

# O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas

EDER VICTOR BRAGANTI TOPPA<sup>1\*</sup>; CLÉBER JUNIOR JADOSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eng. Agrônomo, Mestre em Agricultura com ênfase em Melhoramento Genético de Plantas, da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP. E-mail: [edertoppa@hotmail.com](mailto:edertoppa@hotmail.com). \*Autor para correspondência

<sup>2</sup>Eng. Agrônomo, Mestre em Agricultura com ênfase em Ecofisiologia de Plantas, da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP. E-mail: [cjadoski@gmail.com](mailto:cjadoski@gmail.com)

## RESUMO

O surgimento das técnicas de marcadores de DNA com capacidade de detectar variação genética adicional trouxe novos avanços para o melhoramento genético de plantas, sendo utilizadas com êxito em várias culturas. A principal colaboração que as técnicas trouxeram foi a possibilidade de analisar intrinsecamente o genótipo de um indivíduo sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica e, conseqüentemente, excluindo-se a influência do ambiente. O uso de descritores baseados no genótipo do indivíduo tem recebido atenção especial para a caracterização de cultivares, decorrente do seu potencial de distinção de genótipos morfologicamente similares e geneticamente aparentados. Já a utilização da tecnologia de marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético de plantas – em suma, no processo seletivo através da procura de alelos desejáveis indiretamente por meio do uso de marcadores ligados – é conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Nessa perspectiva, serão abordadas as diferentes vertentes de atuação dos marcadores moleculares como ferramenta de apoio ao melhoramento genético de plantas.

**Palavras-chave:** Mapas genéticos, seleção assistida por marcadores moleculares, RFLP e PCR.

## ABSTRACT

### The use of molecular markers in plant breeding

The advent of DNA marker techniques capable of detecting additional genetic variation brought new advances for plant breeding, being successfully used in various crops. The main contribution of these techniques was the possibility of analyzing the genotype of an individual intrinsically without the occurrence of phenotypic expression and thus excluding the influence of the environment. The use of descriptors based on the individual's genotype has received special attention concerning the characterization of cultivars, due to their potential to distinguish morphologically similar and genetically related genotypes. The use of technology of molecular markers in plant breeding – in short, in the selection process by searching for desirable alleles indirectly through the use of linked markers – is known as marker-assisted selection (MAS). In this perspective, this paper will discuss the various aspects of performance of molecular markers as a tool to support plant breeding.

**Keywords:** Genetic maps, marker-assisted selection, RFLP and PCR.

## INTRODUÇÃO

Nos mais diversos programas de melhoramento genético de plantas, o processo de seleção dos genótipos que apresentam características agronomicamente desejáveis é realizado com base nas informações fenotípicas dos indivíduos. Este procedimento muitas vezes apresenta-se dificultoso, sobretudo para os caracteres de baixa herdabilidade, haja visto que, como a grande maioria dos caracteres de importância agrônômica são de natureza quantitativa,

ou seja, controlados por um grande número de genes, esses são altamente influenciados pelas interações ambientais na expressão do fenótipo.

A seleção fenotípica é realizada há muito tempo, desde quando o homem deixou o nomadismo, e com o advento das revoluções verdes e a necessidade de uma demanda crescente por alimentos, o melhoramento embasado neste princípio passou a contribuir substancialmente para a seleção de novas cultivares e híbridos mais adaptados aos fatores bióticos e abióticos. Não obstante a isso, nas avaliações fenotípicas, principalmente para caracteres de baixa herdabilidade, é necessária a utilização de técnicas elaboradas de experimentação, para que se possa obter uma aproximação entre o fenótipo e o genótipo dos indivíduos.

Com o surgimento dos descritores baseados em proteínas e enzimas, na década de 1970, o uso desses representou um avanço para o melhoramento genético de plantas, pois possibilitou a obtenção de estimativas de distâncias genéticas entre genótipos, e assim, o acesso à variabilidade existente. No entanto foi com o apogeu dos marcadores moleculares, dez anos após os primeiros trabalhos com marcadores de proteínas e enzimas, que se identifica a possibilidade da utilização desses como ferramenta para auxiliar os melhoristas na seleção dos genótipos superiores, uma vez que por apresentar características como herança mendeliana e níveis de herdabilidade igual a um, é possível acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este. Outro fato que faz dos marcadores moleculares uma classe de descritores de crescente importância para o melhoramento genético de plantas é que, permitem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo, assim mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes podem ser identificadas com análise de DNA.

Neste sentido serão abordadas as diferentes vertentes de atuação dos marcadores moleculares como ferramenta de apoio ao melhoramento genético de plantas.

### **Marcadores genéticos**

Marcadores genéticos, ou descritores genéticos, são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997). Os marcadores genéticos utilizados em plantas podem ser morfológicos, citológicos, bioquímicos ou moleculares.

Os primeiros marcadores utilizados, que contribuíram com a genética e o melhoramento genético de plantas, foram os marcadores morfológicos, de acordo com Sax (1923), citado por Borém (1997) e Ferreira & Grattapaglia (1998). Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, características fenotípicas de fácil visualização, como nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala ou morfologia foliar (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Embora essa classe de marcadores seja de fácil monitoramento, existe em número muito limitado em uma mesma espécie sendo insuficiente para o mapeamento genético; sua descrição depende do desenvolvimento da planta e sua expressão gênica pode ser influenciada por ação gênica de dominância, pela pleiotropia e epistasia, além dos fatores ambientais. Em culturas de base genética estreita, como os genótipos elites, eles podem muitas vezes não distinguir adequadamente cultivares comerciais (SMITH & SMITH, 1992; PECCHIONI et al., 1996).

Os marcadores bioquímicos baseados em proteínas e enzimas, surgidos na década de 1970, foram os primeiros a serem utilizados com várias aplicações, dentre os quais no estudo de dispersão de espécies, na análise de filogenias, na acessibilidade à variabilidade genética existente, na detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, na identificação de cultivares, na introgressão gênica, na avaliação de germoplasma, e de forma mais limitada, na seleção indireta de caracteres agrônômicos (BORÉM, 1997). Entretanto, de acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), apesar de os marcadores isoenzimáticos serem co-dominantes, isto é, genótipos heterozigotos e homozigotos de determinado locus são facilmente identificados, permitindo estimar parâmetros como frequências genotípicas e alélicas e, a partir destes,

coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade, além de possuírem baixos custos e de fácil execução, há a desvantagem de proporcionar pequena cobertura do genoma. Outras limitações das isoenzimas na atuação como marcadores são as modificações pós-tradução das enzimas, produzindo as “isoenzimas conformacionais”, o polimorfismo enzimático em resposta a condições ambientais e diferenças na atividade isoenzimática associadas a estádios diferentes de desenvolvimento (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1988; BORÉM, 1997).

O surgimento das técnicas de marcadores de DNA, com capacidade de detectar variação genética adicional, trouxe novos avanços para o melhoramento genético de plantas, sendo utilizado com êxito em várias culturas. A principal colaboração que as técnicas trouxeram foi a possibilidade de analisar intrinsecamente o genótipo de um indivíduo, sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica, e conseqüentemente excluindo-se a influência do ambiente sobre este. Também, enquanto os descritores de proteína amostram apenas as regiões ativas na expressão gênica, os de DNA permitem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo. Mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes podem ser identificadas com análise de DNA, mas não com a análise morfológica ou de proteínas. O fato de haver um número quase ilimitado de descritores de DNA disponíveis e esses possibilitarem o amplo acesso da variabilidade genética em diversas espécies vegetais, faz dessa uma classe de descritores de relativa importância para caracterização de cultivares. Entre as várias aplicações dos marcadores de DNA, estão os estudos de divergência genética em populações, a confecção de mapas genéticos de ligação (PEREIRA & LEE, 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1988) e o mapeamento de QTL's (locos de características quantitativas) (LEE, 1995; PEREIRA & LEE, 1995), além de ser uma ferramenta importante em trabalhos de seleção assistida por marcadores.

Os marcadores moleculares, são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que determinam características de interesse. Podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre seqüências complementares de DNA, como no caso do “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) ou pela técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR).

Entre os marcadores moleculares que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, os Minissatélites ou VNTR (Variable Number Tandem Repeats), o RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”), ou polimorfismo de DNA amplificados ao acaso, o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, e os Microssatélites (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

### **Marcadores moleculares na caracterização de cultivares**

O escopo da Lei de Proteção de Cultivares de no 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997, especifica que descritor é “a característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação do cultivar”.

A referida Lei faz menção aos requisitos necessários para que um cultivar possa ser protegido, elucidando que o material deve ser comprovadamente distinto, homogêneo e estável. Por distinto, a Lei define “o cultivar que se distingue claramente de qualquer outro cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida”. Neste sentido, o uso de descritores confiáveis e de natureza genética é indispensável para que seja comprovada a propriedade de distinção exigida por Lei.

O uso de descritores baseados no genótipo do indivíduo, têm recebido atenção especial, decorrente do seu potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados.

Diversos trabalhos na literatura revelam que o uso dos marcadores moleculares está substituindo ou complementando a caracterização morfológica e agrônômica tradicional. Estudos de Goulão & Oliveira (2001), descrevem que a utilização de marcadores de DNA, particularmente para espécies frutíferas que em geral apresentam período juvenil longo, o tempo

requisitado para a caracterização de novos cultivares e/ou híbridos pode ser consideravelmente reduzido. O mesmo autor afirma que os marcadores SSR e de ISSR são úteis na identificação de cultivares, devido a alta reprodutibilidade, assim apresentando vantagens sobre outros métodos como os baseados em PCR. No mesmo sentido Borba et al. (2005) diz que a técnica de seqüências simples repetitivas internas (ISSR) pode ser empregada para diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e também por conter um baixo custo.

Mesmo assim, o uso demarcadores moleculares para registro de novas cultivares ainda é limitado, mesmo em países onde a proteção de cultivares já é praticada a bastante tempo, uma vez que há questões relevantes a respeito da implantação rotineira de marcadores moleculares para caracterização dos materiais, como por exemplo o custo e a possibilidade de utilização de outros descritores em culturas que ainda apresentam uma ampla base genética. (MILACH, 1998).

### **Seleção assistida por marcadores moleculares**

O emprego da utilização da tecnologia de marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético de plantas, em suma no processo seletivo através da procura de alelos desejáveis indiretamente por meio do uso de marcadores ligados, é conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).

As vantagens que são observadas da SAM em relação apenas a seleção fenotípica, é que exemplificadamente, para a realização de piramidação de genes, onde se busca concentrar em um único genótipo diferentes características de interesse (principalmente para resistência a diferentes raças de um mesmo patógeno, ou para resistência a diferentes patógenos), pode-se reduzir o tempo necessário para obtenção desse genótipo.

Outro aspecto, reconhecidamente importante para o emprego da SAM, é para aqueles caracteres em que a avaliação fenotípica apresenta elevado custo, ou exige ambientes específicos (estresse salino, déficit hídrico etc.), ou quando as avaliações são subjetivas (organolépticas, por exemplo), ou ainda, quando o caráter de interesse só se manifesta em fases avançadas do desenvolvimento da planta, a SAM pode ser realizada nos estágios iniciais, reduzindo significativamente o tempo necessário para um ciclo de seleção.

Em retrocruzamentos, a SAM pode ser aplicada com a finalidade de reduzir a transferência de alelos indesejáveis do genitor doador, durante os ciclos subseqüentes, monitorando e mantendo apenas os de interesse, juntamente com os do genitor recorrente, reduzindo o número de ciclos de retrocruzamento.

Para os programas de melhoramento genético de plantas, uma outra estratégia de seleção que pode ser utilizada, principalmente para aqueles caracteres mais complexos, é a seleção combinada, que considera informações do genótipo e do fenótipo para o mapeamento de locos controladores de caracteres quantitativos – QTL's (*Quantitative trait loci*). No entanto, existem alguns fatores que dificultam a aplicação da SAM neste processo, afetando a precisão no mapeamento do QTL, como o fato de existirem GAP's nos mapas genéticos, além de os modelos disponíveis para o mapeamento de QTL's considerarem a presença de apenas um QTL por loco, e ainda a existência de efeitos epistáticos entre os locos, e a ocorrência de interação QTL's e ambiente.

### **Considerações finais**

O elevado nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores moleculares, possibilitam a discriminação entre linhagens ou cultivares com base genética estreita, o que é comum entre materiais comerciais, e com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares espera-se que esta técnica seja comumente empregada na determinação do *fingerprint* genético assegurando os direitos da propriedade intelectual.

A seleção indireta para caracteres de baixa herdabilidade poderá ser intensamente explorada desde que os genes de interesse estejam fortemente ligados a marcadores moleculares. A SAM fica caracterizada como uma ferramenta poderosa a ser incorporada nos programas de melhoramento genético de plantas, no entanto é passível ainda de aprimoramentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa : UFV, 1997. 547p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M.; TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Genetics & Breeding**, v.50, p.203-219, p. 1996

SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, v.47, p.85-140, 1992.

PEREIRA, M.G.; LEE, M. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.380-388, 1995.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, p.81-89, 2001.

BORBA, R.S.; GARCIA, M.S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A.C.; ZIMMER, P.D.; BRANCO, J.S.C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p.565-569, 2005.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Editora UFRGS. 1998. 141 p.