

# MARCADOR MICROSSATÉLITE NA CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA VEGETAL

Fotos e ilustrações cedidas pelos autores

APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITE NA CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS MANTIDOS EM BANCOS DE GERMOPLASMA

**Andrea Akemi Hoshino**  
Mestranda em Genética  
andrea\_akemi@hotmail.com

**Darío Abel Palmieri**  
Doutorando em Genética  
dario@ibb.unesp.br

**Juliana Pereira Bravo**  
Mestranda em Genética  
jpbravo@yahoo.com.br

**Tatiany Elizabeth Barata Pereira**  
Doutoranda em Genética  
tatianyb@bol.com.br

**Catalina Romero Lopes**  
Professora Titular em Genética  
catalina@ibb.unesp.br

**Marcos Aparecido Gimenes**  
Professor Doutor em Genética  
gimenes@laser.com.br

## INTRODUÇÃO

O Brasil é, reconhecidamente, o país com a maior biodiversidade do planeta. Os recursos genéticos são uma parte bastante importante dessa biodiversidade e são definidos como “o material genético de valor real ou potencial para o ser humano” (Decreto legislativo nº 2 de 08.02.94 apud Walter, 2000).

Os recursos genéticos vegetais compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor comprovado ou mesmo potencial. A manutenção desses recursos realiza-se por meio do estabelecimento de áreas de proteção ambientais e pela coleta e manutenção desses materiais os quais passam a ser denominados germoplasma.

A manutenção adequada de germoplasma depende, em grande parte, da avaliação e caracterização da variabilidade genética contida no mesmo. Esta avaliação contribui para prevenção de possíveis perdas genéticas, como as que podem acontecer durante as multiplicações dos acessos coletados e, possibilitam o estabelecimento dos sítios ou áreas de coletas que contenham maior variabilidade, auxiliando

assim na planificação de novas coletas.

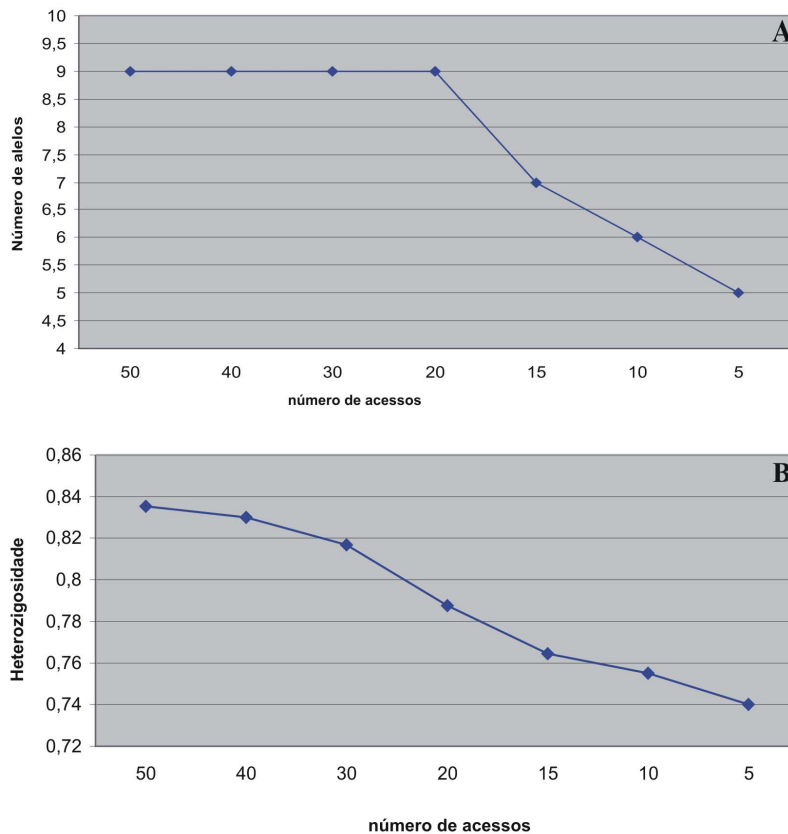
A avaliação da variabilidade genética em germoplasma depende da disponibilidade de marcadores polimórficos e neutros do ponto de vista do efeito ambiental. Neste sentido, avaliações de variabilidade genética em germoplasma de plantas realizam-se utilizando-se vários marcadores baseados na análise direta do DNA (Powell *et al.*, 1995; Galgaro *et al.*, 1998; León *et al.*, 1998; Gimenes *et al.*, 2000, Manifesto *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, marcadores do tipo microsatélite têm sido a ferramenta molecular mais utilizada em estudos ecológicos e genéticos. Os microsatélites, também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”), são formados por seqüências de uma a seis bases de comprimento repetidas em “tandem” (Jacob *et al.*, 1991), encontrados em alta frequência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (Tóth *et al.*, 2000).

A análise de locos microsatélites é realizada por meio da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando-se iniciadores (“primers”) complementares (18 a 25 bases) às regiões que os flanqueiam.



**Figura 1** – Gel de acrilamida 4% corado com prata. Foram utilizados para amplificação “primers” para o loco Ah-3 e DNAs de 20 cultivares de *A. hypogaea* (AABB) (1-20), um acesso de *A. ipaënsis* (BB) (21) e um acesso de *A. duranensis* (AA) (22). (M) Marcador molecular de 10 pares de base



**Figura 2** – Índices de variabilidade genética para o loco Ah-282 calculados a partir da análise de 50 acessos de *Arachis Kublmannii*. Em **A** pode se observar a variação no número de alelos em relação ao número de acessos e em **B** a variação do nível de heterozigosidade em relação ao tamanho da amostra

Entre as vantagens apresentadas pelo marcador microssatélite para avaliação de germoplasma podemos considerar as seguintes: 1 - codominância, a possibilidade de detecção de todos os alelos em um dado loco em um dado indivíduo, o que permite a determinação de todos os alelos presentes em uma população e o cálculo das suas freqüências; 2 - elevado número de alelos, isto é, alto polimorfismo intraespecífico em cada loco, o que torna este loco informativo em populações diferentes permitindo a caracterização de diferentes acessos em uma coleção; 3 - praticidade na integração e comparação dos dados obtidos, que é decorrente do fato dos mesmos serem analisados por PCR utilizando-se “primers” específicos que permitem a amplificação de locos individuais. Neste sentido, marcadores do tipo RAPD e RFLP dificultam a integração dos dados devido a pouca repetibilidade, baixo polimorfismo e erros na interpretação dos resultados obtidos, uma vez que um

grande número de locos é detectado ao mesmo tempo em uma única análise. Outra grande vantagem dos microssatélites é a possibilidade de utilização em espécies relacionadas de “primers” desenvolvidos para uma determinada espécie na detecção de locos SSR, processo esse denominado de *transferabilidade* ou *amplificação cruzada*. Isso permite que uma outra espécie seja avaliada com marcadores potentes, sem a necessidade de gastos com o desenvolvimento de “primers”. Os “primers” que se comportam desta forma são denominados heterólogos e sua aplicação será discutida mais adiante.

#### Isolamento de microssatélites e escolha dos “primers”

Os primeiros trabalhos utilizando microssatélites foram realizados em meados da década de 80. Desde então, os métodos de isolamento de locos de microssatélites têm sido aper-

feiçoados e vários protocolos publicados. Uma ampla revisão sobre o assunto pode ser encontrada em Zane *et al.* (2002).

Nos primeiros protocolos, os locos de microssatélites eram identificados em clones de bibliotecas genômicas totais utilizando-se sondas complementares às regiões de interesse, como por exemplo, (AC)<sub>10</sub> e (AG)<sub>20</sub> (Rassmann *et al.*, 1991). Estes protocolos são eficientes, no entanto, o custo para desenvolvimento de um marcador microssatélite acaba sendo alto, pois, por se tratar de uma biblioteca de DNA genômico total, um grande número de clones deve ser avaliado para se encontrar aqueles que contenham microssatélites. Com o tempo, este problema foi sendo minimizado com o desenvolvimento de protocolos cada vez mais eficientes para o enriquecimento das bibliotecas, isto é, protocolos que aumentam a freqüência de clones que contêm um dado tipo de microssatélites a partir da subtração dos clones que não possuam o tipo de seqüência em seleção. Paetkau (1999) desenvolveu bibliotecas genômicas enriquecidas para repetições do tipo AC, com 40 a 100% de nível de enriquecimento. Este autor utilizou protocolos com marcação dos clones positivos através da extensão de cadeia usando como “primers” oligonucleotídeos biotinizados complementares ao microssatélite em questão. Os clones marcados foram separados com auxílio de estreptavidina ligada a partículas magnéticas. A estreptavidina é uma proteína produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*, a qual liga-se com grande afinidade à biotina (Sano *et al.*, 1994). Esta metodologia é bastante eficiente, porém envolve um grande número de passos em seu desenvolvimento.

Uma outra estratégia bastante difundida e menos laboriosa que a primeira promove a seleção dos clones positivos através da hibridação dos mesmos com sondas de oligonucleotídeos marcadas com biotina (Karagoyzov *et al.*, 1993; Armour *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1994). Neste caso, os clones positivos também são isolados por separação magnética com auxílio de estreptavidina ligada a partículas magnéticas. Os protocolos baseados nesta estratégia precisam da ligação do DNA digerido com enzimas de restrição a um vetor de clonagem ou adaptadores de seqüência conhecida. A

amplificação dos clones positivos para clonagem após a hibridização é realizada com “primers” específicos que se anelam em seqüências conhecidas do vetor ou nos adaptadores.

### Locos altamente polimórficos e com alelos codominantes

Um exemplo do alto polimorfismo dos marcadores microssatélite é o nível de variabilidade encontrado neste tipo de loco no amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*). O amendoim cultivado apresentou muito pouca variação quando cultivares desta espécie foram analisados com marcadores bioquímicos (Stalker *et al.*, 1994), RFLP (Kochert *et al.*, 1991; Paik-Ro *et al.*, 1992), RAPD (Halward *et al.*, 1991), e AFLP (He & Prakash, 1997). Este fato limita o uso dos marcadores disponíveis para a manutenção do germoplasma primário desta espécie. No entanto, dados obtidos recentemente mostram que o polimorfismo encontrado em *A. hypogaea* utilizando-se marcadores microssatélites é muito maior que o observado anteriormente com outros marcadores (Hopkins *et al.*, 1999; Moretzsohn & Valls, 2001). Um exemplo do polimorfismo encontrado em *A. hypogaea* é mostrado na **Figura 1**. Pode-se observar a variação em um loco de microssatélite (loco Ah-3) entre 20 cultivares de *A. hypogaea*. Entre os acessos de *A. hypogaea* é possível visualizar seis alelos e sete genótipos diferentes. Portanto, até em *A. hypogaea* onde outros marcadores não permitiram a detecção de níveis razoáveis de polimorfismo, a análise de locos microssatélites se demonstra promissora para detecção de variabilidade intraespecífica. A variação entre os alelos em alguns casos é muito pequena (2 ou 3 bases, uma vez que foram analisadas repetições de di e trinucleotídeos) e, portanto géis de alta resolução como os de acrilamida devem ser utilizados.

## APLICAÇÕES

### Análise de variabilidade genética

O conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética no germoplasma de uma espécie é de grande importância, pois permite acompanhar a manutenção desta variabilidade durante a

multiplicação dos acessos e contribuir com informações que possam melhorar a amostragem em casos como formação de uma coleção núcleo. A seguir, por exemplo, são apresentados os dados da avaliação da variabilidade no loco Ah-282 de microssatélite em 50 acessos da espécie diplóide *Arachis Kublmannii*. Cada um dos 50 indivíduos foi genotipado e os dados foram utilizados em uma simulação na qual se procurou visualizar a relação entre a variação no tamanho amostral e variações nos valores de dois índices de variabilidade genética: heterozigosidade esperada (He) e número de alelos (**Figuras 2A e 2B**). Como se pode notar nas nestas figuras, se dos 50 acessos analisados 20 fossem amostrados ao acaso, esses 20 provavelmente conteriam todos os alelos detectados e o nível de heterozigosidade esperada seria aproximadamente 0,79. Isto indica que muito provavelmente a maioria dos alelos estaria representada em frequências medianas, o que aumentaria a chance dos mesmos não serem perdidos por erros de amostragem ou deriva genética durante as futuras multiplicações. Além disso, garantiria que o material selecionado fosse molecularmente contrastante, aumentando a probabilidade do uso dos mesmos em estudos futuros como, por exemplo, identificação de marcadores moleculares ligados a um gene de interesse.

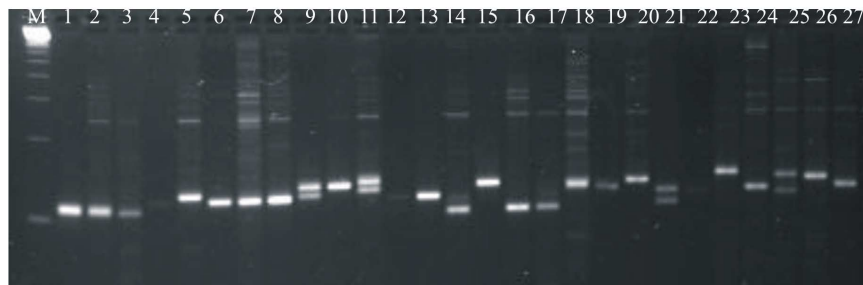
Uma outra vantagem do uso de microssatélites na análise de variabili-

dade genética é a detecção de locos únicos utilizando-se condições altamente estridentes (temperaturas de anelamento altas: 55 a 60°C). Isso facilita a comparação dos dados obtidos por diferentes pesquisadores e ao longo do tempo com o mesmo material. A alta temperatura de anelamento dos “primers” dá ao pesquisador a certeza de estar analisando um loco específico.

### Análise de sistemas de cruzamento

A codominância e o alto nível de polimorfismo tornam os microssatélites também ideais para análise de sistemas de cruzamento em plantas. A codominância permite a detecção de todos os alelos de um loco, que em se tratando de um loco de microssatélite, são em grande número e, na maioria das vezes, encontrados em baixas frequências em uma população, possibilitando a determinação da origem do pólen e conseqüentemente o quanto de fecundação cruzada e autofecundação ocorreu dentro de uma população ou progênie.

A codominância e a facilidade de análise dos dados também tornam esse marcador mais informativo para esse fim. Na **Figura 3**, por exemplo, pode-se observar o polimorfismo obtido em um loco de microssatélite em 27 espécies diplóides pertencentes ao Gênero *Arachis*. Um fato interessante observado nesta figura é que os padrões de



**Figura 3** - Gel de agarose metáfora 3% corado com brometo de etídio. Amplificação do loco Ah-21 com DNAs das seguintes espécies: 1 - *A. hypogaea*, 2 - *A. monticola*, 3 - *A. ipaënsis*, 4 - *A. duranensis*, 5 - *A. magna*, 6 - *A. Batizocoi*, 7 - *A. palustris*, 8 - *A. decora*, 9 - *A. Simpsonii*, 10 - *A. aff. Simpsonii*, 11 - *A. Cardenasii*, 12 - *A. aff. Cardenasii*, 13 - *A. belodes*, 14 - *A. Kublmannii*, 15 - *A. microsperma*, 16 - *A. Hoehnei*, 17 - *A. villosa*, 18 - *A. valida*, 19 - *A. Kempff-Mercadoi*, 20 - *A. praecox*, 21 - *A. stenosperma*, 22 - *A. Diogoi*, 23 - *A. glandulifera*, 24 - *A. subdigitata*, 25 - *A. Pintoi*, 26 - *A. repens*, 27 - *A. Hermanii*, M - marcador molecular de 100 pares de base

bandas obtidos para algumas espécies a exemplo de *A. Simpsonii* (amostra 9), *A. Cardenasii* (amostra 11), *A. stenosperma* (amostra 21), e *A. Pintoi* (amostra 25) mostram a existência de mais de um alelo no mesmo loco. Isto sugere que estes acessos são heterozigotos para este loco, diferentemente do esperado, que seria a homozigose em todos os locos, uma vez que estas espécies são consideradas autógamas por analogia com o amendoim cultivado (Valls & Pizarro, 1994). Além disso, são diplóides, o que descarta a possibilidade da presença de dois locos em homozigose para alelos diferentes, como observado em alguns locos de *A. hypogaea* (AABB) (**Figura 1**). Portanto, os dados sugerem que algumas espécies podem não ser autógamas ou podem ter taxas de fecundação cruzada diferentes.

A determinação do sistema de cruzamento permite o estabelecimento de estratégias para a melhor conservação de uma espécie, seja esta *in situ* ou *ex situ*. Na conservação *in situ*, a análise do sistema de cruzamento contribui para as estimativas da taxa de endogamia, o que para algumas espécies pode levar ao declínio de populações, colocando-as em perigo de extinção, além de levar à diminuição da variabilidade genética existente. Já na conservação *ex situ* o conhecimento do sistema de cruzamento permite o monitoramento do nível da variabilidade existente e permitiria evitar a fecundação cruzada durante a multiplicação, o que ocasionaria a perda de identidade de acessos.

### **Amplificação de locos de microssatélites utilizando “primers” heterólogos**

O alto custo para o desenvolvimento dos marcadores microssatélite é ainda um dos principais fatores que restringe o seu amplo uso. No entanto, já existem vários protocolos disponíveis otimizando a construção de bibliotecas enriquecidas para seqüências repetitivas com excelentes resultados (Karagoyozov *et al.*, 1993; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Paetkau, 1999), com bastante redução de custos. Uma alternativa muito viável para construção de bibliotecas e análise das mesmas na procura de seqüências repetitivas é, como já

dito anteriormente, a utilização em espécies relacionadas de “primers” desenhados com base em seqüências de uma outra espécie (Katzir *et al.*, 1996; Lübberstedt *et al.*, 1998).

Um exemplo da utilização desses “primers” heterólogos é apresentado na **Figura 3**, na qual podem-se observar os produtos obtidos com DNAs de 27 espécies diplóides silvestres do gênero *Arachis* com “primers” para o loco Ah-21 de *A. hypogaea*. Os resultados foram obtidos utilizando-se temperatura de anelamento em média 5°C a 10°C abaixo da temperatura de anelamento utilizada para *A. hypogaea*, a qual por sua vez foi em geral 5°C abaixo do T<sub>m</sub> (“melting temperature”) dos “primers”. Em geral, nas espécies nas quais os locos são amplificados, observa-se uma ou duas bandas. Bandas inespecíficas também são observadas em alguns casos, mas estas geralmente apresentam pesos moleculares bem diferentes e ficam, no gel, distantes dos fragmentos de interesse. Além disso, pode se observar que os fragmentos de interesse são mais intensos que os produtos inespecíficos.

### **LIMITAÇÕES**

Apesar da sua ampla popularidade e uso crescente em diversas áreas, deve-se recordar que os microssatélites apresentam também, além do custo de desenvolvimento, algumas limitações específicas:

a) *Genotipagem*: Geralmente, a genotipagem é realizada determinando o comprimento do produto de PCR obtido que contém o microssatélite. As diferenças observadas (polimorfismo) são atribuídas a alterações no número de unidades repetidas, que estão relacionadas à alta freqüência de mutações que ocorrem nestas seqüências. Porém, é possível que pequenas inserções e/ou deleções aconteçam nas regiões adjacentes que não necessariamente alteram o número de repetições, mas sim alteram o comprimento do fragmento gerado. Nesses casos, a determinação do número de repetições a partir de um fragmento clonado e a sua posterior utilização para amplificação em outras espécies, sem seqüenciamento, pode conduzir a erros na estimativa das distâncias genéticas.

b) *Alelos nulos*: A ocorrência de

mutações de ponto, inserções ou deleções, no sítio de anelamento do “primer” pode impedir a amplificação de um dado loco de microssatélite. Se as alterações não estiverem fixadas na população, somente uma parte dos alelos amplificará. Os alelos não amplificados são denominados de “alelos nulos” (Pemberton *et al.*, 1995). O não conhecimento desta limitação poderá provocar uma estimativa errônea do número de genótipos homozigotos presentes na população. Em muitos casos o redesenho dos “primers” conduzirá a amplificação da totalidade dos alelos.

c) *Taxas mutacionais*: Correlações positivas entre o comprimento da seqüência do microssatélite e a taxa de mutação não são sempre verdadeiras, e podem provocar erros na estimativa das distâncias genéticas. Os atuais modelos mutacionais consideram como igualmente provável a ocorrência de mutações que aumentam ou diminuem o número de unidades repetidas no microssatélite, independente do seu tamanho.

d) *Freqüência entre organismos*: A aplicação deste marcador em um número cada vez maior de organismos tem revelado que a abundância de seqüências repetitivas varia significativamente entre espécies. Enquanto algumas espécies contêm um número suficiente de microssatélites para estudos populacionais, outras apresentam poucas seqüências deste tipo.

e) *Artefatos de PCR*: Teoricamente, a técnica de PCR permite a amplificação de microssatélites a partir de uma única célula. Porém, estudos recentes demonstraram que a amplificação de microssatélites a partir de pequenas quantidades de DNA está associada à alta freqüência de erros (Schlötterer & Pemberton, 1998). Dois tipos comuns de erros neste caso são: a amplificação de alelos com comprimento incorreto e a não amplificação de um alelo nos indivíduos heterozigotos. Uma precaução que deve ser tomada nesses casos é a amplificação do mesmo loco várias vezes para evitar erros na genotipagem.

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Marcadores do tipo microssatélite são uma ferramenta valiosa para análise da variabilidade genética presente

em germoplasma de espécies vegetais e conseqüentemente para a sua manutenção. Esses marcadores podem contribuir também para conservação, já que permitem a obtenção de informações cruciais sobre a biologia de populações naturais, tais como, fluxo gênico, migração, tamanho efetivo, sistema de cruzamento, etc. Do mesmo modo que as isoenzimas, que foram utilizadas amplamente no estudo de populações naturais, locos de microsatélites possuem alelos codominantes, porém estes parecem sofrer menor pressão de seleção, por serem localizados, em geral, em regiões não codificantes. Portanto, microsatélites podem ser considerados marcadores moleculares de segunda geração no estudo de populações naturais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armour, J.A., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A.J. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. **Human Mol. Gen.** 3: 599-605.
- Galgaro, M.L., Lopes, C.R., Gimenes, M.A., Valls, J.F.M., Kochert, G. (1998). Genetic variation between several species of sections *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae*, and *Triseminatae* (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism. **Genome** 41: 445-54.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., Gessler, C. (1998). Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theor Appl Genet.** 96: 1069-76.
- Gimenes, M.A., Lopes, C.R., Galgaro, M.L., Valls, J.F.M., Kochert, G. (2000). Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica** 116: 187-95.
- Halward, T.M., Stalker, H.T., LaRue, E.A., Kochert, G. (1991). Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and wild species. **Genome** 34: 1013-20.
- He, G., Prakash, C.S. (1997). Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica** 97:143-9.
- Hopkins, M.S., Casa, A.M., Wang, T., Mitchell, S.E., Dean, R.E., Kochert, G., Kresovich, S. (1999). Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. **Crop Sci.** 39: 1243-7.
- Jacob, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S.E., Kusumi, K., Bunker, R.K., Mao, Y.P., Ganten, D., Dzau, V.J., Lander, E.S. (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell** 67: 213-24.
- Karagoyozov, L., Kalcheva, I.D., Chapman, V.M. (1993). Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. **Nucleic Acids Res.** 21: 3911-2.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U., Cregan, P.B. (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. **Theor. Appl. Genet.** 93: 1282-90.
- Kijas, J.M., Fowler, J.C., Garbett, C.A., Thomas, M.R. (1994). Enrichment of microsatellites from the *Citrus* genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **BioTechniques** 16: 656-62.
- Kochert, G., Halward, T.M., Branch, W.D., Simpson, C.E. (1991). RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theor. Appl Genet** 81: 565-70.
- León, O., Diaz, M., Peteira, B., Cintra, D. (1998). Applications of molecular markers in the characterization of genetic variability of plant germplasm collections. **Rev. Prot. Veg.** 13: 69-74.
- Lübberstedt, T., Dussle, C., Melchinger, A.E. (1998). Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding** 117: 447-50.
- Manifesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Suarez, E.Y., Dubcovsky, J. (2001). Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. **Crop Sci.** 41: 682-90.
- Moretzsohn, M.C., Valls, J.F.M. (2001). Análise da variabilidade genética da coleção brasileira de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), por meio de marcadores microsatélites. Embrapa Recursos Ge-  
néticos e Biotecnologia: **Bol. Pesq. e Desenv.**, 13.
- Paetkau, D. (1999). Microsatellites obtained using strand extension: an enriched protocol. **BioTechniques** 26: 690-7.
- Paik-Ro, O., Smith, R., Knaulf, D. (1992). Restriction fragment length polymorphism evaluation of six peanut species within the *Arachis* section. **Theor. Appl. Genet.** 84: 201-8.
- Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R., Barret, J.A. (1995). Nom amplifying alleles at microsatellite loci – a caution for parentage and population studies. **Mol. Ecol.** 4: 249-52.
- Powell, W., Orozco Castillo, C., Chalmers, K.J., Provan, J., Waugh, R. (1995). Polymerase chain reaction-based assays for the characterization of plant genetic resources. **Electrophoresis** 16: 1726-30.
- Rassmann, K., Schlötterer, C., Tautz, D. (1991) Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis** 12: 113-8.
- Sano, T., Pandori, M.W., Smith, C.L., Cantor, C.R. (1994). In: Advances in biomagnetic separation. Ublén, M., Hornes, E., Olsvick, O. Eaton Publishing Co, Natick, MA, EUA, pp. 209.
- Schlötterer, C., Pemberton, J. (1998). The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DeSalle, R. & Schierwater, B. eds. Molecular Approaches to Ecology and Evolution, Basel, Switzerland, p.71-86.
- Stalker, H.T., Phillips, T.D., Murphy, J.P., Jones, T.M. (1994). Variation of isozyme patterns among *Arachis* species. **Theor. Appl. Genet.** 87: 746-55.
- Tóth, G., Gáspari, Z., Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.** 10: 967-81.
- Valls, J.F.M., Pizarro, E. (1994). Collection of wild *Arachis* germplasm. In: Kerridge, P.C., Hardy, B. Biology and agronomy of forage *Arachis*. Cali, CIAT, chapter 1, p.1-18.
- Walter, B.M.T. Biodiversidade e recursos genéticos: Questões e conceitos. (2000). Embrapa, doc. No. 46, 48pp.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.** 11: 1-16.