

Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp)

Fotos e Ilustrações cedidas pelos autores

Aspectos técnicos e interpretação genética

Ricardo Lopes

Pós-graduando em Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ

Maria Teresa Gomes Lopes

Pós-graduanda em Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ

Dr. Antonio Vargas de Oliveira

Figueira
USP/CENA

Dr. Luis Eduardo Aranba Camargo

USP/ESALQ

Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

UEL

Dra. Monalisa Sampaio Carneiro

UFG

Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira

USP/ESALQ
mlcvieir@esalq.usp.br

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um 'marcador genético'. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética. Também, as marcas de DNA podem ser usadas para 'DNA fingerprinting' isto é, visando à identificação de acessos de plantas ou de isolados de um microrganismo, ou para completar estudos de sistemática.

Há várias técnicas disponíveis, cada uma utilizando uma estratégia particular para detectar polimorfismos de DNA. Em estudos com vírus, Grodzicker et al. (1974) usaram pela primeira vez os polimorfismos de comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição.

Anos mais tarde, esta técnica, denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), foi amplamente aplicada a genomas de diversos organismos. Ressalte-se que quando se trabalha com genomas eucarióticos há necessidade do uso de sondas uma vez que o número de fragmentos é muito elevado. Portanto, apenas os locos identificados por uma molécula complementar ao DNA genômico i.é., por uma sonda, são revelados a cada hibridização. Um loco de RFLP é definido pela combinação **enzima de restrição/sonda**, e o marcador é **codominante** uma vez que os cromossomos homólogos podem revelar fragmentos de um mesmo tamanho (genótipo homocigótico) ou não (genótipo heterocigótico) devido a variações nos sítios de restrição.

A disponibilidade de mais de uma centena de enzimas de restrição (banco de dados: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) permite que um número elevado de locos de RFLP possa ser detectado, alcançando uma ampla cobertura do genoma. Entretanto, a disponibilidade de sondas é limitada, pois o seu desenvolvimento é laborioso, exigindo pessoal habilitado para a manipulação do DNA recombinante. Mesmo quando as sondas estão disponíveis, como no caso das culturas agrícolas de maior expressão, a técnica não permite a análise de grande número de amostras em curto prazo, não se prestando à automação. Além disso, no caso de se usar marcação radioativa das sondas, são necessárias instalação adequada e licença para uso de radioisótopos, bem como treinamento para o manuseio da radioatividade. As análises com RFLPs têm um custo relativamente elevado e isto também tem limitado a sua aplicação.

Com o desenvolvimento da técnica

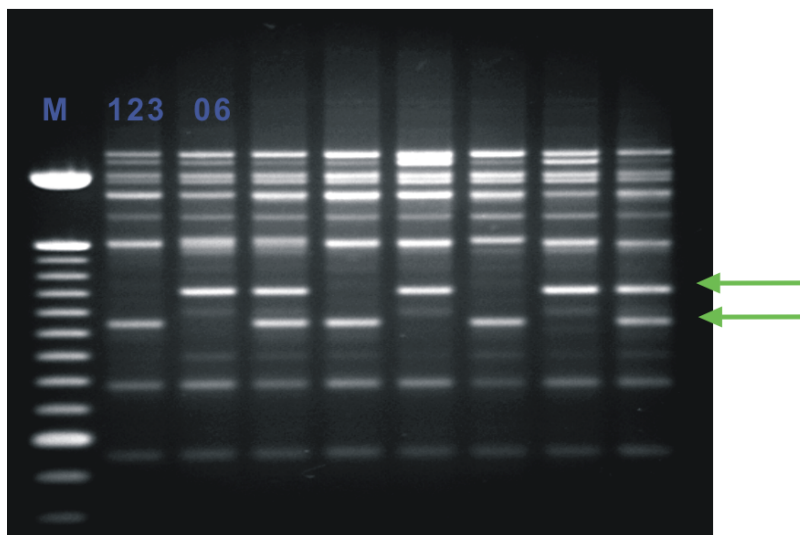


Figura 1. Gel de RAPD mostrando os perfis dos genitores (IAPAR 123 e 06) e de uma amostra de 6 indivíduos da população filial de maracujá amarelo. As setas indicam locos polimórficos. M= marcador de peso molecular

de reação em cadeia da polimerase - PCR (Mullis & Faloona, 1987) surgiram novos marcadores moleculares. Dentre estes, destacam-se os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Williams et al., 1990) e os AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Vos et al., 1995), que são métodos sensíveis, rápidos, relativamente simples e que revelam vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de seqüências-alvo, como no caso dos marcadores microssatélites, que também são derivados da PCR. Essas técnicas não requerem sistema especial para a revelação do polimorfismo, tal como a hibridização por sondas.

Uma característica das marcas RAPD e AFLP, diferente dos marcadores isoenzimáticos, RFLPs e microssatélites (quando revelados por PCR), é sua **dominância**. Alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel (Figura 1). No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

Em plantas, uma pequena proporção (<5%) de locos RAPD e AFLP pode apresentar codominância (ambos alelos do loco são amplificados) que é observada quando ocorrem pequenas inserções ou deleções entre os sítios de anelamento dos *primers* de RAPD ou entre os sítios de restrição, no caso de marcadores AFLP. A identificação de locos codominantes requer análises de populações segregantes de cruzamentos controlados, e testes de aderência às proporções esperadas de acordo com a configuração do cruzamento.

RAPD

O polimorfismo dos marcadores

RAPD é revelado pela amplificação de locos cromossômicos usando-se iniciadores (*primers*) compostos de seqüências curtas de oligonucleotídeos. Na reação de amplificação, estes *primers* quando submetidos a condições apropriadas de temperatura (37 a 42° C) se hibridizam com seqüências genômicas que lhes são complementares. Para que ocorra amplificação, há necessidade que existam no genoma dois sítios complementares ao *primer*, localizados em direções opostas e distantes entre si, no máximo, 3.000 pb. Como a seqüência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua seqüência e, por isso, revelar vários locos. Os fragmentos amplificados, por sua vez, são separados em um gel de poliacrilaminada ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (EtBr) sob luz UV.

O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização dos dois *primers*. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação.

Em diferentes espécies, dados experimentais evidenciam que locos RAPD estão dispersos no genoma. As seqüências internas dos segmentos amplificados abrangem desde cópia única até altamente repetitivas (Williams et al., 1993).

A baixa reprodutibilidade dos marcadores RAPD é uma questão bastante discutida. Na verdade, a técnica requer certa experiência com procedimentos moleculares, cuidado com o preparo das reações, e rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel. A quantidade e qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio e da enzima *Taq polimerase* são alguns dos aspectos que devem ser considerados nos ensaios de RAPD. Deve-se dar preferência a protocolos de extração de DNA que sejam simples e rápidos, como os que usam tampão CTAB ou SDS. Porém, é importante que o DNA não esteja contaminado pela presença de proteínas, polissacarídeos e compostos fenólicos, pois estas substâncias podem diminuir ou até inibir a atividade da *Taq polimerase*.

A quantificação do DNA genômico pode ser feita por comparação da

intensidade de fluorescência de amostras de concentração conhecida de DNA (ex., do fago λ) visualizada em gel de agarose corado com EtBr. Outra alternativa é a espectrofotometria ou fluorimetria. Embora a leitura nestes aparelhos seja mais rápida e prática, moléculas degradadas de DNA também são quantificadas por espectrofotometria. Portanto, a quantificação baseada em gel é mais recomendável. Atualmente, há fluorímetros (GENE-QUANT, Pharmacia) que realizam leituras de ótima qualidade, não incorporando nucleotídeos livres e moléculas de fita simples à leitura.

Em geral, DNA em excesso na reação de PCR resulta na falha completa da reação, ou em perfis eletroforéticos com arraste. Por outro lado, a baixa concentração leva a padrões de amplificação com baixa ou nenhuma reprodutibilidade. Em organismos eucarióticos, as concentrações usuais variam de 5 a 30 ng de DNA por reação. Contudo, 1 ng de DNA tem sido utilizado para insetos de pequeno porte com bons resultados no que diz respeito à reprodutibilidade.

A quantidade de íons magnésio influencia diretamente na reprodutibilidade dos experimentos de RAPD, pois interfere na ação da *Taq polimerase*, e conseqüentemente, na intensidade das bandas visualizadas no gel. Geralmente, a concentração final de $MgCl_2$ varia entre 1,5 a 4,0 mM. A quantidade ótima de *Taq polimerase* é de 1 a 2 unidades por reação de volume final de 10 até 30 μ l. Concentrações acima de 2U podem resultar em amplificação não-específica.

Os *primers* usados nos experimentos de RAPD são compostos de 10 bases de seqüências arbitrárias com no mínimo de 50% de conteúdo GC. Podem ser sintetizados no próprio laboratório ou, mais comumente, adquiridos comercialmente (QIAGEN Operon <http://www.operon.com>; University of British Columbia <http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/>).

O número esperado de produtos amplificados usando um iniciador arbitrário (10 pb) é função do comprimento do genoma e do número máximo de bases passível de ser amplificado pela DNA polimerase em uso. Supondo que haja distribuição ao acaso de bases no genoma e que a seqüência do iniciador tenha sido arbitrariamente concebida, o número esperado de produ-

tos amplificados será:

$$b = 2fN/16^n$$

sendo, **f** = comprimento máximo do fragmento amplificado em pb, **N** = tamanho do genoma em pb e **n** = número de nucleotídeos. Dependendo do tipo de enzima i.é da Taq DNA polimerase, **f** pode variar.

Para maximizar o número de locos polimórficos amplificados por primer, recomenda-se testar, inicialmente, um grande número de iniciadores e uma pequena amostra do conjunto total de indivíduos. Os oligonucleotídeos mais informativos são então selecionados visando proceder às análises do material genético (indivíduos, populações, acessos, isolados), reduzindo-se o tempo e custo destas análises (Figura 1).

AFLP

A técnica é baseada na amplificação, via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos, de corte raro (*reconhecem sítios de 6-8 bases, ex. ApaI, EcoRI, HindIII e PstI*) e de corte freqüente (*reconhecem sítios de 4 bases, ex. MseI e TaqI*). É fundamental que a digestão do DNA seja completa, pois a digestão parcial pode revelar falsos polimorfismos. Para obtenção da digestão total é necessário usar DNA de alta pureza. Portanto, é preciso prestar atenção no método de extração e quantificação usado.

A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de seqüência conhecida. Assim, é possível construir seqüências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas “adaptadores”. Uma vez que a seqüência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir iniciadores específicos a essas seqüências para **pré-amplificação** dos fragmentos de restrição. Os *primers* são constituídos por uma seqüência complementar ao adaptador seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima, e uma extensão de nucleotídeos seletivos no terminal 3’ (Figura 2). Na Tabela 1 são apresentados os sítios de restrição de algumas enzimas bem como a seqüência de adaptadores e iniciadores específicos para essas

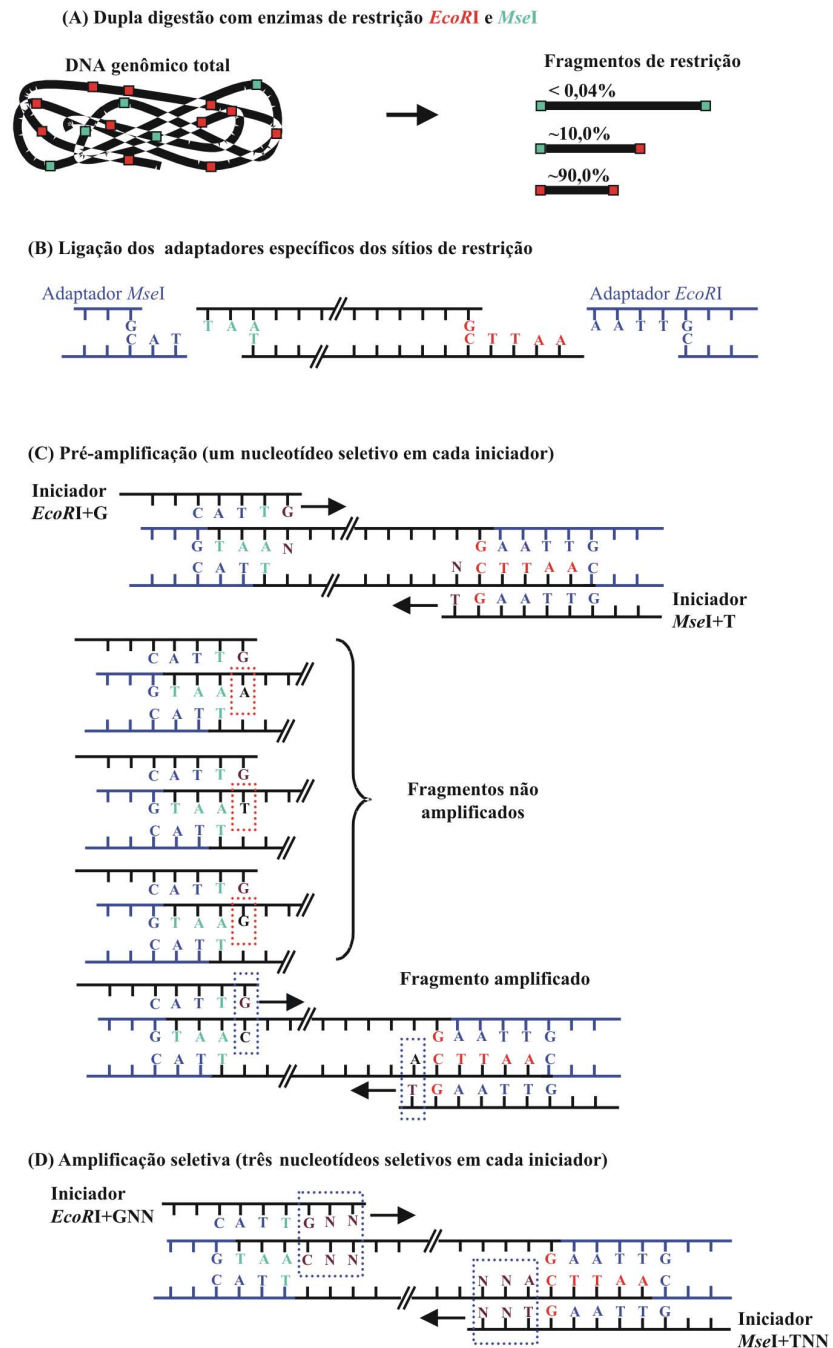


Figura 2. Procedimentos para análise de marcadores AFLP. **A.** Digestão do DNA genômico usando as enzimas *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte freqüente). **B.** Ligaçao dos adaptadores às extremidades coesivas dos fragmentos gerados pela digestão. **C.** Pré-amplificação usando G como nucleotídeo seletivo no iniciador *EcoRI* e T no *MseI*. **D.** Amplificação seletiva usando 3 nucleotídeos seletivos em ambos os iniciadores

enzimas.

Na fase de digestão, as duas enzimas (corte raro/corte freqüente) podem ser usadas simultaneamente (digestão dupla) ou em duas etapas, caso não exista tampão de reação comum às duas enzimas. Como resultado da

clivagem do DNA genômico com a combinação de enzimas de corte raro/freqüente, 3 classes de fragmentos são geradas: fragmentos de corte freqüente/freqüente, fragmentos de corte raro/freqüente e fragmentos de corte raro/raro. A partir da digestão do DNA

genômico com as enzimas *EcoRI* e *MseI* é esperado que a maioria dos fragmentos sejam de corte *MseI/MseI* (frequente/frequente). Fragmentos de corte *EcoRI/MseI* (raro/frequente) ocorrem aproximadamente em frequência igual a duas vezes o número de sítios de restrição da enzima *EcoRI* e fragmentos de corte *EcoRI/EcoRI* (raro/raro) ocorrem em baixa proporção (veja Ferreira & Grattapaglia, 1996). Por outro lado, os fragmentos de corte *EcoRI/MseI* são **preferencialmente amplificados**, e isto se deve à menor eficiência da hibridização dos iniciadores *MseI* comparada àquela com iniciadores *EcoRI*, e também ao fato de que os fragmentos *MseI/MseI* possuem seqüência terminal invertida por serem amplificados por um único iniciador, favorecendo a formação de uma estrutura em *loop* que compete com o anelamento dos iniciadores (Vos et al., 1995).

Tanto o resultado da digestão como da pré-amplificação podem ser verificados submetendo-se parte do DNA digerido e do pré-amplificado à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Isto evita que problemas de digestão ou de pré-amplificação sejam detectados apenas

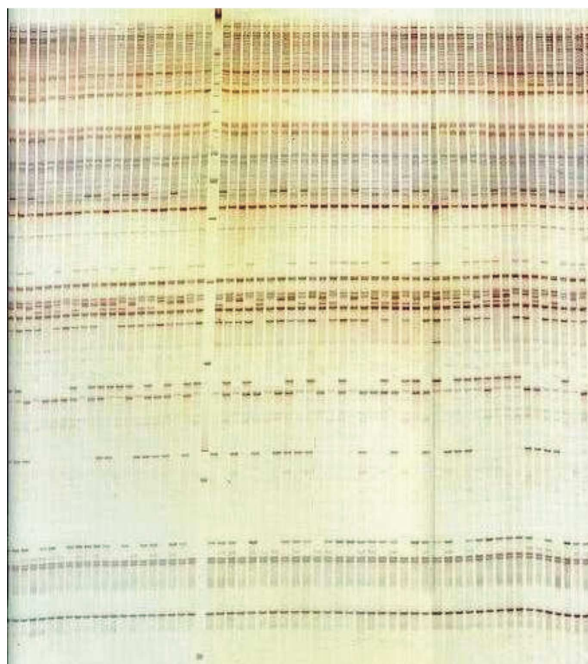


Figura 3. Gel de AFLP em poliacrilamida corado com nitrato de prata mostrando o perfil de uma população de maracujá amarelo gerado pelas enzimas *PstI* e *MseI*, usando em ambos iniciadores 1 nucleotídeo seletivo na pré-amplificação e 3 na amplificação seletiva

no final dos procedimentos.

A combinação das enzimas *EcoRI/MseI* é a mais usada (inclusive, é a única combinação oferecida em kits comerciais). No entanto, nem sempre

esta combinação resulta nos melhores perfis eletroforéticos, bem como no maior número de locos polimórficos. Quando ainda não existem informações sobre o uso de marcadores AFLP na espécie em estudo, o ideal é que seja realizado um teste preliminar com diferentes combinações de enzimas e nucleotídeos seletivos usados nos terminais 3' dos iniciadores. De acordo com Janssen et al. (1996), a combinação *EcoRI/MseI* é mais adequada para genomas pobres em G+C, *HindIII/MseI* para genomas com conteúdo de G+C em torno de 40 a 50% e *ApaI/TaqI* para genomas ricos em G+C.

Resultados experimentais demonstraram que para a obtenção de bons padrões de separação dos fragmentos presentes em espécies com genoma complexo, pelo menos 3 nucleotídeos seletivos devem ser usados em ambos os iniciadores (*EcoRI/MseI*) e que a amplificação seletiva deve ser realizada em duas etapas. Na primeira etapa de amplificação, denominada **pré-amplificação**, 1 nucleotídeo seletivo é usado no terminal 3' dos iniciadores. Na segunda fase, denominada de **amplificação seletiva**, são usados 3 nucleotídeos seletivos nos terminais 3' dos iniciadores (Figura 2). Dessa maneira, apenas

Tabela 1. Sítios de restrição, seqüências de adaptadores e de iniciadores usados para 6 enzimas em análises de AFLP

Enzima	Sítio de restrição		
<i>EcoRI</i>	5'...G↓AATTC...3' 3'...C T T A A↑G...5'	adaptador	5'-C T C G T A G A C T G C G T A C C-3' 3'-C A T C T G A C G C A T G G T T A A-5'
		iniciador	5'-G A C T G C G T A C C A A T T C E-3'
<i>MseI</i>	5'...T↓TAA...3' 3'...AAT↑T...5'	adaptador	5'-G A C G A T G A G T C C T G A G-3' 3'-T A C T C A G G A C T C A T-5'
		iniciador	5'-G A T G A G T C C T G A G T A A E-3'
<i>PstI</i>	5'...C T G C A↓G...3' 3'...G↑A C G T C...5'	adaptador	5'-C T C G T A G A C T G C G T A C A T G C A-3' 3'-C A T C T G A C G C A T G T-5'
		iniciador	5'-G A C T G C G T A C A T G C A G E-3'
<i>HindIII</i>	5'...A↓A G C T T...3' 3'...T T C G A↑A...5'	adaptador	5'-C T C G T A G A C T G C G T A C C-3' 3'-C T G A C G C A T G G T C G A-5'
		iniciador	5'-G A C T G C G T A C C A G C T T E-3'
<i>ApaI</i>	5'...G G G C C↓C...3' 3'...C↑C C G G G...5'	adaptador	5'-T C G T A G A C T G C G T A C A G G C C-3' 3'-C A T C T G A C G C A T G T-5'
		iniciador	5'-G A C T G C G T A C A G G C C C E-3'
<i>TaqI</i>	5'...T↓C G A...3' 3'...A G C↑T...5'	adaptador	5'-G A C G A T G A G T C C T G A C-3' 3'-T A C T C A G G A C T G G C-5'
		iniciador	5'-C G A T G A G T C C T G A C C G A E-3'

E: nucleotídeo arbitrário usado na pré-amplificação

os fragmentos que possuam nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos (utilizados nos terminais 3' dos iniciadores) serão amplificados. Assim, os alelos dos locos de AFLP (presença ou ausência de um determinado fragmento ou banda) são oriundos da perda ou ganho de um sítio de restrição, ou da complementaridade ou não das bases seletivas usadas nos terminais 3' dos iniciadores aonde se inicia a PCR com a região que flanqueia o sítio de restrição.

A amplificação seletiva visa diminuir o número de fragmentos gerados pela digestão, reduzindo artefatos da técnica, principalmente co-migração de fragmentos submetidos à eletroforese. Embora o uso de 1 nucleotídeo seletivo (N) na pré-amplificação e de 3 na amplificação seletiva tenha levado a bons resultados em um grande número de espécies, isto deve ser adequado a cada genoma. Teoricamente, genomas menores possuem menor número de fragmentos, sendo possível uma menor intensidade na amplificação seletiva (Ex.: *EcoRI*+2N/*MseI*+3N). Em genomas maiores, pode ser usada maior intensidade na amplificação seletiva (Ex.: *EcoRI*+3N/*MseI*+4N). A maior parte destes produtos resultantes da amplificação seletiva apresenta um tamanho variando de 50 a 800 nucleotídeos. Cada base seletiva reduz em ¼ (25%) o número de produtos amplificados. Como são 2 sítios de iniciação da PCR, somente 1 em cada 16 (6,25%) fragmentos serão amplificados.

Para separação e identificação dos produtos de amplificação por AFLP, o método mais adequado é a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, o qual proporciona um alto nível de resolução, sendo eficiente para detecção de diferenças em um único nucleotídeo (Figura 3). O número de fragmentos visualizados em géis de poliacrilamida varia de algumas dezenas até mais de uma centena. Teoricamente, quanto maior o genoma, maior será o número de fragmentos. Esses géis são usados para leituras manuais ou automatizadas. A leitura manual é realizada após a revelação do padrão de bandas por coloração com nitrato de prata ou revelação em autoradiografias, neste caso usando iniciadores marcados com radioisótopos. A leitura automatizada requer marcação fluorescente, e é realizada por analisadores de DNA (ALFA-Automated Laser Fluorescence Analysis), que são equipamentos de alto

custo e que requerem *softwares* especiais também de elevado preço.

A revelação de géis em autoradiografias requer a marcação dos iniciadores com radioisótopos: são usados o $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ e o $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. A marcação é feita nos iniciadores dirigidos aos adaptadores das enzimas de corte raro. O uso de radioisótopos requer acomodações apropriadas nos laboratórios, licença do CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), treinamento em proteção radiológica, equipamentos de segurança específicos (escudo de proteção para manuseio, recipientes para armazenamento do material radioativo ou marcado, contador geyger) bem como equipamentos adicionais (cassetes, secador de gel) sendo alguns de uso exclusivo (banho-maria, refrigeradores e micropipetas).

A revelação por métodos de coloração com nitrato de prata torna-se mais atrativa, bastando seguir as normas gerais de segurança de laboratório e indicações dos fornecedores. Além disso, não requer equipamentos sofisticados usados na leitura automatizada. Diversos procedimentos para coloração com nitrato de prata estão disponíveis na literatura, destacando-se o método proposto por Creste et al. (2001) que é prático, eficiente e de baixo custo.

A técnica AFLP detecta um maior número de locos, comparativamente às demais técnicas que revelam marcadores moleculares, possibilita ampla cobertura do genoma e apresenta um baixo custo por informação (loco). A utilização de enzimas de restrição combinada com condições adequadas à hibridização dos *primers* durante as reações de amplificação agrega a robustez da técnica de RFLP com a praticidade da PCR. Marcadores AFLPs reúnem a capacidade exploratória dos polimorfismos dos RFLPs (presença ou ausência de sítios de restrição) com a vantagem da PCR. Devido a essas características, pouco a pouco, os marcadores RAPD vêm sendo substituídos pelos AFLPs.

REFERÊNCIAS

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19, 229-306, 2001.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1996. 220p.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, 39, 439-446, 1974.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprint method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, 142, 1881-1893, 1996.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods of Enzymology**, 55, 335-350, 1987.

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

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

WILLIAMS, J.G.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods of Enzymology**, 218, 704-740, 1993.

TEXTOS RECOMENDADOS

CAMARGO, L.E.A. Marcadores moleculares no melhoramento para resistência a doenças. In: NASS, LL; Valois, AFC; Melo, IS; Valadares-Inglis, MC. (eds.) **Recursos Genéticos e Melhoramento. Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. 2001. p.995-1010.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, MLC. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, LA *et al.* (coord.) **Biotecnologia na Agricultura e Agroindústria**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p.153-200.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, LL; Valois, AFC; Melo, IS; Valadares-Inglis, MC. (eds.) **Recursos Genéticos e Melhoramento. Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. 2001. p.939-965.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P.; SOUZA JR., C.L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **BIOTecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 20, 16-19. 2001.