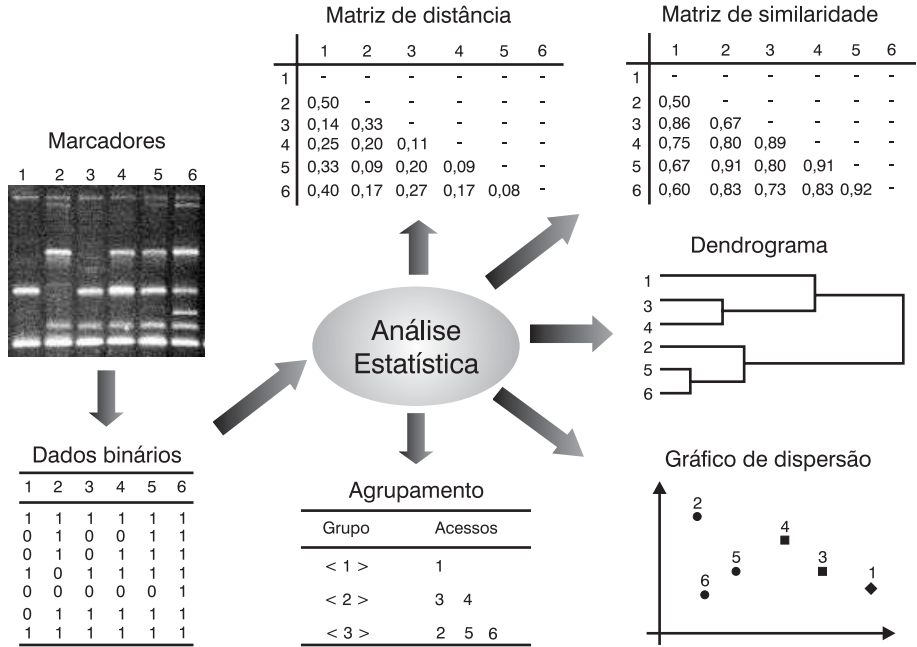


Figura 4. Etapas e os procedimentos mais utilizados para as análises de marcadores genético-moleculares.

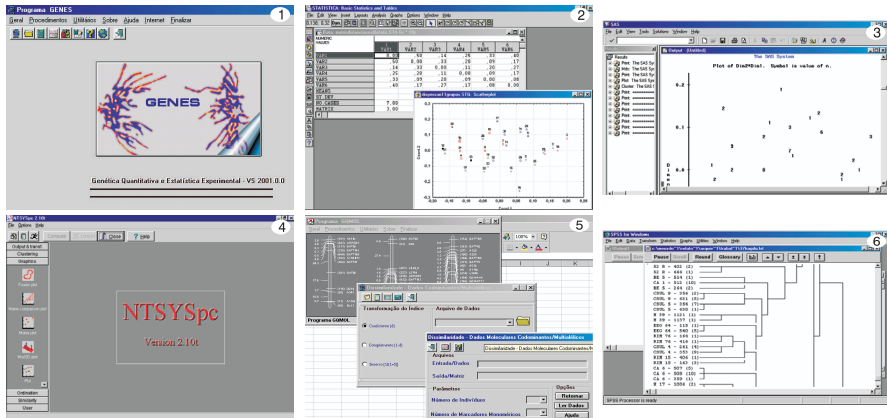


Figura 5. Interface de alguns softwares utilizados para a análise de marcadores moleculares: 1. Genes, 2. Statistica, 3. SAS, 4. NTSYS, 5. GqMol e 6. SPSS.

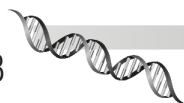


Os métodos analíticos e a interpretação dos dados moleculares em relação à genética de populações, à filogenia, à evolução e suas diferentes aplicações exigem procedimentos de análise multivariada e dependem do tipo do marcador molecular que está sendo utilizado e do objetivo do trabalho (Avice, 1993; Hartl & Clark, 1989).

Em relação ao tipo de marcador, é importante diferenciar aqueles que fornecem dados de um único loco (Por exemplo: *PCR/DNA sequencing*) daqueles que fornecem dados multilocos obtidos de múltiplas regiões gênicas (Por exemplo: RAPD, AFLP, Minissatélites). Essa diferenciação é importante, pois a quantidade da informação acessada influencia as interpretações dos dados.

Na definição dos marcadores genético-moleculares mais apropriados, deve-se levar em conta o objetivo do estudo (Avice, 1993). De modo geral, marcadores moleculares multilocos utilizados em DNA *fingerprinting* (Por exemplo: RAPD, AFLP, Microsatélites, Minissatélites) são mais apropriados para estudos de identidade genética, testes de paternidade e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie. Marcadores baseados em comprimentos de fragmentos de restrição como os RFLPs obtidos de mtDNA, cpDNA, rDNA são mais apropriados para estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas. Marcadores baseados em análises de seqüências (Por exemplo: *PCR sequencing*) são apropriados para análises de espécies com alto nível de divergência evolucionária, embora possam ser utilizados para análises de espécies ou acessos com qualquer nível de divergência evolucionária (Figura 6).

A flexibilidade dos marcadores *PCR sequencing* para estudos em diferentes níveis de divergência evolucionária deve-se à existência de diferentes genes ou regiões gênicas com diferenciadas taxas de substituição de nucleotídeos (Avice, 1993), de modo que, dependendo do nível de divergência evolucionária que se deseja investigar, seqüências de regiões gênicas ou genes mais apropriados podem ser escolhidas para a realização do estudo.



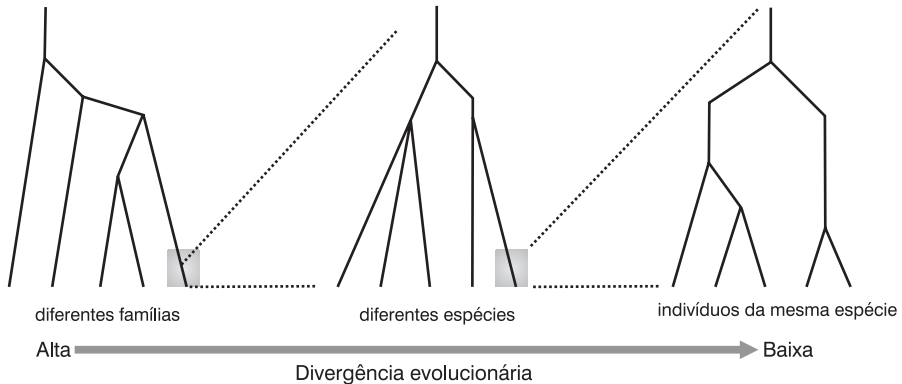


Figura 6. Diferentes níveis de divergência evolucionária.

A análise dessas seqüências para estudos filogenéticos é baseada na homologia de seqüências de diferentes indivíduos, populações, espécies, gêneros. Os resultados dessas análises podem gerar matrizes de distâncias e suas variações estatísticas (Figura 4), bem como permitir a realização de algoritmos de análise filogenética baseados no princípio de agrupamento de Hennigan (Avice, 1993) ou em análises de parcimônia, como a parcimônia de Wagner (Farris, 1970), de Camin-Sokal (Camin & Sokal, 1965) e a parcimônia generalizada (Swofford & Olsen, 1990).

Os diferentes procedimentos estatísticos permitem que a reconstrução filogenética possa ser realizada utilizando construções gráficas baseadas em unidades de distância ou em unidades de tempo (Figura 7).

A análise em unidades de tempo pode ser baseada, por exemplo, na porcentagem de substituição de nucleotídeos em determinada seqüência, comparando diferentes indivíduos, populações, espécies, gêneros. Nesse caso, os marcadores moleculares, baseados em análises de seqüências, são mais apropriados, entretanto, existem metodologias para estimar a diversidade de nucleotídica a partir de marcadores moleculares baseados na PCR, como os RAPD (Clark & Lanigan, 1993). Na metodologia descrita por Clark & Lanigan (1993), usa-se a freqüência de indivíduos com ausência de um fragmento para estimar a freqüência de homozigotos recessivos e assim a freqüência gênica e a diversidade nucleotídica. Tal metodologia foi utilizada



com sucesso por Carvalho & Schaal (2001). A ajuda computacional para a realização dessas análises também é essencial, considerando-se a grande quantidade de dados moleculares.

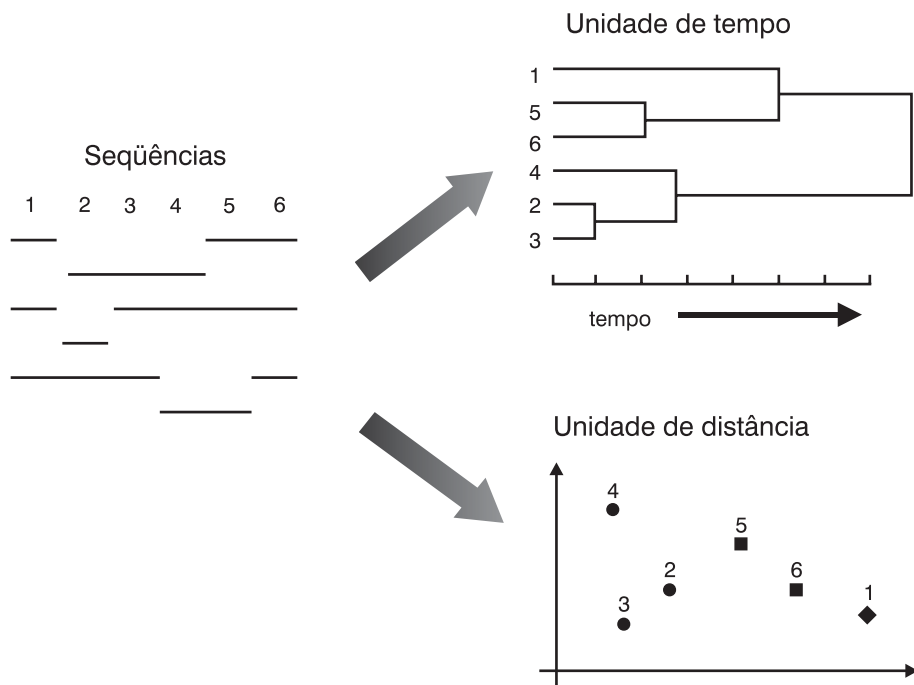


Figura 7. Análises de seqüências de DNA com representações gráficas em unidades de tempo e em unidades de distância.

Principais Aplicações dos Marcadores Genético-Moleculares nos Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos

Os marcadores genético-moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a freqüência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado germoplasma. Tais informações são muito úteis nas diferentes estratégias de conservação dos recursos genéticos como a *ex situ*, *in situ* e *on*



farm. Em cada estratégia, os marcadores moleculares podem auxiliar nas diferentes etapas, como a coleta, manutenção, caracterização, manejo, ampliação e uso dos recursos genéticos.

As informações moleculares podem complementar as informações ecológicas, morfológicas e agrônômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, direcionar o enriquecimento da base genética, formar e validar coleções nucleares e de trabalho, analisar a diversidade e a pureza genética, identificar acessos duplicados e redundantes, auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia, subsidiar a seleção de genitores, o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento genético.

A seguir, são discutidas e exemplificadas as principais aplicações dos marcadores genético-moleculares nos programas de conservação e uso dos recursos genéticos.

Análise da distribuição geográfica da variabilidade genética

O princípio dessa aplicação dos marcadores moleculares é confrontar a variabilidade genética molecular com a distribuição geográfica de vários acessos do germoplasma. Para a análise da distribuição geográfica, informações de latitude e longitude do local de coleta de cada acesso podem ser plotadas conjuntamente com mapas do Sistema de Informação Geográfica (SIG) (Brasil, 1981) com o auxílio do programa ArcView GIS (www.esri.com) (Costa, 2004). Dessa forma, descritores ecológicos do local de coleta de cada acesso, como o tipo de vegetação, tipo de solo, estado, município, bacia hidrográfica, pluviometria média, entre outros podem ser obtidos. Na Figura 8, mostram-se alguns mapas do SIG utilizados para a obtenção de descritores ecológicos e, na Figura 9, ilustra-se a distribuição geográfica de acessos de *Stylosanthes macrocephala* salientando regiões onde foram coletados acessos com maior diversidade genética entre si, segundo dados de Costa (2004).



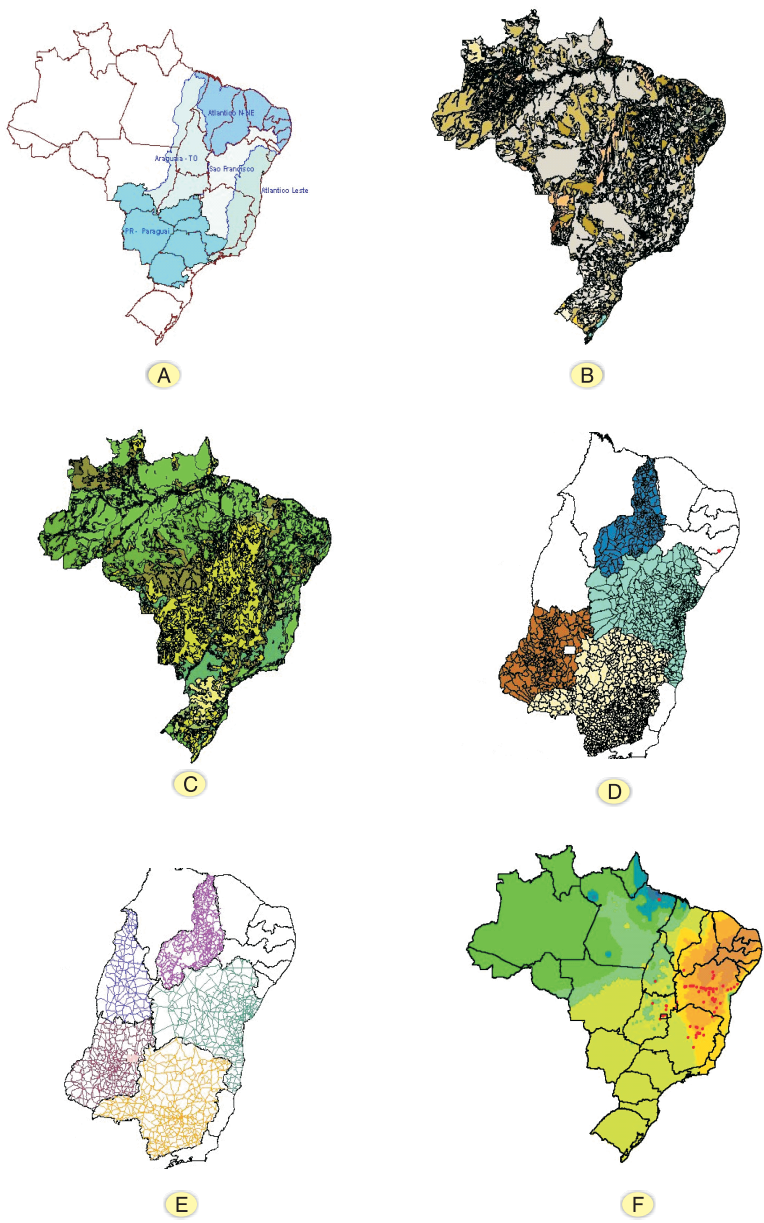


Figura 8. Mapas do Sistema de Informação Geográfica referentes a Bacias Hidrográficas (A), Solos (B), Vegetação (C), Municípios (D), Estradas de Rodagem (E) e Pluviometria Média (F).

Marcadores moleculares associados a sistemas de informação geográfica têm permitido estudos da diversidade genética de acessos por regiões, identificação de regiões de maior ou menor diversidade (Olsen & Schaal, 1999; Carvalho et al., 2000c; Costa, 2004) e a recuperação de informações importantes sobre as condições ambientais e biológicas dos locais de coleta de cada acesso (Greene et al., 1999; Guarino et al., 2002). Essas informações são complementares aos dados fenotípicos e geográficos e têm orientado a escolha de locais para conservação *in situ*, atividades de coleta para conservação *ex situ* e a busca de combinações gênicas de interesse para programas de melhoramento genético (Rick et al., 1974; Zimmerer & Douches, 1991; Huang et al., 1998; Costa, 2004; Faleiro et al., 2004e).

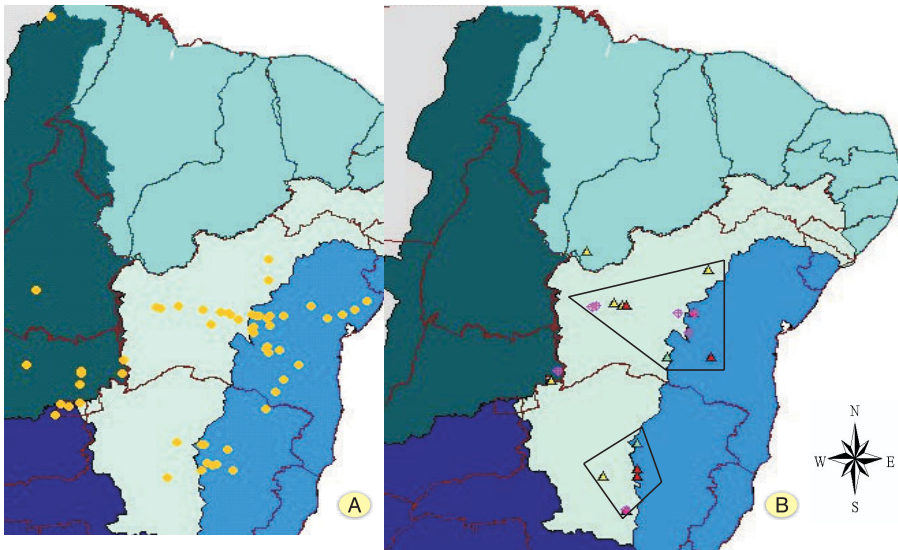


Figura 9. Distribuição geográfica de acessos de *Stylosanthes macrocephala* com baixa (A) e alta (B) diversidade genética entre si.

Fonte: Costa (2004).

Desenvolvimento de estratégias de amostragem para coleta de recursos genéticos

A coleta de recursos genéticos é uma etapa básica e de grande importância para os programas de conservação e uso de recursos genéticos



realizada por meio de expedições, com o objetivo de resgatar plantas ou populações de plantas de interesse. Normalmente, em uma expedição, plantas são resgatadas por meio de sementes e/ou mudas e em geral, procura-se amostrar com eficiência a diversidade genética existente. A escolha inadequada dos locais de coleta pode fazer com que não haja uma boa representatividade da variabilidade genética que precisa ser conservada e utilizada.

Estudos da diversidade genética molecular de acessos ou populações em diferentes regiões podem fornecer informações importantes sobre estratégias de amostragem para realização de eficientes trabalhos de coleta (número de acessos, tamanho de cada população, análise quantitativa e qualitativa das regiões onde serão feitas as coletas) (Lamboy et al., 1994; 1996; Ceska et al., 1997; Zoro Bi et al., 1998; Nebauer et al., 1999).

Análise de acessos duplicados ou redundantes

Em coleções-base, de trabalho e bancos ativos de germoplasma, a presença de acessos duplicados ou redundantes, em conjunto com problemas de sinonímia, homonímia e erros de identificação, dificultam a transferência de resultados e recomendações entre diferentes programas de melhoramento e aumentam o gasto de tempo e recursos para a conservação e avaliação do potencial genético dos acessos. Tais problemas são agravados em bancos de germoplasma de plantas perenes mantidas em condições de campo em áreas extensas que implicam árduo trabalho nas atividades de manutenção e avaliação (Figura 10).

Marcadores moleculares têm sido utilizados para eliminar ou diminuir tais problemas, sendo exemplos: a análise de acessos duplicados ou redundantes em bancos ativos e coleções de trabalho de cacaueteiro (Faleiro et al., 2002), de amendoim forrageiro (Faleiro et al., 2003a), alface (Waycott & Fort, 1994), cevada (Hintum & Visser, 1995); arroz (Virk et al., 1995); couve-flor (Hintum et al., 1996); uva (Cervera et al., 1998); mandioca (Chavarriga-Aguirre et al., 1999); sorgo (Dean et al., 1999); batata (McGregor et al., 2002), entre outras culturas.

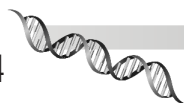




Figura 10. Realização de tratos culturais em banco ativo de germoplasma de cacauero, Itabuna, BA.

Foto: Centro de Pesquisas do Cacau.

Análise da diversidade genética e freqüência gênica populacional

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis têm capacidade de analisar de forma ampla genomas de interesse, sem influência do ambiente e, dessa forma, gerar informações precisas sobre a diversidade genética e a freqüência gênica populacional (Hartl & Clark, 1989; Ouborg et al., 1999). Tais informações são bastante úteis em todas as fases dos programas de conservação de recursos genéticos, passando pela coleta (Del Rio et al., 1997a), conservação (Wu et al., 1998), manutenção (Reedy et al., 1995; Spagnoletti-Zeuli et al., 1995;) e manejo (Del Rio et al., 1997a) das coleções, além de facilitar o uso do germoplasma em programas de melhoramento genético (Abdelnoor et al., 1995; Karp et al., 1997; Faleiro et al., 2004c).



As informações de diversidade genética e a frequência gênica obtidas com o uso dos marcadores moleculares geram grande quantidade de características adicionais que podem ser combinadas a dados de *pedigree* do local de coleta e com características morfológicas, fisiológicas e agrônômicas, fornecendo uma análise mais completa da coleção e de cada acesso (Livini et al., 1992; Abdelnoor et al., 1995; Vasconcelos et al., 1996; Carvalho et al., 2000a, 2000b; Huang et al., 2002; Faleiro et al., 2004b, 2004c).

Estudos de diversidade genética de acessos para subsidiar a escolha de genitores para programas de melhoramento

A escolha de genitores e o planejamento de cruzamentos em programas de melhoramento genético são etapas iniciais e fundamentais para o sucesso do programa (Borém, 1997). Para subsidiar tais etapas, é essencial uma caracterização genética refinada e completa da coleção e de cada acesso do germoplasma, a qual é obtida com base na avaliação acurada de características morfológicas, fisiológicas e agrônômicas, além dos dados de *pedigree*.

Dados adicionais sobre a diversidade genética de potenciais genitores obtidos com base em marcadores moleculares podem auxiliar na escolha dos genitores e no planejamento dos cruzamentos visando à maximização da heterose e das combinações gênicas desejadas. Estudos de diversidade genética de linhagens de milho têm permitido a caracterização e o agrupamento dessas linhagens em grupos heteróticos distintos (Livini et al., 1992) e tais informações têm sido importantes na escolha de genitores para a obtenção de híbridos com elevado desempenho agrônômico (Guimarães & Moreira, 1999). Pires et al. (2000) propuseram uma estratégia de melhoramento genético do cacauero, utilizando a seleção recorrente envolvendo cruzamentos entre acessos silvestres e domesticados, sendo que os dados sobre a diversidade genética dos acessos estimados com base em marcadores moleculares auxiliaria a escolha de genitores a serem envolvidos nos cruzamentos. Dados de diversidade genética, principalmente de fontes de resistência à vassoura-de-bruxa, também têm auxiliado na escolha de genitores para o melhoramento genético do cacauero visando à obtenção de variedades com resistência mais efetiva e duradoura, baseada na ampliação da base genética da resistência (Faleiro et al., 2001, 2004d).



A escolha de genitores pode, igualmente, ser baseada no agrupamento de potenciais genitores em grupos de similaridade. A escolha de menor número de genitores para representar determinado grupo de similaridade pode reduzir o número inicial de cruzamentos sem perdas significativas na diversidade genética, reduzindo os custos e viabilizando a execução do programa. Faleiro et al. (2004c) estudaram a diversidade genética de 35 potenciais genitores de *Stylosanthes guianensis*, estabeleceram 11 grupos de similaridade genética e selecionaram um genitor de cada grupo. Características agronômicas de produção de sementes e resistência a doenças foram utilizados como critério de seleção do acesso dentro do grupo de similaridade. Na Figura 11, ilustram-se os grupos de similaridade e os genitores selecionados por Faleiro et al. (2004c). Neste trabalho, os autores estabeleceram 11 grupos de similaridade com um ponto de corte no dendrograma a 0,35 de distância genética relativa. Em cada grupo de similaridade foi escolhido um genitor, utilizando características agronômicas (resistência a doenças, produção de sementes) como critério de seleção dentro do grupo.

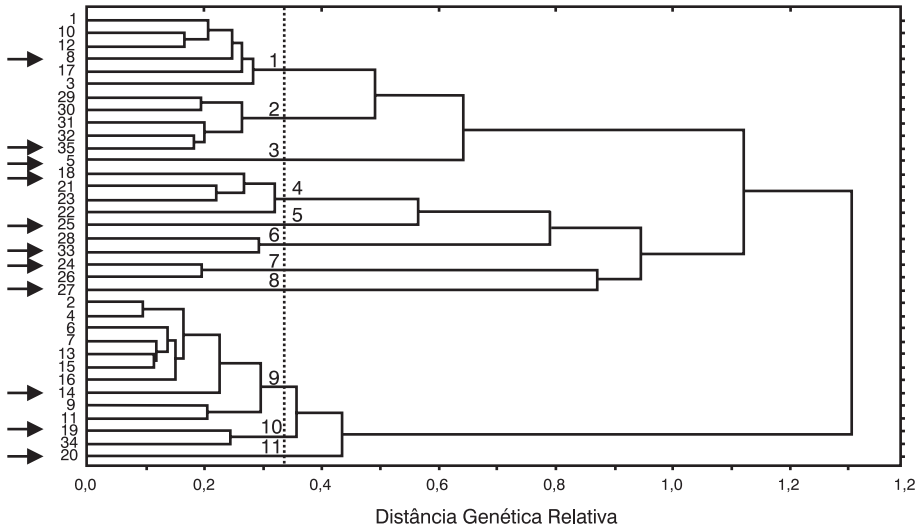


Figura 11. Análise de agrupamento de 35 acessos de *Stylosanthes guianensis* com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 159 marcadores RAPD. As setas indicam os genitores selecionados com base na diversidade genética.

Fonte: Faleiro et al. (2004c).



Análise de pureza genética de sementes e contaminação de germoplasma

Acessos, principalmente de espécies autógamas, em especial, são representados em bancos de germoplasma por várias sementes. Análise da pureza genética dessas sementes pode ser feita utilizando marcadores moleculares (Tanksley & Jones, 1981; Treuren & Hintum, 2001). O princípio dessa aplicação é estimar o parentesco genético entre as sementes com base na similaridade genética calculada a partir dos marcadores moleculares. É possível, por exemplo, quantificar taxas de polinização cruzada (Ferreira et al., 2000) e verificar contaminações genéticas em amostras de sementes de determinado acesso (Steiner et al., 1997; Borner et al., 2000). Na Figura 12, ilustra-se a detecção de contaminação genética de sementes do acesso CPAC 2251 de *Stylosanthes macrocephala* com base em análises de marcadores moleculares (Costa, 2004). Tal detecção é baseada na diferença genética da planta 11 em relação às demais a qual não seria esperada dentro do acesso.

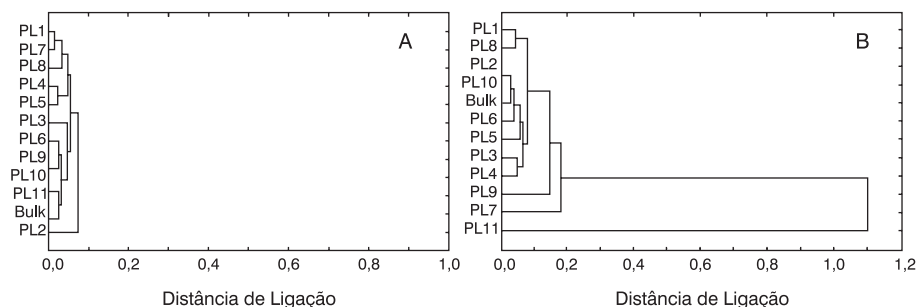
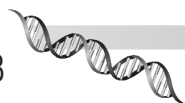


Figura 12. Análises de agrupamento de plantas dos acessos CPAC 1043 (A) e CPAC 2251 (B) de *Stylosanthes macrocephala*, evidenciando a contaminação de sementes do CPAC 2251 (B).

Fonte: Costa (2004).



A estabilidade genética de determinada coleção de germoplasma também pode ser analisada com base em marcadores moleculares (Isabel et al., 1993; Goto et al., 1998; Wu et al., 1998; Borner et al., 2000). A manutenção da integridade e da estabilidade genética dos recursos genéticos é um dos principais objetivos dos programas de conservação. A perda da estabilidade genética é devida a mudanças nas frequências gênicas que podem ocorrer por causa da seleção, mutação, erosão genética e migração/contaminação. No caso de coleções de germoplasma, a erosão genética e os processos de contaminação, normalmente decorrentes dos ciclos de rejuvenescimento para a recuperação da viabilidade das sementes, são as principais causas da perda da estabilidade genética. Marcadores moleculares podem auxiliar o acompanhamento da estabilidade genética de acessos ao longo do tempo em diferentes condições de armazenamento ou depois de períodos de regeneração (Reedy et al., 1995; Wu et al., 1998; Parzies et al., 2000) e dessa forma subsidiar as melhores estratégias de manutenção e manejo dos acessos no banco de germoplasma. A perda da estabilidade genética de um grupo de acessos em determinada condição de armazenamento pode subsidiar a não-utilização ou ajustes da referida condição. A perda da estabilidade após um período de ciclos de rejuvenescimento pode subsidiar a melhoria do processo de modo a evitar ou diminuir o problema.

Análise de *fingerprinting* e testes de paternidade

Cada acesso de um banco de germoplasma possui uma seqüência de nucleotídeos que compõem seu DNA. A detecção de diferenças entre essas seqüências através de polimorfismos de fragmentos de DNA revela um padrão único, ou seja, uma impressão digital genética (*genetic fingerprinting*) que pode ser utilizada na identificação de indivíduos e também para testes de paternidade (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A impressão digital genética obtida com base em marcadores moleculares pode ser comparada a uma impressão digital utilizada nas carteiras de identidade (Figura 13) sendo tão ou mais eficiente para trabalhos de identificação.



Adicionalmente, ao analisar a herança de cada marcador molecular ao longo das gerações, obtém-se uma poderosa ferramenta para a realização de testes de paternidade. Na Figura 14, ilustra-se a paternidade de uma planta F1 de maracujazeiro realizado com base em marcadores moleculares RAPD e com base na morfologia floral. Marcadores dominantes, como o RAPD, têm maior utilidade em testes de paternidade nos quais são conhecidos o genitor feminino e o provável genitor masculino. Logicamente, a utilidade dos marcadores moleculares é maior quando características fenotípicas contrastantes entre os genitores não estão disponíveis para a análise da paternidade.

A correta identificação de um acesso em um banco de germoplasma é essencial. A transferência de resultados e recomendações entre diferentes instituições de pesquisa, muitas vezes é dificultada devido à identificação errada de acessos em diferentes coleções de germoplasma. Erros de identificação de acessos em bancos de germoplasma podem ser causados por problemas de homonímia (o mesmo nome para diferentes acessos), de sinonímia (diferentes nomes para o mesmo acesso), administração e controle inadequado da coleção, problemas de etiquetagem, mistura de material propagativo (sementes, mudas, garfos para enxertia, estacas) utilizado na introdução e estabelecimento do banco de germoplasma, crescimento de ramos a partir de porta-enxerto em coleções mantidas no campo, entre outros. Figueira et al. (1997) demonstraram, com base em marcadores moleculares, que a presença de erros na identificação de acessos de cacaueteiro é comum nas diferentes coleções. A análise de *fingerprinting* de DNA é uma ferramenta poderosa para a identificação desses erros e tem sido utilizada em vários trabalhos (Caetano-Anolles et al., 1997; Smith, 1998). Praticamente, todos os tipos de marcadores moleculares do DNA podem ser utilizados para a identificação de acessos por *fingerprinting*, embora diferenças relativas ao conteúdo da informação genética por loco, número de polimorfismos detectados, dificuldade e custo da análise sejam observadas entre os diferentes marcadores (Powell et al., 1996; Russell et al., 1997; Pejic, 1998;



McGregor et al., 2000; Faleiro et al., 2004e). De modo geral, marcadores co-dominantes e multialélicos são os mais indicados para os estudos de identificação e testes de paternidade.

A realização de testes de paternidade para o conhecimento da genealogia de acessos de bancos de germoplasma é importante, principalmente, para a escolha de potenciais genitores para programas de melhoramento genético. Essa aplicação pode ser ilustrada pelos trabalhos de Yamada & Lopes (1999) e Faleiro et al., (2001, 2004a, 2004d) que analisaram a paternidade e a origem genética de seleções de cacauzeiros resistentes à vassoura-de-bruxa com o objetivo de identificar potenciais genitores que pudessem ser utilizados em programas de melhoramento para ampliar a base genética da resistência.

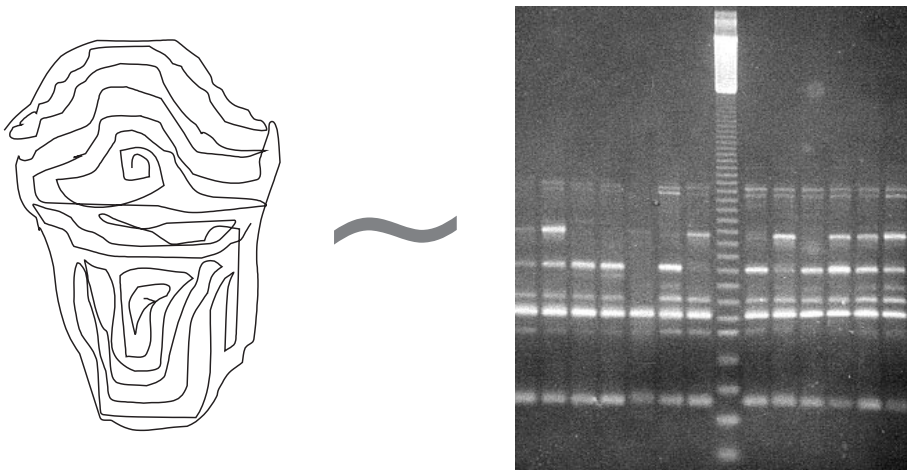


Figura 13. Analogia entre impressão digital e a impressão digital genética obtida com base em marcadores moleculares.

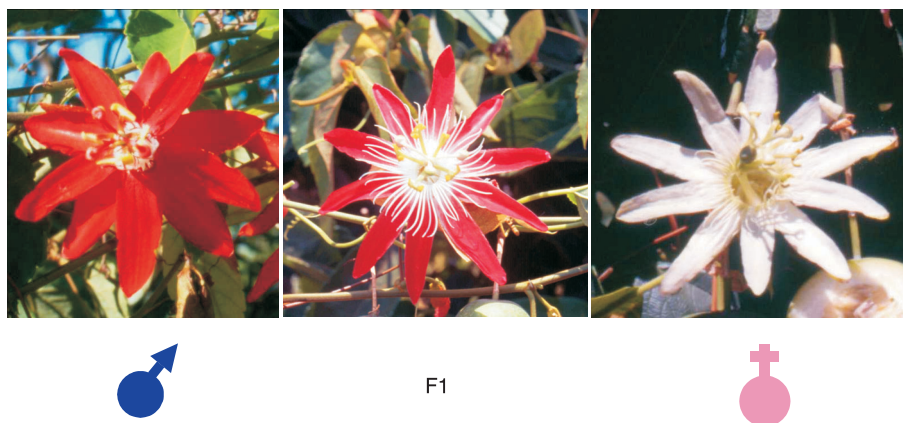
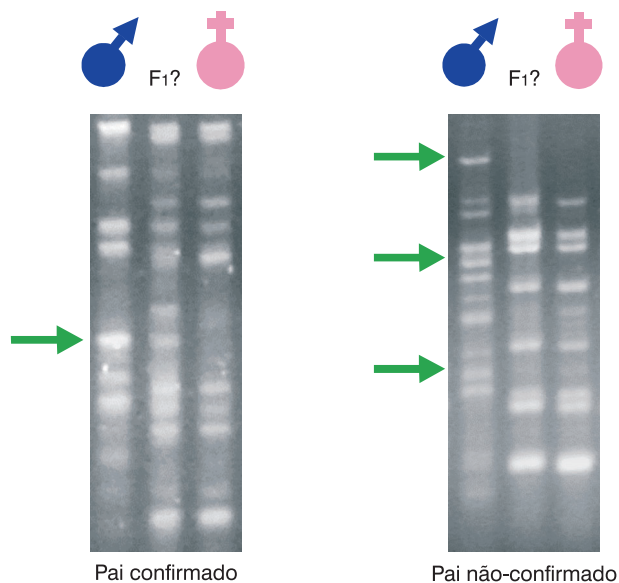
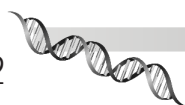


Figura 14. Teste de paternidade de uma planta F_1 de maracujazeiro com base em marcadores moleculares e na morfologia floral. As setas indicam marcas moleculares úteis para o teste de paternidade, ou seja, marcas presentes no pai e presentes (pai confirmado) ou não (pai não-confirmado) no possível filho (planta F_1).



Auxílio em trabalhos de classificação botânica e filogenia

A classificação botânica, muitas vezes, não é um processo fácil considerando a alta variabilidade intra-específica e o efeito ambiental sobre o fenótipo diferenciador entre espécies e variedades botânicas dentro da espécie. Marcadores moleculares podem ser utilizados para auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia, considerando o poder de diferenciação inter e intra-específico (Brondani, 1996; Lakshmi et al., 1997; Kim et al., 1999; Ouborg et al., 1999; Cabral et al., 2000; Nicolosi et al., 2000; Chandler et al., 2001; Raina et al., 2001; Faleiro et al., 2003b, 2003c). Na Figura 15, ilustra-se a diferenciação interespecífica de três espécies do gênero *Stylosanthes* e na 16, a diferenciação de variedades botânicas de *Stylosanthes guianensis* verificada com base em marcadores moleculares RAPD.

Os marcadores moleculares, principalmente aqueles baseados em análises de seqüência, têm grande potencial como ferramenta auxiliar em trabalhos de classificação botânica e em estudos de filogenia, origem genética e evolução, entretanto, nunca irão substituir o trabalho essencial e de grande importância dos botânicos.

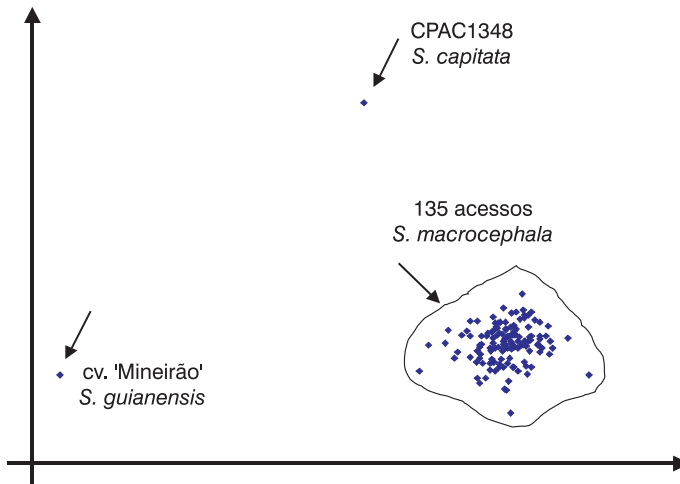


Figura 15. Diferenciação de três espécies do gênero *Stylosanthes* com base na diversidade genética analisada com o uso de marcadores moleculares RAPD.

Fonte: Faleiro et al. (2003b).



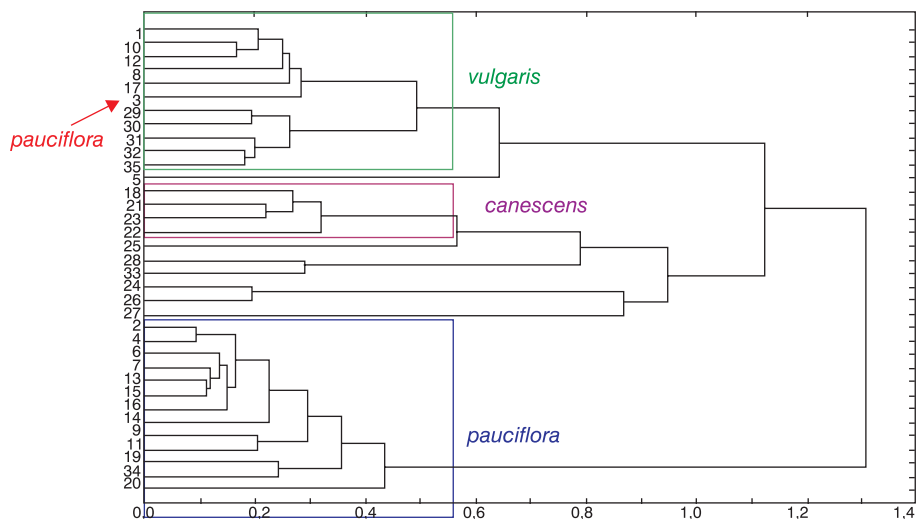


Figura 16. Diferenciação de variedades botânicas de *Stylosanthes guianensis* com base em distâncias genéticas calculadas com o uso de marcadores moleculares RAPD. Um erro de classificação fenotípica do acesso 3 como pertencente à variedade botânica *pauciflora* foi detectado com base nos marcadores moleculares.

Composição e validação de coleções nucleares e de trabalho com base em estudos de diversidade genética

A coleção nuclear é um grupo de acessos que representa a diversidade genética de uma coleção original. De modo geral, a coleção nuclear possui de 10% a 15% do tamanho e representa mais de 70% da variabilidade genética da coleção original. Normalmente, a coleção original é uma coleção-base, ou seja, uma coleção abrangente de acessos da espécie de interesse e de seus parentes silvestres (Valois et al., 1996, 2002). Logicamente, o princípio da composição de coleções nucleares pode ser aplicado em diferentes tipos de coleções de germoplasma, como as ativas e as de trabalho.

A composição de coleções nucleares não tem como objetivo a substituição de uma coleção-base ou coleção ativa, nem mesmo de uma coleção de trabalho muito especializada. Um dos principais objetivos é facilitar e viabilizar a caracterização e a avaliação de acessos de bancos de



germoplasma, o que é fundamental e subsidia a utilização prática de tais recursos genéticos e sua incorporação em programas de melhoramento. Muitas vezes, a avaliação agrônômica, que necessita da montagem de experimentos com repetições em vários ambientes, é muito difícil, principalmente, quando um número elevado de acessos deve ser avaliado ao mesmo tempo. Estratégias para reduzir o número de acessos de uma coleção-base sem a perda significativa da variabilidade genética, às vezes, é fundamental para viabilizar a montagem de tais experimentos.

A estrutura da coleção nuclear e sua dimensão, além de facilitar a caracterização do germoplasma, estimula o usuário a utilizar os recursos genéticos com maior eficiência (Upadhyaya & Ortiz, 2001). Na composição da coleção nuclear, cada acesso vai representar a variabilidade genética de outros acessos que ficaram no mesmo grupo de similaridade. Feita a caracterização detalhada da coleção nuclear, caso seja verificado o potencial de determinado acesso, esse potencial pode ser extrapolado para todos os acessos do mesmo grupo de similaridade, o que pode ser confirmado por meio de caracterizações detalhadas desses acessos.

Várias coleções nucleares de diferentes espécies têm sido desenvolvidas utilizando diferentes tipos de características e estratégias de amostragem (Diwan et al., 1995; Marita et al., 2000; Tai & Miller, 2001; Chandra et al.; 2002; Li et al., 2004). Entre as características usadas para o estabelecimento de coleções nucleares estão os dados de *pedigree*, características ecogeográficas, morfológicas, fisiológicas, agrônômicas, bioquímicas e moleculares (Li et al., 2004). Entre as características empregadas, marcadores moleculares têm sido utilizados tanto para a composição quanto para a validação de coleções nucleares (Gepts, 1995; Tohme et al., 1996; Hokanson et al., 1998; Skroch et al., 1998; Ghislain et al., 1999; Grenier et al., 2000; Huaman et al., 2000; Faleiro et al., 2003b; Li et al., 2004).

O princípio mais utilizado na composição de coleções nucleares é o da análise da variabilidade genética da coleção-base, com a finalidade de subdividir os acessos em grupos de similaridade genética, bem como selecionar um para representar cada grupo, de modo que os acessos



selecionados representem mais de 70% da variabilidade genética inicial. Na Figura 17, ilustra-se o princípio acima utilizado para reduzir uma população-base de 136 acessos de *Stylosanthes macrocephala* para uma de 20 acessos (Faleiro et al., 2003b). Pode-se observar, nessa figura, que os acessos selecionados ocupam praticamente toda dispersão gráfica e dessa forma representam boa parte da variabilidade genética da coleção inicial.

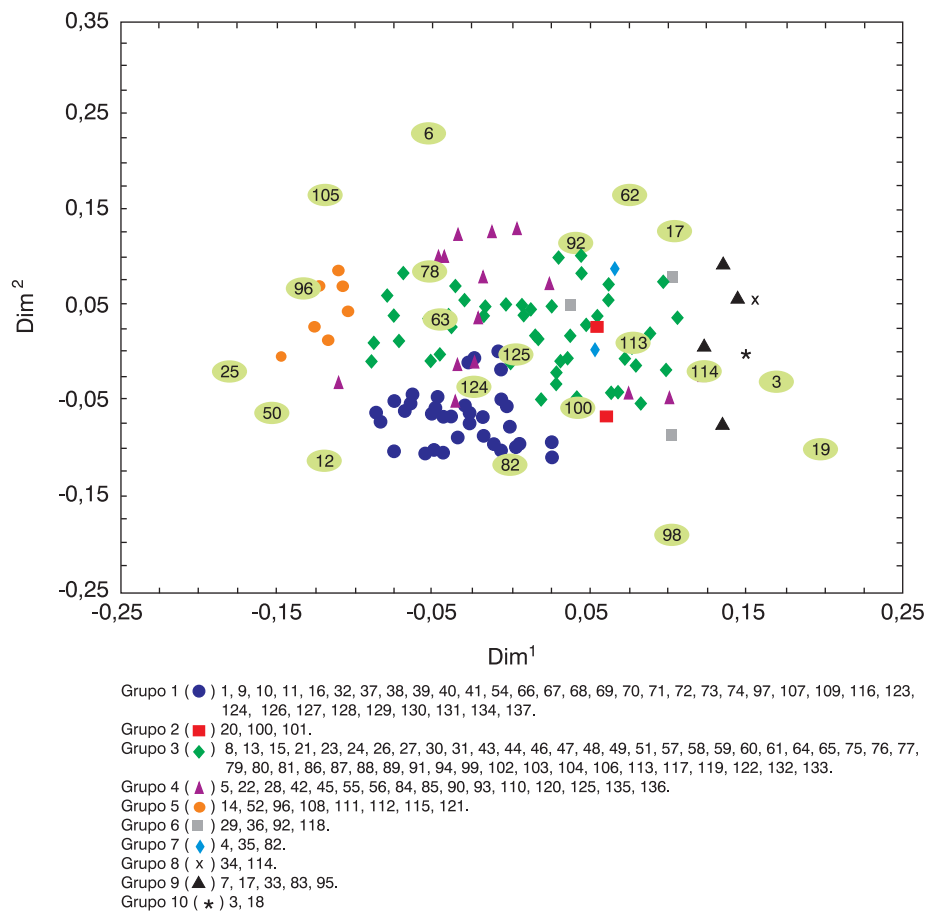


Figura 17. Dispersão gráfica de 136 acessos de *Stylosanthes macrocephala* com base em distâncias genéticas calculadas usando marcadores moleculares. Os acessos em verde são aqueles selecionados para a composição de uma coleção para representar a variabilidade genética da coleção inicial.

Fonte: Faleiro et al. (2003b).



Em relação à validação de coleções nucleares, o princípio é analisar a variabilidade genética da coleção-base e da coleção nuclear e verificar a porcentagem da variabilidade presente na coleção nuclear. Para essa análise, cálculos de distâncias genéticas entre os acessos da coleção-base e da coleção nuclear com base em polimorfismos do DNA, cálculos da riqueza e frequência alélica baseados em marcadores multialélicos e co-dominantes podem ser utilizados com sucesso (Gepts, 1995; Skroch et al., 1998; Huaman et al., 2000).

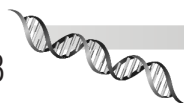
Obtenção de marcas moleculares associadas a características agrônômicas como subsídio para o estudo da diversidade genética funcional

A disponibilidade de marcadores moleculares fortemente associados a características de interesse, permitiria uma análise mais rápida e acurada da diversidade genética funcional da coleção de germoplasma. O primeiro passo para a aplicação acima é estabelecer correlações e associações genéticas entre os marcadores moleculares e as características agrônômicas de interesse. Essas associações têm sido feitas com base em metodologias como a do BSA (*Bulked Segregant Analysis*) estabelecida por Michelmore et al. (1991) (por exemplo: Faleiro et al., 2000) ou em metodologias baseadas na construção prévia de mapas genético-moleculares (por exemplo: Faleiro et al., 2005). Em virtude da grande quantidade de marcadores moleculares disponíveis e de *softwares* apropriados para análises de ligação e correlação genética, a identificação de marcadores moleculares ligados a diferentes características de interesse tem sido realizada com sucesso em diferentes espécies (Paterson et al., 1991; Lu et al., 1997; Bernacchi et al., 1998; Kicherer et al., 2000; Tuberosa et al., 2002; Faleiro et al., 2003e, 2003f; Lacape et al., 2005). Grande parte das características de interesse, principalmente aquelas relacionadas à produtividade, são características quantitativas determinadas pela combinação de diferentes genes e nesse caso o mapeamento delas é feito com base nos QTLs (*Quantitative Trait Loci*), ou seja, lócus relacionados a características quantitativas.



Embora existam numerosos trabalhos de detecção e mapeamento de QTLs utilizando marcadores moleculares, poucos são os exemplos de variedades comerciais obtidas com o auxílio de marcadores moleculares na seleção de QTLs. Segundo Guimarães & Moreira (1999), a baixa variabilidade genética dos genitores utilizados nos programas de melhoramento e a falta de interação entre as equipes envolvidas no mapeamento genético e no melhoramento genético são fatores que contribuem para esse fato. Outros fatores importantes estão relacionados à repetição da informação de ligação entre o marcador molecular e o QTL, à interação entre o QTL e o ambiente e à seleção simultânea de várias características muitas vezes correlacionadas. Outro fator que dificulta o uso de marcadores moleculares na seleção indireta de características agrônômicas é a validação desses QTLs para outras populações e outros ambientes e a dificuldade de selecionar concomitantemente vários QTLs, cada um explicando uma parte da variação fenotípica da característica de interesse (Faleiro, 2003).

No caso do estudo da diversidade funcional de bancos de germoplasma com base em marcadores moleculares, as dificuldades são as mesmas mencionadas para a seleção das características quantitativas com base em tais marcadores genéticos. As dificuldades são menores para as características qualitativas cujo marcador molecular é o próprio gene. No caso de bancos de germoplasma, uma possibilidade interessante é relacionar a diversidade genética obtida de marcadores moleculares com a diversidade genética funcional obtida com base em características agrônômicas, a exemplo do estudo feito por Pires et al. (2005). No trabalho de Pires et al. (2005), além do relacionamento entre diversidade genética molecular e funcional, a frequência de locus RAPD associada a acessos com resistência à vassoura-de-bruxa foram usados para indicar possíveis associações entre os marcadores e a característica.



Considerações Finais

As diferentes metodologias da genética molecular, principalmente os marcadores moleculares do DNA, apresentam várias aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. As aplicações podem gerar informações úteis para as diferentes estratégias de conservação dos recursos genéticos (*ex situ*, *in situ* e *on farm*) e para as diferentes etapas de cada estratégia (coleta, manutenção, caracterização, manejo, ampliação e uso dos recursos). Logicamente, tais marcadores não podem substituir os outros tipos de marcadores genéticos como os baseados nos caracteres morfoagronômicos. Além disso, práticas de avaliação fenotípica contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo x ambiente continuarão sendo de grande importância e essenciais para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos nos sistemas de produção e nos programas de melhoramento.



Glossário

A

Abiótico: Relativo a fatores físicos e químicos do ambiente os quais não possuem condições de adaptabilidade, como água, temperatura, solo.

Acesso: Amostra de germoplasma representativa de um indivíduo ou de vários indivíduos da população (*ver*). Qualquer registro individual constante de uma coleção de germoplasma (*ver*).

Acesso domesticado: Acesso (*ver*) que passou por um conjunto de atividades relacionadas ao conhecimento do modo de reprodução, de propagação, do sistema de cruzamento (*ver*) e do sistema de manejo, sendo incorporado ao acervo de plantas disponíveis para uso e consumo pelo homem.

Acesso silvestre: Acesso (*ver*) que ainda não foi domesticado (*ver* acesso domesticado).

Acurácia: Uma medida da correlação entre o valor estimado e o valor real. Tal medida informa a proximidade do valor estimado em relação ao valor real, refletindo a confiabilidade daquela estimativa.

AFLP: Vem do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*, ou seja, polimorfismos (*ver*) de comprimento de fragmentos amplificados. AFLPs são fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. Este tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD (*ver*) e RFLP (*ver*).

Agrobiodiversidade: Termo utilizado para referir à diversidade de seres vivos, de ambientes terrestre ou aquático, cultivados em diferentes estágios de domesticação.

Alelos: Formas alternativas de um gene (*ver*), situadas em um mesmo loco (*ver*) em cromossomos homólogos (*ver*).



Alogamia: Fertilização cruzada; união de um gameta masculino e um feminino produzidos em indivíduos diferentes (*ver espécie alógama*).

Amostra: Subconjunto de uma população por meio do qual se estimam as propriedades e características dessa população

Amostragem: Sistemática de efetuar-se a amostra (*ver*). Pode haver amostragens seletivas ou ao acaso e o número ideal de indivíduos a ser amostrado varia de acordo com o objetivo da amostragem.

Análise de agrupamento: Análise estatística que objetiva detectar grupos em um conjunto de dados, indivíduos ou acessos, produzindo uma classificação com base em suas características (*ver*). Medidas de distância e similaridade, baseadas em análises multivariadas, são normalmente utilizadas como base para tal análise.

Análise de dispersão: Análise estatística que visa plotar indivíduos ou acessos (*ver*) em um gráfico de duas ou três dimensões. Normalmente, quanto maior a distância gráfica maior a distância genética (*ver*) entre os indivíduos ou acessos plotados.

Análise filogenética: Estudo da classificação e das linhas de evolução em um grupo de organismos, espécies, gêneros ou famílias.

AP-PCR: Vem do inglês *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*, ou seja, reação em cadeia da polimerase iniciada arbitrariamente. Terminologia usada para um tipo de marcador genético molecular do DNA (*ver*) amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* curtos (geralmente dez nucleotídeos) de seqüência aleatória, também, conhecido como RAPD (*ver*).

Árvore genealógica: É a representação gráfica da genealogia (*ver*).

Autogamia: Autofertilização; fusão do gameta masculino com o gameta feminino do mesmo indivíduo. Os gametas masculino e feminino que serão fertilizados podem ter origem na mesma flor, no caso de plantas monóicas (*ver*) com flores hermafroditas (*ver*) ou de flores diferentes, no caso de plantas monóicas com flores unissexuais, (*ver espécie autógena*).



Auto-radiografia: Método para determinar a presença e a localização de moléculas radioativamente marcadas por meio de imagem produzida em filme fotográfico.

B

Bacteriófago: Vírus que infecta bactéria.

Banco ativo de germoplasma: Local onde é mantida uma coleção ativa (*ver*) de acessos que é rotineiramente usada para propósitos de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização de recursos genéticos (*ver coleção ativa*).

Banco de germoplasma: Local onde é onde se conserva uma coleção de acessos de uma espécie com origens geográfica e ambiental variadas que é mantida com a finalidade de preservar a sua variabilidade genética (*ver*) e de constituir matéria-prima para programas de pesquisa e melhoramento.

Base genética: Total da variação genética presente em uma população ou coleção de acessos ou indivíduos. Em princípio, quanto maior for a base genética maior será a capacidade de a população fazer frente a agentes bióticos e abióticos (*ver*) em benefício de sua perpetuação.

Biblioteca genômica: Coleção de fragmentos de DNA genômico (*ver*), clonados em vetores (*ver*) apropriados, representando o genoma (*ver*) total de um organismo. É construída após a digestão parcial do DNA genômico com enzimas de restrição (*ver*). Os fragmentos de DNA resultantes dessa digestão são selecionados por tamanho e ligados em vetores apropriados.

Biodiversidade: Somatório de formas de vida que habitam o planeta. É o total de organismos vivos existentes, sua variação genética e os complexos ecológicos por eles habitados. A biodiversidade abrange as formas de vida dentro da espécie, entre espécies e entre ecossistemas.

Biótico: Relativo ou pertencente aos organismos vivos e orgânicos componentes da biosfera. Em ciência agrônoma, agente biótico é um termo



freqüentemente associado a pragas e a doenças que reduzem o rendimento das culturas.

Brometo de etídio: Substância química intercalável utilizada como corante para a visualização das bandas de DNA em gel submetido à eletroforese. Apresenta fluorescência sob luz ultravioleta e é potencialmente tóxico e mutagênico.

C

Capacidade Específica de Combinação: Desvio do comportamento esperado de um genótipo (*ver*) em uma combinação específica com outro genótipo em relação à performance da progênie (*ver*) produzida, tomando como base a sua capacidade geral de combinação (*ver*).

Capacidade Geral de Combinação: Comportamento médio de um genótipo em uma série de cruzamentos em relação ao desempenho das progênes (*ver*) produzidas.

CAPS: Vem do inglês *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*, ou seja, seqüência polimórfica amplificada e clivada. São fragmentos de DNA amplificados via PCR (*ver*), utilizando-se de *primers* (*ver*) específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão com endonucleases de restrição. É um tipo de marcador genético molecular também conhecido como PCR-RFLP (*ver*).

Característica: Atributo estrutural ou funcional de um indivíduo ou acesso que resulta da interação do(s) gene(s) com o ambiente.

Característica agrônômica: Atributo estrutural ou funcional de um indivíduo ou acesso relacionado ao desempenho produtivo quantitativo e/ou qualitativo (Exemplo: produtividade, resistência a doenças, qualidade do fruto).

Característica ecogeográfica: Atributo de um indivíduo ou acesso relacionado ao seu local de coleta, como o tipo de solo, tipo de vegetação predominante, pluviometria média.



Característica fisiológica: Atributo de um indivíduo ou acesso relacionado a sua fisiologia, como fotossíntese líquida, transpiração, metabolismo do carbono, metabolismo do nitrogênio.

Característica molecular: Atributo de um indivíduo ou acesso obtido com base em análises moleculares, como os marcadores isoenzimáticos (*ver*) e os diferentes tipos de marcadores moleculares do DNA (*ver*).

Característica morfológica: Atributo de um indivíduo ou acesso relacionado a sua morfologia, como cor da flor, cor do fruto, forma da folha.

Característica qualitativa: Característica que apresenta variação fenotípica com distribuição descontínua, como, por exemplo, a característica cor da flor com os fenótipos branco e vermelho. Tais características têm grande valor em taxonomia e geralmente são controladas por um ou poucos genes.

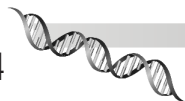
Característica quantitativa: Característica que apresenta variação fenotípica com distribuição contínua, como por exemplo, a característica produtividade com os fenótipos variando de 1000 a 3800 kg/ha. Tais características têm grande valor em programas de melhoramento genético e são controlados por vários genes.

Caracterização: Descrição e registro de características morfológicas, agronômicas, ecogeográficas, moleculares de um indivíduo ou acesso.

cDNA: Cópia de DNA (*ver*) complementar a uma molécula de mRNA (*ver*), sintetizado *in vitro* utilizando-se a enzima transcriptase reversa. Representam os genes que estão sendo transcritos nas células em determinado momento.

Classificação botânica: Classificação dos seres vivos em categorias, baseada em semelhanças e diferenças entre eles. Existem diferentes categorias (espécie, gênero, ordem, família, etc.) as quais apresentam características específicas.

Clone: (1) população de células ou indivíduos geneticamente idênticos; (2) descendência que, por propagação assexuada, originou-se de uma única planta; (3) população de células que possui um vetor de clonagem com o



mesmo inserto; (4) fragmento de DNA isolado do genoma de um organismo ou de um cDNA (*ver*) de um vetor de clonagem.

Coleção ativa: Coleção de acessos que é rotineiramente usada para propósitos de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização de materiais. A coleção ativa é multiplicada de acordo com a demanda e regenerada periodicamente. O caráter dinâmico da coleção ativa é indicado pelo fato de que acessos entram e saem de seu inventário, conforme decisões gerenciais. Normalmente, possui menor tamanho que a coleção-base (*ver*). A coleção ativa, em geral, funciona em dois ciclos: plantas crescendo no campo e sementes armazenadas para regeneração ou multiplicação de materiais. A coleção ativa normalmente corresponde a um subconjunto da coleção base.

Coleção-base: Coleção abrangente de acessos conservada em longo prazo. A coleção-base ideal deve conter amostras representativas dos estoques domesticados da cultura e suas formas parentais silvestres, das espécies silvestres (*ver*) que cruzam com a cultura principal e produzem prole e das espécies silvestres que só cruzam com a cultura principal mediante tratamentos especiais, como fusão de protoplastos (*ver*). A coleção-base é vista como uma estratégia de segurança, abrigando em seu acervo a coleção ativa (*ver*) duplicada, e com seus materiais não sendo utilizados para intercâmbio. As coleções-base existentes são todas compostas de sementes ortodoxas.

Coleção de germoplasma: Coleção de acessos (*ver*) de uma espécie com origens geográfica e ambientalmente variadas, mantida com a finalidade de preservar sua variabilidade genética (*ver*) e de constituir matéria-prima para programas de pesquisa e melhoramento.

Coleção de trabalho: Coleção de germoplasma mantida para propósitos específicos do melhorista com acessos avaliados. A coleção é sempre de tamanho limitado e, geralmente, composta de germoplasma-elite. Também conhecida como coleção do melhorista.

Coleção nuclear: É uma coleção que representa, com o mínimo de repetição, a diversidade genética de uma espécie cultivada e de suas espécies



relacionadas. O conceito de coleção nuclear é aplicado em coleções de germoplasma com 10% a 15% do tamanho da coleção original, representando 70% a 80% da variabilidade genética disponível na coleção inicial. Normalmente, a coleção original é uma coleção-base (*ver*). A coleção nuclear não tem como objetivo a substituição de uma coleção-base (*ver*) ou coleção ativa (*ver*), nem mesmo de uma coleção de trabalho muito especializada. Um dos principais objetivos é facilitar e viabilizar a caracterização e avaliação de acessos de bancos de germoplasma, o que é fundamental e subsidia a utilização prática de tais recursos genéticos e sua incorporação em programas de melhoramento.

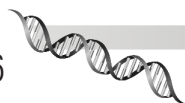
Conservação *ex situ*: Ação de conservar a variação genética das espécies fora de suas comunidades naturais. Desdobra-se em várias modalidades, entre as quais conservação *in vitro*, em coleções em campo, em câmaras frias, em nitrogênio líquido.

Conservação *in situ*: Ação de conservar plantas e animais em suas comunidades naturais. As unidades operacionais são várias, destacando-se parques nacionais, reservas biológicas, reservas genéticas, estações ecológicas, santuários de vida silvestre.

Conservação *on farm*: É uma estratégia complementar à conservação *in situ* (*ver*), sendo uma das formas para a conservação da agrobiodiversidade (*ver*). Apresenta como particularidade o fato de envolver recursos genéticos cultivados pelas comunidades locais e populações indígenas, detentoras de grande diversidade de recursos genéticos e de amplo conhecimento deles. A conservação *on farm* envolve, portanto, recursos nativos e exóticos adaptados às condições locais que estão em contínuo processo de seleção e de melhoramento pelas comunidades locais e populações indígenas.

Criopreservação: Conservação de germoplasma em baixa temperatura, normalmente em nitrogênio líquido (-196°C).

Cromossomos: Estrutura nucleoprotéica, localizada no núcleo das células e observada durante a divisão celular. Contêm os genes nucleares responsáveis pela transmissão de caracteres hereditários de cada organismo. O número de



cromossomos é variável de acordo com a espécie, permanecendo constante dentro da mesma espécie.

Cromossomos homólogos: São cromossomos (ver) que apresentam a mesma morfologia e são portadores dos mesmos genes (ver). Pareiam-se durante o processo de divisão celular.

Crossing-over: Troca recíproca de segmentos entre cromossomos homólogos que ocorre durante a meiose, sendo responsável pela recombinação genética (ver).

D

Dados binários: É um sistema de numeração ou codificação de dados que normalmente utiliza os números 0 e 1 para representar todas as informações. É um sistema muito importante utilizado pelos computadores para realizar todas suas operações. Na genética molecular, os dados binários são muito utilizados para codificação de marcadores moleculares na qual a presença da marca é codificada como 1 e ausência como 0.

DAF: Vem do inglês *DNA Amplification Fingerprinting*. É uma estratégia para detecção de diferenças genéticas entre organismos por meio da amplificação do DNA genômico (ver), utilizando-se de um único *primer* (ver) de seqüência arbitrária.

DAMD: Vem do inglês *Directed Amplification of Minisatellite-region DNA*. É uma técnica de obtenção de marcadores genético-moleculares amplificados via PCR (ver) usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de seqüência de minissatélites.

Descritores: Características mensuráveis ou subjetivas de um acesso, como altura da planta, cor da flor, comprimento do pecíolo, forma da folha. Os descritores são agrupados na forma de lista, uma para cada cultura em particular e são aferidos pelo estado do descritor, ou seja, as categorias reconhecidas como válidas para aquele descritor (ex: cor de flor: 1. rosa 2. amarelada 3. azulada 4. arroxeadas; cor de pecíolo: 1. verde 2. verde-



avermelhado 3. vermelho-esverdeado 4. vermelho). Os descritores são aplicados na caracterização e na avaliação de coleções de germoplasma (*ver*).

Descritores ecológicos: São descritores baseados em características ecogeográficas (*ver*).

Desnaturação: (1) Separação física das duas cadeias complementares de DNA. Ocorre pelo aquecimento do DNA ou por tratamento químico com substâncias caotrópicas (por exemplo, uréia) ou com pH alcalino, resultando no rompimento das pontes de hidrogênio que unem as duas cadeias. (2) Modificação da estrutura tridimensional de proteínas acompanhada da perda da respectiva função.

DGGE: Vem do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. É uma técnica de separação de marcadores genético-moleculares do DNA amplificados via PCR (*ver*) por meio de eletroforese em géis desnaturantes com concentrações de formamida/uréia.

Dióica: Espécie ou vegetal que apresenta flores masculinas e femininas em indivíduos diferentes.

Divergência evolucionária: Diferenças na história das linhas de evolução (*ver*) em um grupo de organismos, espécies, gêneros ou famílias.

Diversidade: Variabilidade, ou seja, existência de diferentes formas, em qualquer nível ou categoria. Em genética, há uma tendência de associar diversidade com o nível macro, como por exemplo, diversidade de espécies ou de flores.

Diversidade funcional: Diversidade (*ver*) associada a características agrônômicas (*ver*) ou de interesse para os usuários de recursos genéticos.

Diversidade genética: Muitas vezes utilizada como sinônimo de variabilidade genética (*ver*).

DNA: Vem do inglês *Deoxyribonucleic Acid*, ou seja, ácido desoxirribonucléico. É o material genético básico da maioria dos organismos. O DNA é formado por



uma seqüência de quatro diferentes nucleotídeos (*ver*) ligados covalentemente. Contém as informações genéticas determinantes das características hereditárias transmitidas à descendência.

DNA genômico: DNA (*ver*) representativo do genoma (*ver*) do organismo.

DNA chip: É uma técnica também conhecida por gene chip e DNA *microarrays* (*ver*). Essa tecnologia utiliza uma microlâmina (microchip) de aproximadamente 1 cm² contendo milhares de seqüências de DNA ordenadas e permite análises simultâneas de milhares de marcadores genético-moleculares ou seqüências de cDNA (*ver*) baseadas na hibridização com sondas específicas.

DNA *microarray*: São microarranjos de milhares de seqüências de DNA dispostas ordenadamente em uma microlâmina (microchip) utilizados na tecnologia do DNA *chip* (*ver*).

E

Eletroforese: Técnica para separação de ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas que diferem em tamanho e carga, com base na sua mobilidade relativa quando submetidos a um campo elétrico.

Embrião somático: Embrião formado de células somáticas.

Endonuclease: Enzima que catalisa a reação de quebra das ligações fosfodiéster em moléculas de ácidos nucleicos. Ao contrário das exonucleases que clivam a molécula a partir de suas extremidades, as endonucleases clivam em regiões internas da molécula.

Engenharia Genética: Conjunto de técnicas de Genética e da Biologia Molecular que visa à obtenção de moléculas de DNA recombinantes, bem como os procedimentos que resultam em uma modificação controlada do genótipo de um organismo. A Engenharia Genética tem sido empregada para a produção de vacinas, insulina, hormônios de crescimento, antibióticos e organismos geneticamente modificados (organismos transgênicos) com características de interesse.



Enxerto: Parte viva de um vegetal inserida em outra planta para aumentar a produtividade, resistência a doenças e favorecer a multiplicação. O mesmo que “cavaleiro”.

Enzimas de restrição: Endonucleases (*ver*) que cliva moléculas de DNA em uma seqüência específica. São enzimas produzidas por bactérias para funcionar como mecanismo de defesa contra a incorporação de DNAs exógenos, como os dos bacteriófagos. Essa propriedade de clivar moléculas de DNA em sítios específicos é extremamente importante em técnicas de Engenharia Genética (*ver*).

Erosão genética: Perda de variabilidade genética de uma espécie. A perda pode atingir populações ou um genótipo particular, com a supressão de genes e/ou séries alélicas do reservatório gênico (*ver*) da espécie.

Especiação: Processo de diversificação genética de populações e de multiplicação de espécies. Na prática, usa-se a especiação para monitorar o fenômeno da evolução (*ver*).

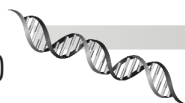
Espécie alógama: Espécie em que as plantas se reproduzem predominantemente por fertilização cruzada ou alogamia (*ver*). Normalmente, a reprodução sexual dessas espécies apresenta mais de 40% de fertilização cruzada ou alogamia (*ver*).

Espécie autógama: Espécie em que as plantas se reproduzem predominantemente por autofecundação ou autogamia (*ver*). Em geral, a reprodução sexual dessas apresenta mais de 95% de autofertilização ou autogamia (*ver*).

Estabilidade genética: Manutenção de determinado índice de equilíbrio genético seja no indivíduo, na população, seja na coleção de germoplasma.

Evolução: Processo de diversificação genética e morfológica de organismos na natureza. A evolução expressa a quantidade da diversificação orgânica que ocorre na biosfera e é idealmente medida pelo fenômeno de especiação (*ver*). O conceito de evolução está intimamente ligado à ocorrência de mudanças nas freqüências gênicas de populações.

Explante: Segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*.



F

Fenótipo: Aparência de um indivíduo como resultado da interação de seu genótipo (*ver*) com determinado ambiente. Formas alternativas de características observáveis de um organismo. Na característica cor da flor, pode haver, por exemplo, flor branca ou flor roxa como fenótipos.

Filogenia: História das linhas de evolução em um grupo de organismos. História evolutiva de categorias como espécie, gênero ou família.

Fingerprinting: Impressão digital. Na genética molecular, *fingerprinting* é um perfil de marcadores moleculares polimórficos (DNA ou proteínas) que pode ser utilizado para a identificação ou caracterização de um indivíduo.

Fluorescência: Técnica analítica em que moléculas são excitadas por absorção de uma radiação eletromagnética. Quando as espécies excitadas relaxam para o estado fundamental, liberam o excesso de energia na forma de fótons. Quando essa relaxação ocorre em tempos inferiores a 10^{-5} segundos, chama-se fluorescência, Entretanto, se ocorrer em tempos superiores, fosforescência, pode chegar a minutos ou até horas.

Fotodocumentação: Documentação por meio de fotografias.

Frequência gênica: Número ou proporção dos diferentes alelos (*ver*) de determinado loco (*ver*) em uma população. Também chamada de frequência alélica.

G

Gene: Unidade básica, física e funcional da hereditariedade (*ver*). Combinação de segmentos de DNA que leva à formação de um ou mais produtos de função específica que podem ser moléculas de RNA ou polipeptídeos. Os segmentos de um gene incluem uma região promotora, uma codificadora e uma terminadora. Tais segmentos estão localizados em uma região específica de determinado cromossomo e participam da manifestação do fenótipo (*ver*) de certa característica (*ver*). Tal manifestação está associada ao gene, à interação deste com outros genes e com o meio ambiente.



Genealogia: Linhas ancestrais (ascendência e/ou descendência) de um indivíduo, de modo a definir quais são os seus parentes. Pode ser representada graficamente pela chamada árvore genealógica (*ver*).

Genética de populações: Estudo quantitativo e mensurável de populações (*ver*) mediante metodologias e critérios estatísticos.

Genética molecular: Estudo da estrutura física, funcional e molecular dos genes (*ver*) no controle de atividades celulares e da sua organização dentro dos genomas (*ver*).

Genoma: É o conteúdo total de DNA (*ver*) no grupo de cromossomos (*ver*) correspondente ao conjunto haplóide (n) de um organismo. Esse termo é também empregado para o conteúdo total de DNA de um organismo.

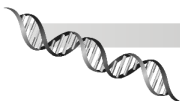
Genômica estrutural: Atividades de projetos genoma (*ver*) relacionadas à caracterização e à localização de seqüências que formam a estrutura do DNA e dos genes.

Genômica funcional: Consiste na sistematização da informação sobre a função dos genes, mediante aplicação de aproximações experimentais que avaliam a função dos genes, utilizando-se da informação e dos elementos da genômica estrutural (*ver*). O objetivo central da genômica funcional é fazer o elo entre o conhecimento das seqüências de um gene e o conhecimento de sua função e, assim, desvendar o comportamento dos sistemas biológicos.

Genótipo: Somatório de genes (*ver*) presentes nos cromossomos (*ver*), determinando a constituição genética de um organismo que, atuando juntamente com fatores ambientais, determina o fenótipo (*ver*). Esse termo também é usado para a constituição genética relativa aos alelos (*ver*) em um ou poucos locos (*ver*) em observação.

Grupo de ligação: Grupos de genes (*ver*) ou locos (*ver*) interligados fisicamente no mesmo cromossomo (*ver*).

Grupo heterótico: É uma população de genótipos (*ver*), indivíduos ou acessos que apresentam alta capacidade específica de combinação (*ver*).



H

Hermafrodita: (1) Em planta, é a flor que reúne os aparelhos masculino (androceu) e feminino (gineceu) na mesma estrutura floral (exemplo: flor de goiabeira); (2) em animais, é o indivíduo que reúne os dois sexos no mesmo genótipo (exemplo: caramujo).

Hereditabilidade: Transmissão de características dos genitores à progênie (*ver*) através dos genes (*ver*).

Heterose: Vigor híbrido que ocorre quando o comportamento do híbrido (*ver*) está situado acima da média de seus genitores. Geralmente, esse termo se aplica a tamanho, velocidade de crescimento ou características agrônômicas (*ver*).

Heterozigose: Condição na qual existem alelos (*ver*) diferentes em locos (*loci*) (*ver*) correspondentes de cromossomos homólogos (*ver*). Um indivíduo pode ser heterozigoto em um, vários ou em todos os locos correspondentes.

Híbrido: Produto do cruzamento de dois ou mais genitores geneticamente distintos.

Homologia de seqüência: São duas ou mais seqüências de ácidos nucléicos do DNA ou de aminoácidos das proteínas que possuem regiões iguais ou semelhantes.

Homonímia: É a relação entre duas ou mais palavras que, apesar de possuírem significados diferentes, possuem a mesma estrutura fonológica. Em recursos genéticos, é usada quando existe o mesmo nome para diferentes acessos.

Homozigose: Condição na qual existem alelos (*ver*) iguais em locos (*loci*) (*ver*) correspondentes de cromossomos homólogos (*ver*). Um indivíduo pode ser homozigoto em um, vários ou em todos os locos correspondentes.

Índices de similaridade e distância genética: Valores numéricos utilizados para quantificar a similaridade e a distância genética (*ver*).



IRAP: Vem do inglês *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em sítios de inserção de *retrotransposons* (*ver*). Fragmentos de DNA são amplificados via PCR (*ver*) usando *primers* (*ver*) desenhados a partir das regiões de terminação conservadas (LTRs - *Long Terminal Repeats*) (*ver retrotransposons*).

Isoenzima: Grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene (*ver*) codificando cada uma das enzimas. As diferentes isoenzimas são resultantes de variações alélicas dos genes codificadores. A técnica de detecção de isoenzimas envolve a preparação da amostra do tecido, a separação por eletroforese dos polimorfismos (*ver*) em géis de poliacrilamida ou de amido e a visualização dos polimorfismos por meio de corantes enzimáticos específicos.

ISSR: Vem do inglês *Inter Simple Sequence Repeats*. São fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb, amplificados via PCR, usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de seqüência de microssatélites.



Ligação gênica: Associação na herança de certos genes devido a sua localização no mesmo cromossomo. Com a ligação gênica, os genes apresentam segregação (*ver*) dependente.

Loco: O mesmo que *locus* (*Latim*). *Loci* é o plural de *locus*. Em português *locus* ou *loco*. Local específico que um gene (*ver*) ocupa em um cromossomo. Todos os alelos (*ver*) de um gene, em particular, de vários indivíduos ocupam o mesmo *loco*.

LRR: Vem do inglês *Leucine Rich Repeats*. Domínio protéico comum em proteínas codificadas por genes de resistência a doenças. Proteínas com domínio LRR apresentam uma ou mais séries de 24 ou mais aminoácidos leucina repetidos a intervalos regulares os quais formam uma estrutura terciária em forma de hélice. Proteínas com domínio LRR normalmente reconhecem produtos extracelulares de genes de fitopatógenos e iniciam as respostas de defesa ao enviar sinais para outras células da planta.



M

MAAP: Vem do inglês *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*. É um termo coletivo para as técnicas de PCR (*ver*) que utilizam *primers* (*ver*) de seqüência arbitrária, como os marcadores RAPD (*ver*), AFLP (*ver*), DAF (*ver*), entre outros.

Mapeamento genético: Processo de determinação da ordem linear e das distâncias relativas entre os vários locos (*loci*) (*ver*) ou genes (*ver*) em um ou vários cromossomos de um genoma (*ver*). As distâncias relativas entre os genes são estimadas pela freqüência de recombinação entre eles, de modo que, quanto maior a freqüência de recombinação, maior a distância relativa.

Marcador co-dominante: É um tipo de marcador que permite a observação de ambos os alelos (*ver*) em um loco em heterozigose (*ver*). Fornece informações sobre a freqüência alélica (*ver freqüência gênica*) em cada loco, nível de heterozigose e permite a diferenciação dos locos em heterozigose e homozigose (*ver*). São exemplos, microssatélites (*ver*), RFLP (*ver*), entre outros.

Marcador dominante: É um tipo de marcador que não permite a observação de ambos os alelos (*ver*) em um loco em heterozigose (*ver*), ou seja, não difere os locos em heterozigose dos locos em homozigose (*ver*). São exemplos, RAPD (*ver*), AFLP (*ver*), entre outros.

Marcador genético: Qualquer característica, processo bioquímico ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. O marcador genético pode ser facilmente identificado fenotipicamente e utilizado no mapeamento genético (*ver*).

Marcador isoenzimático: É um tipo de marcador genético-molecular (*ver*) baseado na detecção de isoenzimas (*ver*). Também é considerado um marcador bioquímico.

Marcador molecular: É um tipo de marcador genético (*ver*) baseado na detecção de isoenzimas (*ver*) ou seqüências de DNA. Existem diferentes tipos de marcadores moleculares como os RAPD (*ver*), RFLP (*ver*), AFLP (*ver*), microssatélites (*ver*).



Marcador multialélico: É um tipo de marcador genético (*ver*) que permite a observação de diferentes alelos (*ver*) de determinado loco (*ver*).

Material propagativo: Material utilizado para a propagação ou multiplicação vegetativa de uma planta. Também chamado de propágulo. A propagação pode ser sexual ou assexual. São exemplos de material propagativo, sementes, estacas, mudas, borbulhas.

Melhoramento genético: É a arte e a ciência de modificar, controlar e manter as características hereditárias de plantas ou animais, visando suprir melhor as necessidades humanas.

Métodos hierárquicos: São procedimentos utilizados em análises de agrupamento (*ver*) que envolvem a construção de uma hierarquia aglomerativa ou divisiva, nos quais dados, indivíduos ou acessos vão sendo combinados passo a passo, não havendo um número pré-definido de grupos a serem formados.

Microssatélites: São seqüências do DNA muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em *tandem* (lado a lado). Marcadores microssatélites também são conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) (*ver*).

Minissatélites: São seqüências do DNA de 10 a 100 pb repetidas em *tandem* (lado a lado). O número de repetições dessas seqüências em cada região hipervariável pode chegar a 50. As regiões hipervariáveis estão distribuídas por todo genoma (*ver*), constituindo vários locos (*loci*) (*ver*) nos diferentes cromossomos (*ver*). Também são conhecidos por VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) (*ver*).

Monóica: Espécie ou vegetal que apresenta flores masculinas e femininas separadas, porém no mesmo indivíduo.

Mutação: Variação herdável em um gene ou no número e estrutura cromossômica. As mudanças no genoma (*ver*) dividem-se em duas categorias: mutação cromossômica (*ver*) e mutação gênica (*ver*).



Mutação cromossômica: Mutação do tipo aberração cromossômica que afeta a estrutura e o número de cromossomos ou o número dos genes num cromossomo. Exemplos de mutação cromossômica são a deleção, a duplicação, a inversão, a translocação, a aneuploidia e a euploidia.

Mutação gênica: Processo responsável pela produção de novos alelos (*ver*) pela alteração na seqüência de nucleotídeos (*ver*) do DNA (*ver*).

N

NBS: Vem do inglês *Nucleotide Binding Site*. É um tipo de domínio protéico comum em proteínas codificadas por genes de resistência a doenças. Proteínas com domínio NBS normalmente reconhecem produtos extracelulares de genes de fitopatógenos e iniciam as respostas de defesa ao enviar sinais para outras células da planta.

Nucleotídeo: Unidade básica (monômeros) dos ácidos nucléicos (DNA e RNA). São moléculas complexas compostas por três subunidades: grupamento fosfato, açúcar (ribose ou desoxirribose) e uma base nitrogenada (adenina, timina, uracila, citosina e guanina).

P

PCR: Vem do inglês *Polymerase Chain Reaction*, ou seja, reação em cadeia da polimerase. É uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de seqüências DNA alvo as quais são duplicadas a cada ciclo criando uma reação em cadeia, pois cada molécula sintetizada pode servir de molde para o próximo ciclo. A reação de PCR possui três fases: a desnaturação, o anelamento de *primers* (*ver*) e a polimerização, que é feita pela DNA polimerase. Muitos marcadores genético-moleculares são obtidos por meio da PCR, como RAPD (*ver*), AFLP (*ver*), microssatélites (*ver*), entre outros.

PCR-RFLP: É um tipo de marcador genético-molecular do DNA que combina as propriedades da PCR (*ver*) e dos marcadores RFLP (*ver*). Esse tipo de marcador também é conhecido como CAPS (*ver*).



PCR-sequencing: Determinação da seqüência de nucleotídeos de um fragmento amplificado de DNA via PCR utilizando *primers* (*ver*) específicos (15 a 30 pb) para determinada região do genoma em estudo. Para a determinação da seqüência de nucleotídeos, existem hoje os seqüenciadores automáticos muito utilizados nos projetos genoma (*ver*). O PCR-sequencing é muito útil em estudos taxonômicos (*ver taxonomia*) interespecíficos, como por exemplo, estudos de reconstrução filogenética (*ver filogenia*).

Pedigree: Genealogia (*ver*) de um indivíduo ou de uma população.

Plantas perenes: São plantas que têm o ciclo biológico superior a dois anos.

Plasmídeo: DNA circular, fita dupla, extracromossomal e de replicação autônoma. Geralmente, é encontrado no citoplasma de células bacterianas. Os plasmídeos são muito utilizados em técnicas da Engenharia Genética (*ver*).

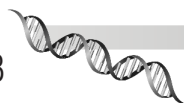
Plasticidade: Mudanças morfológicas e/ou fisiológicas em um organismo, resultantes da influência de fatores ambientais sobre a expressão do genótipo desse indivíduo.

Polimorfismo: Ocorrência regular e simultânea na mesma população heterozigota de dois ou mais tipos distintos de formas. Em Genética, é a ocorrência em uma população de dois ou mais alelos (*ver*) em que o alelo mais raro é encontrado em uma freqüência maior que 1. Em Genética Molecular, o termo polimorfismo é usado para indicar a presença de diferentes moléculas protéicas ou fragmentos de DNA no mesmo loco (*ver*).

População: Grupo de indivíduos que compartilha um mesmo grupo de genes.

Porta-enxerto: Ramo ou tronco que recebe o enxerto. O mesmo que “cavalo”.

Primers: Oligonucleotídeo de DNA ou RNA que hibridiza com uma cadeia de DNA molde e fornece uma extremidade 3´-Hidroxila livre para a iniciação da síntese e amplificação de uma seqüência de DNA pela DNA polimerase. Em português é chamado iniciador. Os iniciadores (*primers*) são muito utilizados em biologia molecular para marcação de sondas de DNA e em reações de PCR (*ver*) para obtenção de marcadores moleculares do DNA.



Progênie: Descendência, geração, prole.

Projeto genoma: Terminologia usualmente usadas para um conjunto de atividades e tecnologias que visam estudar o genoma (*ver*). Tais atividades e tecnologias são utilizadas para identificar, mapear, determinar as seqüências de nucleotídeos, armazenar em bancos de dados e analisar essa informação, tornando-a acessível para pesquisas biológicas. O objetivo final é descobrir a estrutura física e funcional de todos os genes (*ver*) de determinado genoma (*ver*).

Protoplasto: Célula vegetal desprovida da parede celular.

Q

QTL: Vem do inglês *Quantitative Trait Loci*. São *locus (loci)*, regiões cromossômicas, associados ou ligados a marcadores genéticos que têm efeito sobre características quantitativas (*ver*).

R

RAPD: Vem do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*, ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso. São fragmentos de DNA amplificados pela PCR (*ver*) utilizando *primers* curtos (geralmente dez nucleotídeos) de seqüência aleatória. Como o *primer* possui seqüência aleatória, a seqüência alvo da amplificação é desconhecida.

RBIP: Vem do inglês *Retrotransposon Based Insertional Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular co-dominante (*ver*) amplificado via PCR (*ver*) utilizando *primers* desenhados a partir de *retrotransposon* e suas regiões flangeadoras. A presença ou a ausência da inserção de *retrotransposons* é investigada com base em duas PCRs: a primeira PCR usando um *primer* desenhado a partir do *retrotransposon* e outro de uma região flangeadora e a segunda PCR usando *primers* desenhados com base em duas regiões flangeadoras.



Recombinação genética: Formação de combinações de genes (*ver*) como resultado da segregação em cruzamentos entre progenitores geneticamente distintos. É também o rearranjo de genes ligados, causado pela permuta ou *crossing over*.

Recursos genéticos: Variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade (*ver*), de interesse socioeconômico atual e potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins.

Regeneração: Reprodução de um acesso para manutenção de sua integridade genética. Na coleção-base (*ver*) e na coleção ativa (*ver*) é feita no campo quando as sementes armazenadas perdem a viabilidade em cerca de 80% do poder germinativo inicial. Na conservação *in vitro*, refere-se à transferência para casa de vegetação e/ou campo das plântulas competentes do acesso com a finalidade de permitir o revigoramento delas. Na criopreservação (*ver*), refere-se à obtenção de plantas a partir de meristemas, ápices caulinares, embriões e células armazenadas. Em cultura de tecidos, refere-se à formação de brotações ou embriões somáticos (*ver*) a partir do explante (*ver*) cultivado, possibilitando a obtenção de plantas inteiras.

REMAP: Vem do inglês *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em sítios de inserção de *retrotransposons* (*ver*). Fragmentos entre *retrotransposons* (*ver*) e microssatélites (*ver*) são amplificados via PCR (*ver*) usando um *primer* (*ver*) baseado nas regiões de terminação conservadas (LTRs - *Long Terminal Repeats*) (*ver retrotransposons*) e outro baseado em regiões de microssatélites (*ver*).

Reservatório gênico: Totalidade dos genes presentes em determinada população de um organismo de reprodução sexuada, em algum momento. Geralmente, o conceito aplica-se aos membros de populações de uma mesma espécie com fertilidade comum maior devido ao relacionamento filogenético, mas situações desviantes podem ocorrer com a fertilidade comum, atingindo outras espécies e até mesmo gêneros.



Retrotransposons: Compreendem a classe mais comum de *transposons* (*ver*) e ocorrem em grande número de cópias em genomas de plantas. São *transposons* que se mobilizam no genoma hospedeiro através de um intermediário de RNA, de forma replicativa. Possuem longas terminações repetidas de mesma direção (LTRs – *Long Terminal Repeats*) de ambos os lados.

RFLP: Vem do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou seja, polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição. São fragmentos de DNA, obtidos com o uso de enzimas de restrição (*ver*), separados por eletroforese (*ver*) e visualizados por meio de hibridizações com sondas (*ver*) de seqüências homólogas (*ver*) marcadas com radioatividade ou fluorescência.

RNA: Vem do inglês *Ribonucleic Acid*, ou seja, ácido ribonucléico. Molécula linear constituída de uma cadeia única, contendo quatro diferentes nucleotídeos (*ver*) ligados covalentemente. Quanto à estrutura, a molécula de RNA é similar à de DNA, porém na molécula de RNA o açúcar presente é a ribose e no lugar da base nitrogenada timina está presente a uracila. Existem diferentes tipos de moléculas de RNA, o RNA mensageiro (RNAm), o RNA ribossômico (RNAr) e o RNA transportador (RNAt). O RNA é sintetizado a partir de uma molécula-molde de DNA pelo processo de transcrição, possuindo a função de transferir a informação a informação genética do DNA para a biossíntese protéica (tradução). Certos vírus possuem RNA como material genético que, em alguns casos, pode ser sintetizado usando o próprio RNA viral como molde.

S

SCAR: Vem do inglês *Sequence Characterized Amplified Regions*, ou seja, regiões amplificadas a partir de seqüências caracterizadas. É um tipo de marcador genético-molecular amplificado com *primers* (*ver*) específicos, desenvolvidos com base em seqüências já caracterizadas. Muitos desses marcadores são obtidos a partir da conversão de marcadores RAPD (*ver*). Para tal conversão, o fragmento RAPD é seqüenciado e *primers* (*ver*) específicos são construídos para a amplificação.



Segregação: Separação dos cromossomos parentais na meiose e conseqüente separação dos genes, o que torna possível a recombinação genética (*ver*) na progênie (*ver*).

Seleção: Discriminação entre indivíduos quanto ao número de descendentes que são preservados para a geração seguinte. Significa favorecer determinados indivíduos em relação a outros.

Seleção recorrente: É um método de melhoramento genético utilizado para aumentar gradativamente a freqüência de alelos desejáveis para uma característica quantitativa, por meio de repetidos ciclos de seleção, sem reduzir a variabilidade genética da população (*ver*). A seleção recorrente envolve três etapas: (a) desenvolvimento de progênies (*ver*); (b) avaliação de progênies; e (c) recombinação das progênies superiores para formar a geração seguinte.

Seqüenciamento do DNA: Determinação da seqüência de nucleotídeos (*ver*) do DNA.

Seqüências homólogas: São duas ou mais seqüências de nucleotídeos (*ver*) em ácidos nucléicos (*ver DNA e RNA*) ou de aminoácidos em proteínas iguais ou semelhantes.

SFLA: Vem do inglês *Selective Fragment Length Amplification*. É um tipo de marcador genético-molecular sinônimo dos marcadores AFLP (*ver*).

Sinonímia: É a relação que se estabelece entre dois vocábulos que têm significação muito próxima permitindo que um seja escolhido pelo outro em alguns contextos sem alterar o sentido literal da sentença como um todo. Em recursos genéticos é usada quando existem diferentes nomes para o mesmo acesso.

Sistema de cruzamento: Sistema natural por meio do qual uma espécie sexuada se reproduz. Há dois tipos principais de sistemas de cruzamento: autogamia (*ver*) e alogamia (*ver*).

SNP: Vem do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular do DNA utilizado para identificar mutações e polimorfismos



baseados na posição de um único nucleotídeo, necessitando de informações de seqüenciamento do DNA para o desenho de *primers* e sondas específicas.

Sondas: Molécula marcada que se liga especificamente a um ácido nucléico ou a uma proteína que está sendo procurada, de forma que as moléculas-alvo possam ser detectadas. Sondas de ácidos nucléicos são DNAs ou RNAs, marcadas radioativa ou quimicamente, complementares a essas seqüências. As sondas são muito utilizadas em tecnologias de genética e Biologia Molecular.

SPAR: Vem do inglês *Single Primer Amplification Reaction*, ou seja, reação de amplificação com *primer (ver)* único. É uma técnica para obtenção de marcadores genético-moleculares do DNA por meio da amplificação via PCR (*ver*) usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de seqüência de microssatélites.

SRFA: Vem do inglês *Selective Restriction Fragment Amplification*. É um tipo de marcador genético-molecular sinônimo dos marcadores AFLP (*ver*).

S-SAP: Vem do inglês *Sequence-Specific Amplified Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em fragmentos de DNA que flanqueiam sítios de inserção de *retrotransposons (ver)*. Os fragmentos são amplificados via PCR (*ver*) usando um *primer (ver)* desenhado a partir de regiões de terminação conservadas (LTRs - *Long Terminal Repeats (ver retrotransposons)*) e outro baseado na presença de um sítio de endonucleases de restrição (*ver enzimas de restrição*) próximo às LTRs.

SSCP: Vem do inglês *Single-Strand Conformation Polymorphism*. São fragmentos de DNA de 200 a 800 pb amplificados via PCR, usando *primers (ver)* específicos os quais são desnaturados para fita simples e separados por eletroforese. O princípio desse tipo de marcador é que a eletroforese da fita simples do DNA permite a detecção da variação da seqüência de nucleotídeos de cada fragmento, responsável por sua estrutura secundária. As técnicas de DGGE (*ver*) e TGGE (*ver*) são utilizadas na obtenção desses marcadores genético-moleculares.

SSLP: Vem do inglês *Simple Sequence Length Polymorphisms*. É um tipo de marcador molecular do DNA baseado na detecção de microssatélites (*ver*), sinônimo de SSR (*ver*).



SSR: Vem do inglês *Simple Sequence Repeats*. É um tipo de marcador molecular do DNA baseado na detecção de microssatélites (*ver*) utilizando *primers* (*ver*) específicos e a PCR (*ver*). Também conhecido como marcador microssatélite.

STMS: Vem do inglês *Sequence Tagged Microsatellites*. É um tipo de marcador molecular do DNA baseado na detecção de microssatélites (*ver*), sinônimo de SSR (*ver*).

T

Taxonomia: Estudo da classificação dos seres em categorias de várias ordens, baseado em semelhanças e diferenças entre eles, com a descrição e denominação dessas categorias.

Tecnologia do DNA recombinante: Conjunto de técnicas que visam à obtenção de moléculas de DNA resultantes de manipulação *in vitro*. Essas técnicas são muito utilizadas na Engenharia Genética (*ver*).

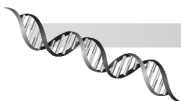
TGGE: Vem do inglês *Thermal Gradient Gel Electrophoresis*. É uma técnica de separação de marcadores genético-moleculares do DNA amplificados via PCR (*ver*) por meio de eletroforese em géis sob temperaturas desnaturantes.

Tratos culturais: Conjunto de atividades necessárias à condução das culturas agrícolas como podas, retirada de brotos, capinas, irrigação, adubação de cobertura, tratamentos fitossanitários.

Transposons: Também chamados elementos transponíveis. São unidades genéticas ou segmentos de DNA capazes de translocar e se inserir em uma nova posição do genoma.

V

Variabilidade: Estado de ser variável, em qualquer categoria considerada. Em genética há uma tendência de associar variabilidade com o nível micro, como, por exemplo, no caso da variabilidade genética de organismos.



Variabilidade genética: Variação hereditária devida à constituição genética dos indivíduos de uma população, sendo responsável por parte das suas diferenças fenotípicas. A variabilidade causada pelo ambiente manifesta-se geralmente como plasticidade (*ver*), mas toda plasticidade fenotípica resulta de processos moleculares acontecendo no núcleo e citoplasma e esta é, portanto, genotipicamente controlada. Em geral, a variabilidade genética é considerada como a amplitude da variação genética existente em uma determinada espécie, coleção de germoplasma ou população.

Vetor: Molécula de DNA derivada normalmente de um plasmídeo (*ver*) ou bacteriófago (*ver*), na qual fragmentos de DNA podem ser inseridos ou clonados. Essa molécula auto-replica e serve de veículo para replicação de outras moléculas de DNA.

VNTR: Vem do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*, ou seja, número variável de repetições em *tandem* (lado a lado). É um tipo de marcador genético- molecular do DNA baseado na detecção de minissatélites (*ver*).



Referência - Glossário

- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. New York: John Wiley, 1960. 485 p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 1997. 574 p.
- BORÉM, A. **Pequeno glossário de termos agrônômicos**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1998. 169 p.
- COOMBS, J. **Dictionary of biotechnology**. New York: Elsevier, 1986. 330 p.
- KENDREW, S. J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell, 1994. 1165 p.
- SCHULTZ, A. **Dicionário de botânica**. Porto Alegre: Globo, 1969. 239 p.
- TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.
- VALOIS, A. C. C.; SALOMAO, A. L.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/sibrargen/glossario/welcome.html>>. Acesso em: 13 jun. 2006.
- VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. (Ed.). **Glossário de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 62 p.



Referências

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, p. 265-273, 1995.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1993. 511 p.

AYAD, W. G.; HODGKIN, T.; JARADAT, A.; RAO, V. R. (Ed.). **Molecular genetic techniques for plant genetic resources**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 137 p.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574 p.

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 1997. 574 p.

BORNER, A.; CHEBOTAR, S.; KORZUN, V. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 494-497, 2000.

BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Secretaria Geral. **Projeto Radam Brasil**. Rio de Janeiro, 1981. 640 p.

BRONDANI, C. Variação isoenzimática de três espécies do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) relacionadas morfológicamente à mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 287-289, 1996.

CABRAL, G. B.; CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, R. A. Relationship analysis of closely related species to cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on microsatellite-primed PCR. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., 1998, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 36-50.



CAETANO-ANOLLES, G.; CALLAHAN, L. M.; GRESSHOFF, P. M. The origin of bermudagrass (*Cynodon*) off-types inferred by DNA amplification fingerprinting. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 81-87, 1997.

CAMIN, J. H.; SOKAL, R. R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution**, Lancaster, v. 19, p. 311-326, 1965.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 120, p. 133-142, 2001.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in a germplasm collection assessed by RAPD assay. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., 1998, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000a. p. 80-92.

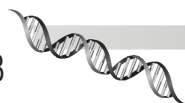
CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Morphological descriptors and random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker used to assess the genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., 1998, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000b. p. 51-64.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Phenetic relationships and genetic diversity among geographic landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) revealed by PCR-based markers. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., 1998, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000c. p. 65-79.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; MARTINEZ, D. E.; TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources: a case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 51-59, 1998.

CESKA, J. F.; AFFOLTER, J. M.; HAMRICK, J. C. Developing a sampling strategy for *Baptisia arachnifera* based on allozyme diversity. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 11, p. 1133-1139, 1997.

CHANDLER, G. T.; BAYER, R. J.; CRISP, M. D. A molecular phylogeny of the endemic Australian genus *Gastrolobium* (Fabaceae: Mirbelieae) and allied genera using chloroplast and nuclear markers. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 88, p. 1675-1687, 2001.



CHANDRA, S.; HUAMAN, Z.; HARI KRISHNA, S.; ORTIZ, R. Optimal sampling strategy and core collection size of Andean tetraploid potato based on isozyme data: a simulation study. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104. p. 1325-1334, 2002.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M. M.; TOHME, J.; DUQUE, M. C.; IGLESIAS, C.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; KOCHERT, G. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, p. 263-273, 1999.

CHEN, X. M.; LINE, R. F.; LEUNG, H. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 345-355, 1998.

CHO, R. J.; MINDRINOS, M.; RICHARDS, D. R.; SAPOLSKY, R. J.; ANDERSON, M.; DRENKARD, E.; DEWDNEY, J.; REUBER, T. L.; STAMMERS, M.; FEDERSPIEL, N.; THEOLOGIS, A.; YANG, W. H.; HUBBELL, E.; AU, M.; CHUNG, E. Y.; LASHKARI, D.; LEMIEUX, B.; DEAN, C.; LIPSHUTZ, R. J.; AUSUBEL, F. M.; DAVIS, R. W.; OEFNER, P. J. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, New York, v. 23, p. 203-207, 1999.

CLARK, A. G.; LANIGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, p. 1096-1111, 1993.

CORRÊA, R. X.; ABDELNOOR, R. V.; FALEIRO, F. G.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v. 58, p. 15-22, 1999.

CORRÊA, R. X.; COSTA, M. R.; GOOD-GOD, P. I.; RAGAGNIN, V. A.; FALEIRO, F. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 804-807, 2000.

COSTA, A. M. **Uso de marcadores RAPD e do Sistema de Informação Geográfica no estudo da variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr et S. Costa**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenols. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 8, p. 8-12, 1990.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 648 p.



CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **Programa GQMOL**: genética quantitativa e molecular. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2005.

DALLAS, J. F. Detection of DNA "fingerprints" of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. **Proceedings of the National Academic of Science USA**, Washington, v. 85, p. 6831-6835, 1988.

DEAN, R. E.; DAHLBERG, J. A.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Genetic redundancy and diversity among 'orange' accessions in the US National Sorghum Collection as assessed with simple sequence repeat (SSR) markers. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1215-1221, 1999.

DEL RIO, A. H.; BAMBERG, J. B.; HUAMAN, Z. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 1. Effects of seed increase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 191-198, 1997a.

DEL RIO, A. H.; BAMBERG, J. B.; HUAMAN, Z.; SALAS, A.; VEJA, S. E. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 2. *In situ* vs *ex situ*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 199-204, 1997b.

DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 405-475.

DIWAN, N.; McLINTOSH, M. S.; BAUCHAN, G. R. Methods of developing a core collection of annual medicago species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 90, p. 755-761, 1995.

FALEIRO, A. S. G.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; YAMADA, M. M.; BAHIA, R. C. S.; CORRÊA, R. X. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches' broom based on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 290-297, 2004a.

FALEIRO, F. G. Seleção assistida por marcadores moleculares: diferentes aplicações: mesa redonda. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T.; CORDEIRO, M. C. R.; SOUZA, T. L. P. O.; MÉRIDA, J. L. Similaridade genética de acessos de *Arachis pintoi* com diferentes níveis de produtividade de matéria seca com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003a. 1 CD-ROM.



FALEIRO, F. G.; BARROS, A. M.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T.; GOMES, A. C.; ANDRADE, R. P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003b. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; FERNANDES, F. D.; KARIA, C. T.; BELLON, G.; RAMOS, A. K. B.; MARTHA JÚNIOR, G. B.; ANDRADE, R. P.; JANK, L. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Panicum maximum* com base em marcadores moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004b. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; BARROS, A. M.; SILVA, D. O. C. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Stylosanthes guianensis* com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003c. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; RAMOS, A. K. B. Seleção de genitores de *Stylosanthes guianensis* utilizando a diversidade genética analisada com base em características morfológicas, agrônômicas e moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004c. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; ROCHA, J. B.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 12-17, 2004d.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, Itabuna, v. 13, p. 79-86, 2001.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, Itabuna, v. 15, p. 41-46, 2003d.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIEDRA, A. G.; MOURA, A. D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J. R. B.; GRAMACHO, K. P.;



FALEIRO, A. S. G.; SANTOS, M. C. M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 227-233, 2004e.

FALEIRO, F. G.; QUEIROZ, V. T.; LOPES, U. V.; GUIMARÃES, C. T.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; ARAÚJO, I. S.; PEREIRA, M. G.; SCHNELL, R.; SOUZA FILHO, G. A.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis perniciosa*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 149, n. 1/2, p. 227-235, may 2006.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; SHUSTER, I.; CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 28, p. 59-66, 2003e.

FALEIRO, F. G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V. A.; CRUZ, C. D.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associadas a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 1387-1397, 2003f.

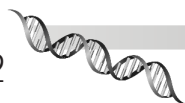
FALEIRO, F. G.; VINHADELLI, W. S.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Riberão Preto, v. 23, p. 399-402, 2000.

FALEIRO, F. G.; YAMADA, M. M.; LOPES, U. V.; FALEIRO, A. S. G.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; SANTOS, R. C.; SANTOS, R. F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicates in the Cacao Research Center germplasm collection, based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, p. 435-440, 2002.

FARRIS, J. S. Methods for computing Wagner trees. **Systematic Zoology**, v. 19, p. 83-92, 1970.

FERREIRA, J. J.; ALVAREZ, E.; FUEYO, M. A.; ROCA, A.; GIRALDEZ, R. Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 257-261, 2000.

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



FIGUEIRA, A.; LAMBERT, S. V.; CARPENTER, D.; PIRES, J. L.; CASCARDO, J. C. M.; ROMANCZYK, L. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinting genotypes of *Theobroma cacao* from Brazil and Malaysia. **Tropical Agriculture**, London, v. 74, p. 132-139, 1997.

FLAVELL, A. J.; KNOX, M. R.; PEARCE, S. R.; ELLIS, T. H. N. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. **The Plant Journal**, Heslington, v. 16, p. 643-650, 1998.

GEPTS, P. Genetic markers and core collections. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; HINTUM, T. J. L. van; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p. 127-146.

GHISLAIN, M.; ZHANG, D.; FAJARDO, D.; HUAMAN, Z.; HIJMANS, R. J. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 46, p. 547-555, 1999.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, p. 1524-1528, 1997.

GOTO, S.; THAKUR, R. C.; ISHII, K. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. **Plant Cell Reports**, New York, v.18, p. 193-197, 1998.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Washington, v. 27, p. 857-874, 1971.

GOWER, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v. 53, p. 325-338, 1966.

GREENE, S. L.; HART, T. C.; AFOONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germoplasm for *ex situ* collections: II Post-collektion analysis. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 234-240, 1999.

GRENIER, C.; DEU, M.; KRESOVICH, S.; BRAMEL-COX, P. J.; HAMON, P. Assessment of genetic diversity in three subsets constituted from the ICRISAT sorghum collection using random vs non-random sampling procedures B. Using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 197-202, 2000.

GUARINO, L.; JARVIS, A.; HIJMANS, R. J.; MAXTED, N. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resource. In: EGELS, J. M. M.; RAMATHA RAO, V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed.). **Managing plant genetic diversity**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 387-404.



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.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1989. 682 p.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. **Genetic Analysis - biomolecular engineering**, Amsterdam, v. 9, p. 73-79, 1992.

HELA, S.; SALWA, Z.; SALEM ALI, O. M.; ABDELMAJID, R.; MOHAMED, M.; MOKHTAR, T. Genetic polymorphism of plastid DNA in Tunisian date-palm germplasm (*Phoenix dactylifera* L.) detected with PCR-RFLP. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 51, p. 479-487, 2004.

HINTUM, T. J. L. van; BOUKEMA, I. W.; VISSER, D. L. Reduction of duplication in a *Brassica oleracea* germplasm collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 43, p. 343-349, 1996.

HINTUM, T. J. L. van; VISSER, D. L. Duplication within and between germplasm collections. II. Duplication in four European barley collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 42, p. 135-145, 1995.

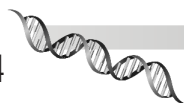
HOKANSON, S. C.; SZEWC-McFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; McFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 671-683, 1998.

HUAMAN, Z.; ORTIZ, R.; ZHANG, D. P.; RODRIGUEZ, F. Isozyme analysis of entire and core collections of *Solanum tuberosum* subsp *andigena* potato cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 273-276, 2000.

HUANG, H. W.; LAYNE, D. R.; RIEMENSCHNEIDER, D. E. Genetic diversity and geographic differentiation in pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] populations from nine states as revealed by allozyme analysis. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 123, p. 635-641, 1998.

HUANG, X.; BÖRNER, A.; RÖDER, M.; GANAL, M. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, p. 699-707, 2002.

ISABEL, N.; TREMBLAY, L.; MICHAUD, M.; TREMBLAY, F. M.; BOUSQUET, J. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations



of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, p. 81-87, 1993.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, London, v. 314, p. 67-73, 1985.

KALENDAR, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN, A. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 704-711, 1999.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**. Rome: IPGRI, 1997. 47 p. (Technical Bulletin, 2).

KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 77, p. 693-712, 1990.

KICHERER, S.; BACKES, G.; WALTHER, U.; JAHOOOR, A. Localising QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 881-888, 2000.

KIM, S. C.; CRAWFORD, D. J.; JANSEN, R. K.; SANTOS-GUERRA, A. The use of a non-coding region of chloroplast DNA in phylogenetic studies of the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Lactuceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 215, p. 85-99, 1999.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, London, v. 16, p. 111-120, 1980.

LACAPE, J. M.; NGUYEN, T. B.; COURTOIS, B.; BELOT, J. L.; GIBAND, M.; GOURLOT, J. P.; GAWRYZIAK, G.; ROQUES, S.; HAU, B. QTL Analysis of cotton fiber quality using multiple *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross generations. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 123-140, 2005.

LAKSHMI, M.; RAJALAKSHMI, S.; PARANI, M.; ANURATHA, C. S.; PARIDA, A. Molecular phylogeny of mangroves I. Use of molecular markers in assessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 1121-1127, 1997.

LAMBOY, W. F.; McFERSON, J. R.; WESTMAN, A. L.; KRESOVICH, S. Application of isozyme data to the management of the United States national *Brassica oleracea* L. genetic resources collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 41, p. 99-108, 1994.



LAMBOY, W. F.; YU, J.; FORSLINE, P. L.; WEEDEN, N. F. Partitioning of allozyme diversity in wild populations of *Malus sieversii* L. and implications for germplasm collection. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 121, p. 982-987, 1996.

LEMIEUX, B.; AHARONI, A.; SCHENA, M. Overview of DNA chip technology. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 4, p. 277-289, 1998.

LI, C. T.; SHI, C. H.; WU, J. G.; XU, H. M.; ZHANG, H. Z.; REN, Y. L. Methods of developing core collections based on the predicted genotypic value of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 1172-1176, 2004.

LITT, M.; LUTH, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Atlanta, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIVINI, C.; AJMONE-MARSAN, P.; MELCHINGER, A. E.; MESSEMER, M. M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic group revealed by RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 84, p. 17-25, 1992.

LU, C. F.; SHEN, L. S.; TAN, Z. B.; XU, Y. B.; HE, P.; CHEN, Y.; ZHU, L. H. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 145-150, 1997.

MARITA, J. M.; RODRIGUEZ, J. M.; NIENHUIS, J. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, p. 515-526, 2000.

MAY, B. Starch gel electrophoresis of allozymes In: HOELZEL, A. R. (Ed.). **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach**. Oxford: Oxford University, 1992. p. 1-27.

MELOTTO, M.; KELLY, J. D. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 508-517, 2001.

McGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 135-144, 2000.



McGREGOR, C. E.; TREUREN, R. van; HOEKSTRA, R.; HINTUM, T. J. L. van. Analysis of the wild potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLPs: implications for ex situ conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 146-156, 2002.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELLI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Heslington, v. 3, p. 175-182, 1993.

NEALE, D. B.; WILLIAMS, C. G. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 21, p. 545-554, 1991.

NEBAUER, S. G.; DEL CASTILLO-AGUDO, L.; SEGURA, J. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 985-994, 1999.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

NORUSIS, M. J. **SPSS for windows, advanced statistics**, Release 6.0. Chicago: SPSS, 1993.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 96, p. 5586-5591, 1999.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 551-568, 1999.

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



PARZIES, H. K.; SPOOR, W.; ENNOS, R. A. Genetic diversity of barley landrace accessions (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) conserved for different lengths of time in ex situ gene banks. **Heredity**, Edinburgh, v. 84, p. 476-486, 2000.

PATERSON, A. H.; DAMON, S.; HEWITT, J. D.; ZAMIR, D.; RABINOWITCH, H. D.; LINCOLN, S. E.; LANDER, E. S.; TANKSLEY, S. D. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, Maryland, v. 127, p. 181-197, 1991.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 1248-1255, 1998.

PIRES, J. L.; LOPES, U. V.; FALEIRO, F. G.; YAMADA, M. M.; MARITA, J. M. Identificação de associações de marcas moleculares com caracteres de interesse usando informações de germoplasma. In: WORKSHOP ON PROJECT FINAL EVALUATION: THE USE OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES IN SEARCH FOR VARIETIES RESISTANT TO WITCHES BROOM DISEASE OF COCOA, 2005, Ilhéus, Bahia. 1 CD-ROM.

PIRES, J. L.; MARITA, J. M.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; AITKEN, W. M.; MELO, G. P.; MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON NEW TECHNOLOGIES AND COCOA BREEDING, 2000, Kota Kinabalu, Sabah. **Proceedings...** Kota Kinabalu, Sabah: Ingenic, 2000. p. 72-88.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht v. 2, p. 225-238, 1996.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 8, p. 285-288, 1993.

QUIRINO, M. S. **Polimorfismos de seqüência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência.** 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 763-772, 2001.



RAMSAY, G. DNA chips: State-of-the art. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 40-44, 1998.

REEDY, M. E.; KNAPP, A. D.; LAMKEY, K. R. Isozyme allelic frequency changes following maize (*Zea mays* L.) germplasm regeneration. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 269-273, 1995.

RICK, C. M.; ZOBEL, R. W.; FOBES, J. F. Four peroxidase loci in red-fruited tomato species: genetics and geographic distribution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 71, p. 835-839, 1974.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc - Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.70. New York: Exeter Software, 1992. 217 p.

RUSSELL, J. R.; FULLER, J. D.; MACAULAY, M.; HATZ, B. G.; JAHOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 714-722, 1997.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 6, 4th. ed. Cary, North Caroline, 1989. 846 p.

SICARD, D.; WOO, S. S.; ARROYO-GARCIA, R.; OCHOA, O.; NGUYEN, D.; KOROL, A.; NEVO, E.; MICHELMORE, R. Molecular diversity at the major cluster of disease resistance genes in cultivated and wild *Lactuca* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 405-418, 1999.

SKROCH, P. W.; NIENHUIS, J.; BEEBE, S.; TOHME, J.; PEDRAZA, F. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 488-496, 1998.

SMITH, S. Cultivar identification and varietal protection. In: CAETANO ANNOLES, G.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA markers: protocols, applications and overviews**. New York: Wiley VCH, 1998. p. 383-400.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman and Company, 1973. 573 p.

SOORI, V. A.; WATANABE, K. N.; VALKONEN, J. P. T. Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 164-170, 1999.

SPAGNOLETTI-ZEULI, P. L.; SERGIO, L.; PERRINO, P. Changes in the genetic structure of wheat germplasm accessions during seed rejuvenation. **Plant Breeding**, Berlin, v. 114, p. 193-198, 1995.



STATSOFT. **Statistica for windows [computer program manual]**. Tulsa, 1999. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 14 jun. 2005.

STEINER, A. M.; RUCKENBAUER, P.; GOECKE, E. Maintenance in genebanks, a case study: contaminations observed in the Nurnberg oats of 1831. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, p. 533-538, 1997.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. L. Phylogeny reconstruction. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. (Ed.). **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 411-501.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. A core collection for *Saccharum spontaneum* L. from the world collection of sugarcane. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 879-885, 2001.

TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 1, p. 3-8, 1983.

TANKSLEY, S. D.; JONES, R. A. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 179-181, 1981.

TOHME, J.; GONZALEZ, D. O.; BEEBE, S.; DUQUE, M. C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1375-1384, 1996.

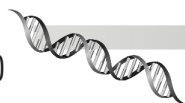
TREUREN, R. van; HINTUM, T. J. L. van. Identification of intra-accession genetic diversity in selfing crops using AFLP markers: implications for collection management. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, p. 287-295, 2001.

TUBEROSA, R.; SALVI, S.; SANGUINETI, M. C.; LANDI, P.; MACCAFERRI, M.; CONTI, S. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 941-963, 2002.

UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. A mini core subset for capturing diversity and promoting utilization of chickpea genetic resources in crop improvement **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, p. 1292-1298, 2001.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. (Ed.). **Glossário de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 62 p.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. L.; ALLEM, A. C. (Ed.). **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/sibrargen/glossario/welcome.html>>. Acesso em: 13 jun. 2005.



VASCONCELOS, M. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 447-451, 1996.

VIRK, P. S.; NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 90, p. 1049-1055, 1995.

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

WAUGH, R.; McLEAN, K.; FLAVELL, A. J.; PEARCE, S. R.; KUMAR, A.; THOMAS, B. B. T.; POWELL, W. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). **Molecular and General Genetics**, New York, v. 253, p. 687-694, 1997.

WAYCOTT, W.; FORT, S. B. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphologic analyses. **Genome**, Ottawa, v. 37, p. 577-583, 1994.

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

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

WOLTERS, P.; POWELL, W.; LABUDAH, E.; SNAPE, J.; HENDERSON, K. Nucleotide diversity at homeologous loci in wheat. In: PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 8., 2000, San Diego. **Abstracts...** San Diego: [s.n.], 2000. p. 103.

WU, X. M.; WU, N. F.; QIAN, X. Z.; LI, R. G.; HUANG, F. H.; ZHU, L. Phenotypic and genotypic changes in rapeseed after 18 years of storage and regeneration. **Seed Science Research**, Oxon, v. 8, p. 55-64, 1998.

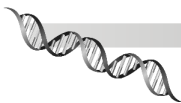
YAMADA, M. M.; LOPES, U. V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom disease in plantations of Bahia, Brazil **Agrotropica**, Itabuna, v. 11, p. 83-88, 1999.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.



ZIMMERER, K. S.; DOUCHES, D. S. Geographical approaches to crop conservation: the partitioning of genetic diversity in Andean potatoes. **Economic Botany**, New York, v. 45, p. 176-189, 1991.

ZORO B, I.; MAQUET, A.; DEGREEF, J.; WATHELET, B.; BAUDOIN, J. P. Sample size for collecting seeds in germplasm conservation: the case of the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 187-194, 1998.



Impressão e acabamento
Embrapa Informação Tecnológica

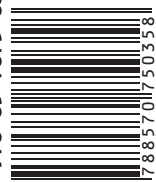
Embrapa

Cerrados

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



ISBN 978-85-7075-035-8



9 788570 750358