



MARCADORES DE DNA

Aplicações no melhoramento de plantas

O sucesso da produção agrícola depende fortemente do uso de variedades com desempenho superior e adaptadas aos ambientes de cultivo. Na inexistência de materiais genéticos superiores, não é possível obter alta produtividade e qualidade do produto. Desta forma, o melhoramento de plantas tem tido papel fundamental no desenvolvimento da agricultura, gerando novas variedades em espécies de interesse agrônomo. O aumento na eficiência de seleção, o melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos têm sido objetivos de melhoristas de plantas do mundo inteiro. Novas formas de alcançar estes objetivos têm sido constantemente perseguidas pelo melhoramento de plantas. Por isso o interesse em tecnologias como as de marcadores de DNA ou moleculares.

Os melhoristas de plantas têm tradicionalmente selecionado variabilidade com base no fenótipo (aparência de um indivíduo). Esta estratégia tem sido de sucesso para características de alta herdabilidade (fenótipo reflete a constituição genética do indivíduo), mas nem sempre para características de baixa herdabilidade (fenótipo pode não refletir o genótipo). Pelo fato de a maioria das características selecionadas no melhoramento de plantas ser de natureza quantitativa, estratégias como teste de progênies e seleção em gerações avançadas têm sido utilizadas para minimizar as dificuldades da seleção. Estas, contudo, não diminuem ou evitam os efeitos da interação genótipo x ambiente, que podem mascarar o fenótipo. Este é a expressão do genótipo (constituição genética de um indivíduo) sob condições ambientais específicas, e assim pode mudar. Desta forma, selecionar o fenótipo é como perseguir um alvo móvel, que muda com o ambiente. Uma forma de evitar este problema seria sele-

cionar indivíduos superiores com base no genótipo, pois este independe do ambiente e não muda durante o ciclo de vida de um indivíduo. Embora isto pareça difícil, novas tecnologias estão disponíveis que permitem ao melhorista acessar e selecionar variabilidade a nível de DNA. O objetivo deste artigo é o de apresentar as diferentes tecnologias de marcadores moleculares e discutir como estas podem auxiliar o melhoramento de plantas.

Tecnologias de marcadores moleculares

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade a nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein et al., 1980) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats; Jeffreys et al., 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams et al., 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) (Paran & Michelmore, 1993); Microsatélite (Litt & Luty, 1989); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al., 1995). As principais etapas requeridas para obtenção de resultados variam com o tipo de marcador molecular utilizado (tabela 1).

Sandra C.K. Milach
UFRRGS, Departamento de
Plantas de Lavoura
Sandra Millach é autora do Livro
"Marcadores Moleculares em Plantas"
millach@vortex.ufrgs.br

Mais detalhes sobre as técnicas aqui apresentadas podem ser encontrados em Milach (1998a) e Ferreira & Gratapaglia (1995). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas. Contudo, os tipos de marcadores aqui listados são ainda os mais utilizados em estudos genéticos e programas de melhoramento.

Atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a implementação de marcadores moleculares na rotina de um programa de melhoramento. A comparação dos tipos de marcadores para essas características encontra-se na tabela 2. Enquanto que marcadores de RFLP têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo por causa da consistência dos resultados obtidos, estes tendem a ser mais caros e mais difíceis de implementar em programas de melhoramento de plantas. Por outro lado, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPDs, são mais fáceis de manipular e de custo menor, embora sejam de resultados menos consistentes. A conversão de marcadores de RFLP em STS e RAPD em SCAR tem sido apontada como uma excelente opção para a seleção assistida por marcadores moleculares. Com exceção do tipo de primer utilizado, SCAR e STS são muito semelhantes à técnica de RAPD, com a vantagem de serem mais consistentes e a desvantagem de envolverem o desenvolvimento de primers, o que eleva o custo. Uma vez que os primers estejam disponíveis, estas técnicas apresentam custo comparável ao RAPD. Este fato, associado à consistência de SCAR e STS, inclui estas entre as técnicas mais promissoras para implantação rotineira em programas de melhoramento de plantas. Outros marcadores como microsatélites e AFLP revelam mais polimorfismo e têm sido a melhor opção para espécies onde este é limitado. Muitos são os aspectos envolvidos na escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado, por isso não existe aquele que possa ser considerado superior para todos os atributos. Por esta razão, as opções disponíveis devem ser analisadas antes de ser decidido o tipo de marcador a ser empregado.

Aplicações de marcadores de DNA no melhoramento de plantas

As etapas fundamentais de um programa de melhoramento de plantas são: obtenção da variabilidade genética; seleção de indivíduos superiores; e avaliação de materiais genéticos promissores

para lançamento comercial. Apesar de ganhos genéticos significativos terem sido obtidos na seleção de características de interesse na maioria das espécies de importância agrônômica, a expectativa de progresso genético e obtenção de indivíduos ainda melhores permanece. Por esta razão, os melhoristas de plantas têm buscado formas de continuar obtendo ganhos genéticos, tornando cada vez mais eficiente cada uma das etapas do programa. A essência deste progresso está em o quanto o fenótipo de um indivíduo expressa o seu genótipo. Por isso que o uso de marcadores moleculares pode auxiliar o melhoramento de plan-



tas, pois possibilita acessar diretamente o genótipo de um indivíduo. Assim, entre as principais aplicações de marcadores de DNA em programas de melhoramento de plantas estão: o monitoramento e organização da variabilidade genética; a seleção assistida por marcadores moleculares; e a proteção de cultivares (Lee, 1995). Cabe salientar, contudo, que estas aplicações não devem ser generalizadas a todos os programas de melhoramento, e não terão a

mesma importância em todas as espécies de plantas. Isso porque o modo de reprodução, as características de interesse, o valor da unidade de seleção, o progresso genético já obtido e outros aspectos pertinentes variam grandemente entre espécies e programas de melhoramento. Por isso, identificar as características de interesse e estabelecer objetivos claros para um programa de melhoramento são passos que precedem a questão: como os marcadores de DNA podem auxiliar o programa? Como outras tecnologias, os marcadores moleculares terão grande impacto e utilização em algumas situações, mas não em todas. Assim, cabe aos melhoristas junto com os especialistas na área molecular decidirem caso a caso se devem ou não utilizar esta tecnologia. Para tomar esta decisão, contudo, é necessário vislumbrar o potencial de aplicação dessas técnicas, o qual discutiremos a seguir.

Responder a questão "como os marcadores moleculares podem auxiliar o melhoramento de plantas?" não é difícil. O difícil e nem sempre claro é responder "quando, em que situações, utilizar marcadores moleculares?". Vamos abordar uma questão de cada vez.

Em termos de variabilidade genética, marcadores moleculares permitem: compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, isto é, acessando variabilidade de DNA, que não é influenciado pelo ambiente como são, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos em geral de uma planta. A primeira consequência disto é a possibilidade de planejar os cruzamentos de um programa de forma a maximizar as diferenças genéticas entre genótipos elites, diferenças essas que muitas vezes não podem ser observadas a nível de fenótipo. A segunda é a possibilidade de organizar o germoplasma do programa em pools genéticos, facilitando a escolha e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelo melhorista.

Em espécies alógamas como milho e girassol, os marcadores podem ainda auxiliar no estabelecimento de grupos heteróticos (Hongtrakul et al., 1997), diminuindo substancialmente o número de cruzamentos-testes a serem avaliados e posteriores combinações híbridas. Como consequência do estudo da variabilidade genética, muitas vezes é possível identificar o padrão molecular (ou fingerprinting) de genótipos de interesse, que pode ser posteriormente utilizado para a proteção do germoplasma. Para maior discussão sobre o uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares ver Milach (1998b). Marcadores moleculares podem ser empregados também na seleção de caracte-

Tabela 1: Principais etapas envolvidas na identificação de variabilidade de DNA com marcadores moleculares

Etapas das tecnologias de marcadores moleculares	Hibridização		Amplificação		
	RFLP/VNTR	RAPD	SCAR/STS	Microsat.	AFLP
Extração de DNA	■	■	■	■	■
Corte do DNA com enzimas de restrição	■	■	■	■	■
Separação por eletroforese dos fragmentos de DNA cortados	■	■	■	■	■
Transferência dos fragmentos do gel para membrana de nitrocelulose	■	■	■	■	■
Obtenção e tratamento de sondas moleculares	■	■	■	■	■
Hibridização da sonda na membrana de nitrocelulose	■	■	■	■	■
Exposição da membrana a filme de raio X	■	■	■	■	■
Ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA cortados	■	■	■	■	■
Obtenção e/ou desenvolvimento de <i>primers</i>	■	■	■	■	■
Amplificação de fragmentos de DNA em termociclador com <i>primers</i>	■	■	■	■	■
Separação por eletroforese dos fragmentos de DNA amplificados	■	■	■	■	■
Visualização de fragmentos de DNA com luz ultravioleta em gel de agarose	■	■	■	■	■
Visualização de fragmentos de DNA com nitrato de prata em gel de policrilamida	■	■	■	■	■
Tempo para resultados (dias)	7-21	1-2	1-2	2-3	2-3

■ etapa requerida ■ etapa não requerida

rísticas de interesse. Neste caso, é necessário primeiro identificar marcadores associados a essas características através do mapeamento molecular (Milach, 1998c). Uma vez que esta informação esteja disponível, é possível selecionar os indivíduos com o marcador de interesse, sem que haja necessidade de avaliar o fenótipo dos mesmos. Esta, também conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM), pode ter grande impacto nos casos em que a característica de interesse é de avaliação difícil e cara. Também no caso de espécies perenes, de ciclo longo, quando houver necessidade de esperar alguns anos até que a característica fenotípica se expresse. O sucesso da SAMM dependerá do grau de associação entre marcador e característica de interesse: quanto maior, menor a chance de ocorrer recombinação entre marcador e gene que controla a característica, e maior será a eficiência da seleção. Salientamos que o marcador, na maioria das vezes, está associado à característica, não sendo o gene que controla a mesma. De acordo com Lee (1995), a expectativa da SAMM dependerá do grau de associação entre marcador e característica de interesse: quanto maior, menor a chance de ocorrer recombinação entre marcador e gene que controla a característica, e maior será a eficiência da seleção. Salientamos que o marcador, na maioria das vezes, está associado à característica, não sendo o gene que controla a mesma. De acordo com Lee (1995), a expectativa da SAMM dependerá do grau de associação entre marcador e característica de interesse: quanto maior, menor a chance de ocorrer recombinação entre marcador e gene que controla a característica, e maior será a eficiência da seleção.

genes de interesse, especialmente transgenes, por retrocruzamento. Neste caso, os marcadores podem ser utilizados de duas formas: para selecionar os indivíduos com o maior número de marcadores semelhantes àqueles do pai recorrente e que possuam o transgene de interesse.

Os exemplos de SAMM ainda são escassos na literatura, especialmente porque as informações de programas de melhoramento de empresas privadas, que são hoje, possivelmente, os principais executores de SAAM, não estão disponíveis. Além disso, o limitado uso de SAAM em programas de melhoramento pode ser consequência do custo e os procedimentos elaborados da maioria dos marcadores disponíveis. Mesmo assim, alguns exemplos publicados, como é o caso da transferência de genes favoráveis de espécies selvagens para cultivada para aumento de tamanho de fruto em tomate (Tanksley et al., 1996; Tanksley & McCouch, 1997), indicam o grande potencial da SAAM para o melhoramento de plantas. Também utilizando um marcador associado à característica de baixa absorção de cádmio em *Triticum durum* (Penner et al., 1995a), o grupo do Dr. Penner avaliou em 1996/1997 duas mil linhagens avançadas de trigo duro

no Canadá, selecionando as com menor capacidade de absorção deste metal (Penner, comunicação pessoal). A possibilidade de converter tipos de marcadores mais elaborados e caros, como RFLP, em mais simples, como STS (Penner et al., 1995b), indica que o uso destes para seleção indireta tende a crescer nos próximos anos. Por fim, o conhecimento do padrão molecular de genótipos poderá ser utilizado, além da proteção legal, para garantir a pureza genética dos mesmos durante os anos de avaliação, bem como após o lançamento comercial. Em relação à pergunta "em que circunstâncias utilizar marcadores moleculares no programa de melhoramento de plantas?", acreditamos que o melhorista deva resolver este aspecto com base na resposta a outras perguntas que agora formulamos. Em termos de variabilidade genética: i) quão difícil é para o melhorista escolher os genótipos genitores e decidir que combinações fazer em número razoável? Se muito difícil em função do grau de parentesco dos genótipos elites do programa, marcadores podem auxiliar; ii) a variabilidade genética disponível entre genótipos adaptados é suficiente ou há necessidade de buscar variabilidade em outras espécies (selvagens)? Se espécies

Tabela 2: Comparação entre marcadores moleculares para cinco atributos de importância para o melhoramento de plantas.

Tipo de marcador	Consistência	Tempo para resultados	Custo	Facilidade de implementar	Polimorfismo*
RFLP	Maior	Maior	Maior	Menor	Baixo-médio
VNTR					Alto
AFLP					Alto
Microsatélite					Alto
RAPD	Menor	Menor	Menor	Maior	Médio-alto

*Varia conforme a espécie.

selvagens forem alvo de interesse, marcadores podem auxiliar a transferência de alelos favoráveis destas espécies e na redução de genes desfavoráveis ligados aos mesmos. Em termos de seleção: i) irá a SAMM levar a ganhos genéticos superiores se comparada à seleção feita com base no fenótipo? A regra geral é a mesma para a seleção indireta, isto é,

$$h^2_{\text{marcador (2)}} \times r_{12} > h^2_{\text{fenótipo (1)}}$$

onde:

$h^2_{\text{marcador (2)}}$ = herdabilidade do marcador (=100%);

r_{12} = correlação entre marcador e característica fenotípica a ser selecionada;

$h^2_{\text{fenótipo (1)}}$ = herdabilidade para característica fenotípica de interesse.

Neste caso, se o produto de $h^2_{\text{marcador (2)}}$ e r_{12} for maior que o valor de $h^2_{\text{fenótipo (1)}}$ então justifica fazer SAMM;

baseada na equação:

ii) os fatores tempo, custo e eficiência da seleção favorecem a SAMM, em vez da seleção com base no fenótipo? iii) em relação ao tempo, qual é a necessidade de diminuir consideravelmente o número de anos para colocar um novo cultivar no mercado? Se muito grande, a SAMM pode ser fundamental. Em termos de avaliação e lançamento de variedades: há necessidade de proteção legal do germoplasma do programa? Se a resposta for sim, marcadores podem auxiliar. Muitas outras perguntas pertinentes poderiam ainda ser formuladas, cujas respostas dependerão da realidade do programa de melhoramento, da espécie, e dos recursos financeiros, físicos e humanos em questão. A mensagem principal que gostaríamos de deixar após a discussão aqui apresentada é que: marcadores moleculares representam, sem dúvida, uma ferramenta poderosa que já está tendo e ainda terá grande impacto no melhoramento de plantas. A decisão do uso desta ferramenta nos diversos programas de melhoramento depende, contudo, da avaliação cautelosa da situação dos mesmos e das circunstâncias em que se pretende aplicá-los. Glossário

Alógamas: espécies com reprodução por fecundação cruzada. Eletroforese: metodologia utilizada para separação de moléculas com tamanho e

carga distintas. Fenótipo: aparência de um indivíduo. Genótipo: constituição genética característica de um indivíduo. Germoplasma: conjunto de genótipos de uma espécie. Herdabilidade: porção da variação fenotípica devido à constituição genética. Hibridização: pareamento de fitas complementares de DNA. Pools gênicos: grupos de genótipos com características comuns dentro de uma espécie. Primer: seqüência de DNA com dez ou mais pares de bases, utilizada

comportamento de sua progênie. Transgenes: genes transferidos para um genótipo através da transformação genética.

Referências bibliográficas

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.V. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32:314-331.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220p.

Hongtrakul, V.; Huestis, G.M.; Knapp, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 95:400-407.

Jeffreys, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 316:76-79.

Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, 55:265-343. Litt, M.; Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44:388-396.

Milach, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: S.C.K. Milach (ed.). *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre, UFRGS, 1998a, p. 17-28.

Milach, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: A. Borém e outros (ed.). *Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária*, Viçosa, 1998b, p. 43-58.

Milach, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agrônômica. In: S.C.K. Milach (ed.) *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre, UFRGS, 1998c, p. 67-73.

Paran, I.; Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85:985-993.

Glossário

Alógamas: espécies com reprodução por fecundação cruzada.

Eletroforese: metodologia utilizada para separação de moléculas com tamanho e carga distintas.

Fenótipo: aparência de um indivíduo.

Genótipo: constituição genética característica de um indivíduo.

Germoplasma: conjunto de genótipos de uma espécie.

Herdabilidade: porção da variação fenotípica devido à constituição genética.

Hibridização: pareamento de fitas complementares de DNA.

Pools gênicos: grupos de genótipos com características comuns dentro de uma espécie.

Primer: seqüência de DNA com dez ou mais pares de bases, utilizada para iniciar a amplificação de DNA

Sonda molecular: fragmento de DNA de mais ou menos 1.000 pares de bases de extensão, utilizado na hibridização.

Termociclador: aparelho utilizado para amplificação de DNA.

Teste de progênie: avaliação de um indivíduo com base no comportamento de sua progênie.

Transgenes: genes transferidos para um genótipo através da transformação genética.

para iniciar a amplificação de DNA Sonda molecular: fragmento de DNA de mais ou menos 1.000 pares de bases de extensão, utilizado na hibridização. Termociclador: aparelho utilizado para amplificação de DNA. Teste de progênie: avaliação de um indivíduo com base no