

Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL)

Márcio Elias Ferreira
Paulo Hideo Nakano Rangel

Introdução

A vulnerabilidade genética, observada em longas extensões de plantios comerciais com uma mesma variedade, clone ou linhagens aparentadas, típicos da produção em escala da agricultura moderna, levou a lamentáveis episódios de perdas, na agricultura, de grande impacto social e econômico. Ainda no século XIX, os danos decorrentes de uma epidemia de *Phytophthora* em plantios clonais de batata, na Irlanda, causaram fome e induziram uma onda migratória de cidadãos irlandeses para os Estados Unidos e outros países europeus que marcou a sociedade da época. O uso intensivo de linhagens T de macho-esterilidade citoplasmática em híbridos de milho levou a perdas significativas na produção dessa cultura nos EUA, causadas por uma devastadora epidemia fúngica há pouco mais de três décadas (Levings, 1993), com graves reflexos econômicos.

Como consequência de episódios dessa natureza, há muito se discute a diversificação do uso de variedades melhoradas na agricultura. A vulnerabilidade genética pode ser contornada, por exemplo, com o enriquecimento da variabilidade genética das coleções de trabalho dos programas de melhoramento que servem de base para as atividades de recombinação e seleção desses programas (Frankel & Brown, 1984). O enriquecimento corrigiria, concomitantemente, as limitações de ganho genético impostas pela estreita base genética que restringe a obtenção de

recombinações gênicas interessantes devido ao limitado acervo de alelos que compõe a coleção de trabalho. No entanto, ainda hoje se constata a grande necessidade de avanços significativos nessa área, visto que os programas de melhoramento modernos ainda se concentram, por várias razões, em germoplasma caracterizado por reduzida diversidade genética.

Neste capítulo, discute-se a necessidade de expansão da base genética dos programas de melhoramento por meio da introgressão de genes de interesse econômico. Ênfase foi dada à discussão do método de melhoramento baseado na análise de retrocruzamento avançado de QTLs (*AB-QTL analysis*) que permite a introgressão de genes de interesse econômico de germoplasma silvestre para linhagens-elite, geralmente, pouco utilizado em programas de melhoramento.

Base genética de programas de melhoramento genético

No início do século XX, Nikolai Vavilov chamou a atenção de pesquisadores do mundo inteiro para a necessidade de conhecer, coletar e conservar recursos genéticos vegetais para uso no presente e, também, no futuro pela humanidade. Os conceitos fundamentais de centros de origem e de diversidade de espécies vegetais por ele desenvolvidos influenciaram um processo de organização de esforços nacionais em diversos países para estabelecer coleções de germoplasma das principais espécies de importância econômica. A partir do episódio da epidemia em citoplasma T de milho nos EUA, devido à grande pressão política e econômica então suscitada, observou-se maior intensidade nos esforços de coleta de germoplasma em todo o mundo e a criação de institutos nacionais e internacionais pró-ativos no suporte a iniciativas de coleta, conservação, caracterização e uso de recursos genéticos. Uma das instituições resultante dessas percepções e com missão internacional de estimular as atividades de conservação de recursos genéticos vegetais em todo o mundo foi o *International Plant Genetics Resources Institute* (IPGRI). No Brasil, a Embrapa, pela atuação de suas unidades de pesquisa, vem desde 1973 desempenhando, também, importante papel nesse segmento.

Equipes de coleta, compostas de pesquisadores de diferentes especialidades, têm sido organizadas para amostrar a diversidade genética das populações naturais das espécies cultivadas e dos seus parentes silvestres, bem como de variedades tradicionais, clones e linhagens comerciais, de acordo com o modo de propagação da espécie de interesse. O resultado desse esforço culminou na obtenção de grandes quantidades de acessos depositados em bancos de germoplasma mantidos em diversas partes do mundo. Para algumas espécies, como trigo e arroz, a quantidade de acessos conservada em bancos de germoplasma é significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativa do número de acessos depositado em bancos de germoplasma de espécies cultivadas em diversas partes do mundo.

Espécie	Acessos	% de espécies silvestres
trigo	410.000	60
arroz	215.000	10
milho	100.000	15
soja	100.000	30
batata	42.000	40
tomate	32.000	70
algodão	30.000	20

Adaptado de Tanksley & McCouch (1997).

Outras espécies, no entanto, ainda estão na fase inicial de esforços de coleta e conservação de germoplasma. Espécies autóctones de importância econômica, no Brasil, vêm recebendo atenção especial pelo potencial agrônomo e comercial que despertam. Pesquisadores e entusiastas visionários não medem esforços para conservar e estudar espécies que devem ser utilizadas em maior escala pelas gerações futuras. Essas iniciativas devem ser apoiadas para fomentar o avanço do conhecimento e o desenvolvimento de variedades superiores para uso mais intensivo pela sociedade.

A domesticação das espécies vem sendo desenvolvida, nos últimos séculos, com a finalidade de selecionar indivíduos nas populações naturais

com características mais homogêneas no que tange, por exemplo, à arquitetura da planta (menor altura e maior rigidez do colmo para dificultar acamamento) ou proteção dos grãos (eliminação de mecanismos de dispersão de sementes, importante para a propagação da espécie em condições naturais, no entanto, inadequado para condições agrícolas). O melhoramento genético de plantas utiliza a seleção para fixar características importantes para a produção agrícola, mas isso, por sua vez, reduz a diversidade. No limite, a ausência de diversidade genética simplesmente não permite que a seleção artificial possa ser desenvolvida. A existência de variantes alélicas na coleção de trabalho é fundamental para ganho genético contínuo. O processo de seleção opera com a finalidade de limitar a diversidade genética, capitalizando os esforços no desenvolvimento de material superior, homogêneo, de acordo os objetivos do programa, todavia, necessita dessa diversidade para que haja continuidade de ganho de seleção.

Os programas de melhoramento genético de plantas, de modo organizado e fundamentado nos princípios mendelianos, foram inaugurados em sua grande maioria somente a partir de meados do século passado. Vários desses programas foram estabelecidos com base em um grupo pequeno de amostras varietais, resultando numa estreita base genética e, por conseguinte, limitada diversidade alélica. A estreita base genética dos programas de melhoramento genético tem levado à diminuição nos percentuais de ganho genético para produtividade em gramíneas e outras espécies (Figura 1).

Taxas de ganho anual de produtividade da ordem 2% a 3% vinham sendo observadas ao longo das décadas de 1960 e 1970 e passaram a apresentar valores preocupantes nestas últimas duas décadas (Figura 1). A perdurar essa tendência, novas estratégias deverão ser desenvolvidas para atingir as metas de produtividade esperadas para atender à demanda prevista de grãos para consumo pela população humana nos próximos anos. Com o rápido crescimento populacional, é urgente o incremento dos atuais níveis de produtividade do arroz para satisfazer as necessidades de cerca de 8,9 bilhões de pessoas no planeta estimados para 2010 (Tanksley & McCouch, 1997). Os incrementos observados não são suficientes no momento.

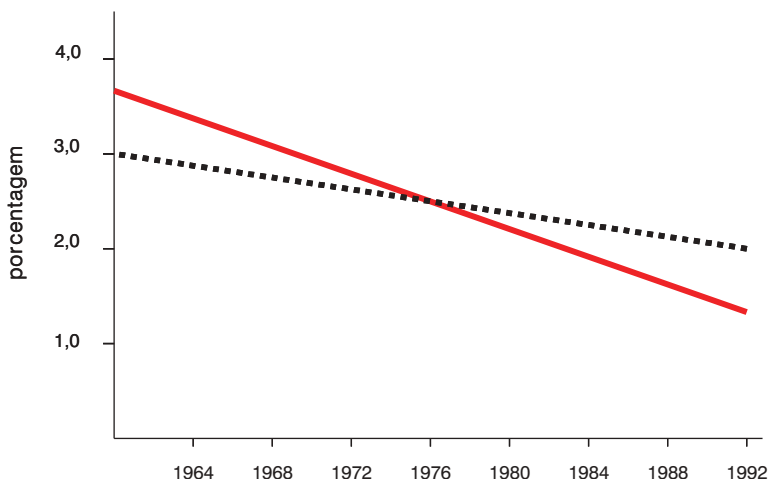


Figura 1. Taxa de decréscimo de ganho de produção em gramíneas (linha contínua) e na agricultura em geral (linha pontilhada).

A limitação da variabilidade genética nas populações submetidas à seleção compromete a extensão do ganho genético. Dados dos programas de melhoramento de arroz irrigado, conduzidos no Brasil, indicam, por exemplo, que os ganhos genéticos para produtividade de grãos recentemente documentados têm sido inferiores a 1% ao ano (Soares et al., 1994; Breseghello et al., 1999; Santos et al., 1999; Rangel et al., 2000). Análise recente indica que apenas dez ancestrais contribuem com 68% do conjunto gênico das variedades brasileiras de arroz irrigado (Rangel et al., 1996). Na América Latina, o número de variedades de arroz, utilizado como base para programas de melhoramento, limita-se a doze acessos (Cuevas-Perez et al., 1992). Considerando as cultivares mais plantadas nos principais estados produtores de arroz irrigado no Brasil, observa-se que apenas sete ancestrais são mais frequentes nos *pedigrees* e são responsáveis por 70% dos genes (Rangel et al., 1996; Breseghello et al., 1999). Tal situação de alta uniformidade genética pode trazer sérias conseqüências à produção brasileira de arroz. Uma delas é a já mencionada vulnerabilidade, especialmente, para patógenos de grande importância para a cultura, como *Magnaporthe grisea* que causa a brusone do arroz. Outra é a possibilidade de que o desenvolvimento de novas variedades não acompanhe as expectativas de produtividade necessárias para

atender ao consumo brasileiro. Dados similares têm sido descritos para outras espécies vegetais, como soja e trigo. Nos Estados Unidos, por exemplo, os programas de melhoramento genético de soja têm por base populações derivadas do cruzamento de apenas 12 variedades (Tanksley & McCouch, 1997). Mais drástica, ainda, é a situação de programas de melhoramento genético do trigo-vermelho, derivado do cruzamento de duas variedades oriundas da Polônia e da Rússia.

São várias as razões para estagnação e declínio dos percentuais de ganho de produtividade, mas não há dúvida de que o componente genético devido à limitação de variabilidade nos programas de melhoramento deve ser levado em consideração. Esse incremento de produtividade só será possível se houver melhor aproveitamento da diversidade genética, especialmente, da conservada em bancos de germoplasma. Para isso, o conhecimento genético do germoplasma depositado nos bancos é fundamental, assim como a ampliação da diversidade genética das coleções de trabalho.

Causas da limitação do uso de acessos do banco de germoplasma no melhoramento genético

Independentemente da espécie, constata-se que é incipiente o uso do recurso genético, em especial, de acessos conservados em bancos de germoplasma nas rotinas dos programas. Alguns dos fatores responsáveis são discutidos a seguir:

(a) *Limitações na caracterização de germoplasma* – a constatação de que o processo de caracterização do germoplasma, conservado em bancos genéticos, é limitado não é recente (Frankel & Brown, 1984), e a carência de informações sobre os acessos depositados constitui-se em um dos grandes entraves para emprego desse acervo genético nos programas de melhoramento. O acervo de material de algumas espécies de importância econômica coletado e conservado é bastante extenso (Tabela 1). No entanto, o conhecimento dos acessos conservados no que tange a sua correta classificação botânica, nível de diversidade, características

agronômicas, fenótipos de interesse econômico ou polimorfismo molecular ainda é inicial. Essa carência de dados, naturalmente, desestimula seu emprego nas rotinas dos programas de melhoramento. Na falta de informação, o melhorista continuará a explorar da melhor maneira possível sua coleção de trabalho. Esta é, por conseguinte, a primeira razão para o uso limitado e o conseqüente estreitamento da base genética dos programas.

(b) *resistência do emprego de novo material no programa de melhoramento* – a inclusão de novo germoplasma nas coleções de trabalho dos programas de melhoramento encontra grande entrave inicial no próprio sucesso de desenvolvimento de novas variedades melhoradas advindas da recombinação de germoplasma-elite enormemente trabalhado ao longo de várias gerações de seleção. Há, portanto, confiança do melhorista no progresso que pode advir do material com o qual o programa de melhoramento trabalha. Por sua vez, a incorporação de variedades tradicionais ou espécies silvestres traz invariavelmente consigo genes deletérios ou indesejáveis de difícil eliminação no programa. Tais genes, em geral, ligados aos genes de interesse, são incorporados por “arraste” ou *linkage drag* por estarem presentes no bloco haplotípico incorporado do genoma doador e que só poderá ser eliminado do genoma recorrente por recombinação. A extensão do *linkage drag* é variável ao longo do genoma e é heterogênea em volta do loco de interesse. O número de genes, potencialmente deletério, em torno do loco gênico de interesse introgridido, é também bastante variável. Segmentos em torno de 1cM do genoma de tomate em programas de retrocruzamento podem incluir 100 ou mais genes (Young & Tanksley, 1989).

(c) *incorporação de características quantitativas de germoplasma silvestre em linhagem-elite* – as características mais importantes dos programas de melhoramento possuem tipicamente controle genético quantitativo, como produtividade ou tolerância à estresse abiótico. A introgressão simultânea de alelos em vários locos é complexa e trabalhosa.

Caracterização de germoplasma em escala: o papel da análise molecular

A caracterização de germoplasma vegetal refere-se à observação, mensuração e documentação de características da planta que são herdáveis, consistentes e expressas homogeneamente em vários ambientes (Ferreira et al., 2005). A caracterização permite identificar e separar geneticamente os acessos que compõem a coleção de germoplasma, fomentar o catálogo de descritores dos acessos com informações biológicas essenciais para o manejo e gestão da coleção e estimular a utilização desses acessos no melhoramento genético de plantas ou diretamente na agricultura. A caracterização de germoplasma vegetal, portanto, procura descrever e compreender, em última análise, a diversidade genética dos organismos estudados.

No nível mais básico, a diversidade genética refere-se diretamente a diferenças na seqüência linear de nucleotídeos da molécula de DNA entre os indivíduos considerados, incluindo seqüências funcionais (genes) e não-funcionais do genoma, bem como variações ocasionadas por efeitos de posição de genes ou seqüências reguladoras. A caracterização tradicionalmente se baseia em descritores morfológicos que possibilitam a separação dos acessos da coleção. A caracterização agromorfológica vem permitindo grandes avanços no processo de conhecimento e de organização das coleções de germoplasma vegetal. É certo que a organização atual das coleções tem sua base na caracterização agromorfológica. No entanto, essa caracterização tem sido complementada por outros critérios, visto que os descritores agromorfológicos apresentam algumas limitações, como: (a) pouco polimorfismo, isto é, geralmente apresentam limitada variação de morfotipos. (b) algumas características morfológicas podem estar sujeitas a variações ambientais, o que torna complexo o processo de avaliação e comparação entre acessos; (c) algumas características morfológicas podem ter impacto na viabilidade do acesso, dificultando sua manutenção; (d) a caracterização agromorfológica é intensiva em tempo e recursos para sua execução. O grande número de acessos depositado em coleções de germoplasma vegetal tem tornado essa tarefa muito difícil e intimidado sua execução.

Nos últimos anos, métodos moleculares de caracterização de germoplasma tiveram grande desenvolvimento. Entre esses métodos, os que revelam polimorfismo de seqüência de ácido desoxiribonucléico, conhecidos como marcadores moleculares, têm sido de grande importância para a análise de diversidade genética e caracterização de germoplasma. A utilização desses métodos tem sido cada vez mais comum nas rotinas de caracterização de germoplasma vegetal.

Marcadores de regiões hipervariáveis do genoma, conhecidos como microssatélites ou repetições curtas em *tandem* (STR – *short tandem repeats*), foram recentemente desenvolvidos e caracterizados no genoma de várias espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Marcadores microssatélites são analisados por meio da diferenciação da variação de seqüências repetitivas de dois a seis nucleotídeos, lado a lado, em um sítio do DNA. O número de repetições, em geral, varia de algumas unidades a várias dezenas, fazendo com que a variação alélica intraloco possa ser detectada pela separação com base no peso molecular de produtos de PCR (reação de polimerase em cadeia), realizada por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) corados com nitrato de prata (Tautz, 1989; Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989). Mais recentemente, a detecção precisa da variação alélica tem sido feita em seqüenciadores automáticos de DNA. Nesse caso, a marcação com fluorocromo de um dos *primers* que flaqueiam a seqüência microssatélite no loco possibilita que o produto de PCR emita fluorescência quando excitado com o *laser* do equipamento, permitindo sua acurada detecção em pares de base. Os alelos de locos microssatélites são analisados via PCR e, por isso, podem ser detectados a partir de amostras de nanogramas de DNA. Quando a variação de alelos de dois ou mais marcadores microssatélites não se sobrepõem, eles podem ser combinados para execução simultânea de PCR e separação por eletroforese. Com a utilização de diferentes fluorocromos que emitem luz de comprimentos de onda específicos para marcar os alelos de vários locos, mesmo os locos com variação sobreposta de tamanho de alelos podem ser resolvidos simultaneamente. Isso permite que uma amostra possa ter o genótipo determinado simultaneamente em vários locos (multiplex), o que é uma grande vantagem no processo genotipagem em escala.

Microssatélites apresentam as seguintes vantagens para análise genética: (a) são marcadores co-dominantes, possibilitando a determinação dos alelos de um loco e, por conseguinte, a diferenciação de homozigotos e heterozigotos; (b) são altamente polimórficos, isto é, apresentam bom número de alelos por loco, com frequência variável nas populações do organismo estudado, o que permite a diferenciação genética de indivíduos testados; (c) estão distribuídos por todo o genoma, geralmente, de maneira uniforme, possibilitando boa representatividade da porção genômica analisada e, quando selecionados, independência de recombinação entre os locos considerados; (d) uma vez desenvolvidos, permitem uma análise de baixa relação custo-benefício e extremamente acurada (Ferreira, 2001). Essa classe de marcadores moleculares tem sido utilizada extensivamente em análise genética de plantas, animais e microrganismos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O polimorfismo de DNA em plantas, observado por meio de marcadores moleculares microssatélites amplamente distribuídos por todo genoma e altamente polimórficos, vem sendo estudado e empregado na estimativa de parâmetros genéticos e em procedimentos de diagnose. Os dados obtidos são utilizados como suporte para a tomada de decisão na conservação de germoplasma, no mapeamento de locos que controlam características de interesse e em seleção assistida. Marcadores microssatélites têm sido empregados na construção de mapas de ligação, na identificação de plantas e seus produtos, em testes de paternidade e de maternidade, em testes de identidade genética, na análise de variabilidade genética de populações, em estudos filogenéticos, entre outras aplicações (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A recente utilização do seqüenciador automático de DNA na genotipagem de locos hipervariáveis vem revolucionando os estudos de identificação e análise genética em várias espécies. A tecnologia disponível permite a genotipagem em escala de vários indivíduos ao mesmo tempo, seguindo estratégia baseada em marcação de *primer* utilizado na amplificação de alelos em loco STR com fluorocromos que emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda. Seqüenciadores de DNA permitem a

detecção precisa dos alelos, com possível identificação de diferenças alélicas em nível de par de bases. Assim, diferenças de um par de bases entre alelos ou microvariantes, representando frações da seqüência repetitiva, podem ser detectadas com acurácia e, conforme comentado anteriormente, permitem a análise multiloco em sistemas multiplex, quando os alelos de cada loco são amplificados em uma única reação PCR ou, alternativamente, em diferentes reações PCR com análise simultânea. A tecnologia propicia a obtenção de grande quantidade de dados em curto espaço de tempo, permitindo o escalonamento de processos de genotipagem.

A caracterização de germoplasma pode ser revolucionada com o emprego, em escala, de análise de polimorfismo de DNA no processo de genotipagem. Por atuarem como marcadores genéticos, os marcadores moleculares podem ser utilizados em reações multiplex analisadas em seqüenciadores de DNA para, com apenas algumas reações de PCR, cobrir dezenas de locos do genoma, distribuídos ao longo dos cromossomos. Dessa forma, coleções inteiras, incluindo milhares de acessos, poderiam ser genotipadas. Os dados obtidos, genuinamente genéticos, poderiam ser utilizados para estimar as relações de vínculo genético entre acessos da coleção, identificar duplicações, sugerir cruzamentos mais interessantes para maximizar novas combinações gênicas, aprimorar o sistema de gestão dos bancos de germoplasma, contribuir para dirimir dúvidas de classificação de espécies ou definir amostras de acessos para utilização em testes de associação visando ao isolamento gênico. Isso seria, sem dúvida, um grande passo para fomentar a caracterização de acessos de banco de germoplasma e incrementar seu uso em programas de melhoramento.

Introgressão assistida: retrocruzamento avançado de QTLs

A grande maioria das características de interesse econômico é quantitativa, ou seja, é controlada por grande número de genes, cada qual com uma contribuição específica no fenótipo e com significativa interação com o ambiente. Um loco de característica quantitativa (QTL) segue os

mesmos princípios de genética mendeliana. Um QTL pode ser individualizado em um único gene ou representar um conjunto de genes fortemente ligado que pode ser diferenciado por recombinação (Ferreira, 2003). A análise de QTLs representa a mendelização de uma característica quantitativa ao isolar os locos gênicos que a controlam, permitindo sua avaliação individual ou em conjunto (Paterson et al., 1991).

A análise de fragmentos polimórficos de DNA, em plantas, completa pouco mais de 15 anos de experimentação intensiva. A preocupação inicial dos estudiosos da área foi o estabelecimento da tecnologia em diferentes espécies seguida de um grande esforço de desenvolvimento de mapas genéticos baseados em marcadores moleculares. Em seguida, os experimentos foram concentrados no mapeamento de regiões genômicas que controlam características qualitativas. Concomitantemente, observou-se progresso na dissecação do controle genético de várias características complexas, estimando o número de locos envolvidos no seu controle, localizando esses locos nos cromossomos, avaliando a magnitude do efeito de cada loco no controle genético da característica, estudando os efeitos de substituição alélica nos locos envolvidos, medindo as possíveis interações epistáticas entre locos ou, ainda, analisando a expressão dos genes envolvidos em locos distintos em diferentes ambientes (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Não há dúvida, portanto, de que houve grande avanço no conhecimento do controle genético de várias características de interesse econômico em diferentes espécies agrícolas nos últimos anos. É importante reiterar que, em vários casos, a estratégia de mapeamento e dissecação do controle genético levou até mesmo à clonagem do gene de interesse em plantas (Martin et al., 1993; Sasaki et al., 2002).

Por sua vez, o emprego de seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento, especialmente para características quantitativas, tem sido, regra geral, incipiente. Não há dúvida de que, nesse período, houve grande desenvolvimento da teoria de seleção assistida, por meio da análise de diferentes variáveis em simulações estatísticas, mas a

utilização direta de informação de genótipos moleculares visando à seleção de indivíduos superiores para características complexas carece ainda de informação empírica, com os experimentos limitando-se a alguns poucos exemplos.

Uma exceção é a análise de retrocruzamento avançado de QTLs (Tanksley & Nelson, 1996) que integra um método clássico de melhoramento (retrocruzamento) com a análise de polimorfismo de DNA para fins de seleção. Um grande desafio para os programas de melhoramento genético é a tarefa de introgridir genes de interesse econômico de germoplasma silvestre para material-elite. O germoplasma silvestre, conforme comentado, retém grande porção da diversidade genética de uma espécie e esse acervo gênico é muito pouco explorado. Nessa tarefa, o melhorista deve ser capaz de reter os genes positivos para o ideótipo que tem em mente e eliminar aqueles que não são adequados, além de tentar suplantar problemas comuns em cruzamentos interespecíficos, como limitação da fertilidade e conservação de blocos haplotípicos com reduzida recombinação. Como a maior parte das características de interesse econômico tem controle quantitativo, a manipulação adequada dos locos gênicos que controlam essas características é vital para o futuro dos programas de melhoramento genético.

Em geral, os programas de mapeamento de QTLs são desenvolvidos a partir de populações segregantes oriundas do cruzamento entre genitores contrastantes para as características de interesse. Para isso, são utilizadas populações F₂, retrocruzamentos ou linhagens recombinantes puras. Essa estratégia é muito eficiente para análise de características quantitativas em cruzamentos intra-específicos. Cruzamentos amplos entre a espécie domesticada e um parente silvestre, por sua vez, apresentam outros desafios.

Deve ser notado, contudo, que apesar de eficiente no avanço do conhecimento do controle genético da característica de interesse, o mapeamento de QTLs apresenta-se quase sempre dissociado do processo de desenvolvimento varietal. Uma vez obtida a informação sobre QTLs, o pesquisador, em geral, reinicia o processo de cruzamento para potencial

utilização de seleção assistida para a característica. O ideal, naturalmente, seria o emprego da informação na mesma população desenvolvida para mapeamento.

Uma espécie silvestre ao ser diretamente analisada para uma característica de interesse econômico terá desempenho muito inferior às linhagens melhoradas. Por causa disto, é comum a suposição de que o acesso silvestre analisado não possui alelos positivos que incrementem a característica quantitativa estudada. Entretanto, ao contrário, há muito que fenótipos transgressivos, isto é, que suplantam os desempenhos de um ou de ambos os genitores, em populações derivadas de cruzamentos entre linhagens-elite e acessos silvestres, vêm sendo detectados (Wehrhahn & Allard, 1965). Deve ser notado que a avaliação do efeito de alelos para uma característica quantitativa é de difícil realização prática no germoplasma silvestre que o contém. Ao avaliar uma característica quantitativa em uma espécie silvestre, os dados ficam prejudicados pelo fato de características relacionadas ao processo de domesticação (ex., arquitetura da planta, deiscência dos frutos, etc.) estarem ainda operando. Mesmo quando o estudo é realizado diretamente em uma população segregante (ex., população F2 ou famílias F3) as mesmas características relacionadas com o processo de domesticação prejudicam a análise. É necessário que as características de interesse sejam analisadas em etapas avançadas em programa de introgressão já estabilizadas no *background* genético recorrente.

No método de melhoramento denominado retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL) (Tanksley & Nelson, 1996), utiliza-se a mesma população empregada para desenvolver o mapa genético de uma espécie para selecionar alelos positivos, monitorados pela informação de polimorfismo de DNA, os quais foram introgrididos de uma espécie silvestre ou variedade tradicional para uma linhagem-elite do programa de melhoramento. AB-QTL baseia-se em modificações de outro método chamado IBL (*inbred backcross line*) desenvolvido há mais de 40 anos (Wehrhahn & Allard, 1965), mas com a

grande vantagem de incorporar informação de mapa no processo de seleção (Tanksley & Nelson, 1996). No método IBL, uma linhagem-elite é cruzada com uma linhagem doadora de uma característica quantitativa e retrocruzada algumas vezes para a linhagem-elite recorrente, obtendo progênie de retrocruzamento avançado. Em seguida, centenas de linhagens puras, derivadas do retrocruzamento avançado, são obtidas por SSD (*single seed descent*). Na prática, observa-se que o método tem potencial para separar as linhagens puras em classes discretas, principalmente, se a característica for controlada por poucos QTLs, permitindo inferências sobre o número e o efeito de QTLs (Wehrahahn & Allard, 1965). IBL, portanto, é baseado em seleção fenotípica de linhagens puras obtidas ao acaso ou, ainda, do cruzamento entre linhagens selecionadas que apresentam fenótipo superior ao da linhagem recorrente (Wehrahahn & Allard, 1965).

Já a análise AB-QTL baseia-se na informação de mapa e na magnitude do efeito de alelos provenientes da linhagem doadora para selecionar linhagens superiores à linhagem recorrente (Tanksley & Nelson, 1996). A seleção, portanto, é baseada na localização e no efeito de QTLs identificados na geração de mapeamento cujos alelos são provenientes do doador (Figura 2). Os produtos obtidos de um programa AB-QTL são linhagens quase-isogênicas à linhagem recorrente, com a vantagem de se ter identificado e mapeado a região do genoma introgridida do acesso doador.

Retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL) baseia-se em duas ou três gerações de retrocruzamento a partir do cruzamento de uma linhagem-elite com acesso silvestre. No processo, um mapa genético para características quantitativas de interesse é gerado, e as linhagens são avançadas com base em seleção de marcadores associados ao controle genético da característica quantitativa sob estudo (Figura 2). O método tem sido aplicado com sucesso em diferentes espécies (Tabela 2), permitindo não só a compreensão da base genética de características quantitativas de interesse econômico, como também o desenvolvimento de linhagens para programas de melhoramento genético.

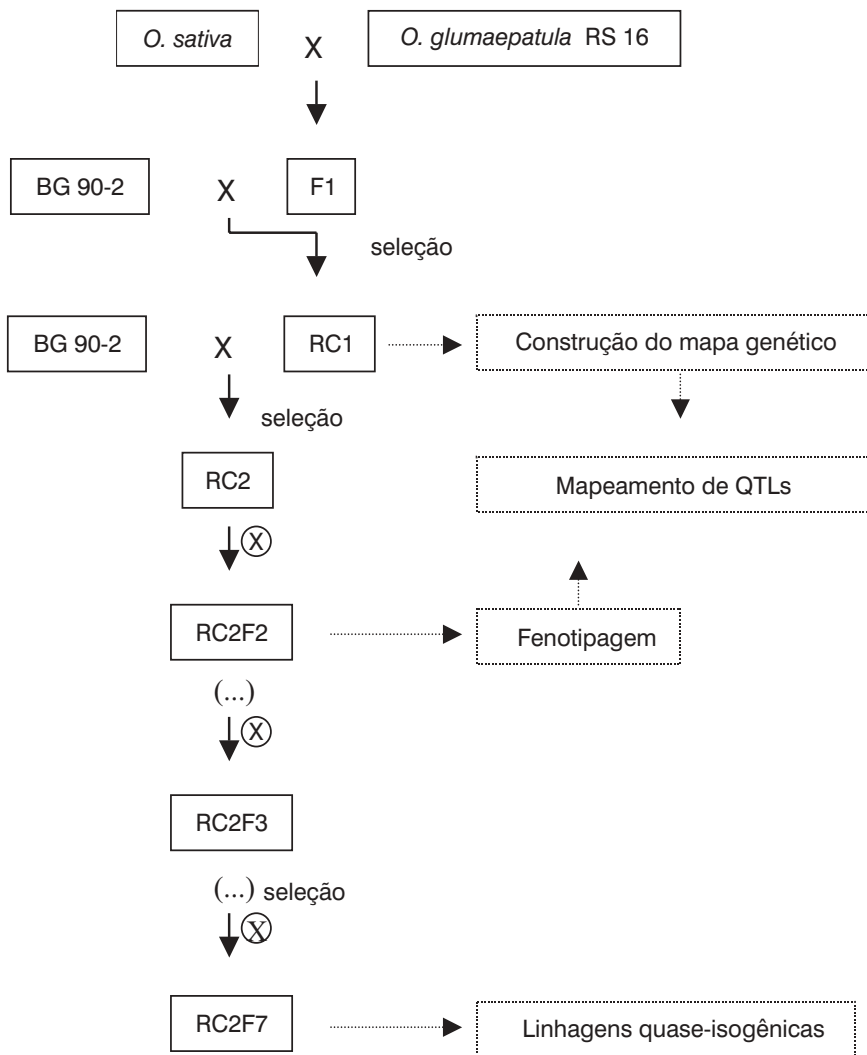


Figura 2. Esquema geral do método de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL), utilizado no desenvolvimento de linhagens de *O. sativa* com introgressão de genes da espécie silvestre *O. glumaepatula*.

A abordagem AB-QTL possibilita:

- (a) A utilização em maior escala de recursos genéticos (especialmente espécies silvestres) do banco de germoplasma também na introgressão de genes associados ao controle genético de características quantitativas.
- (b) A avaliação do efeito desses genes no *background* genético da linhagem-elite recorrente.
- (c) A identificação dos segmentos genômicos introgrididos do genitor doador ao longo dos cromossomos.
- (d) A utilização de genótipos gráficos para selecionar linhagens com diferentes composições de segmentos introgrididos.
- (e) A seleção de linhagens quase-isogênicas com introgressões que afetam características quantitativas e a sua utilização em rotina no programa de melhoramento.
- (f) A seleção negativa de plantas ainda em RC1 ou RC2 para características deletérias advindas do doador silvestre (ex., deiscência, arquitetura da planta) sem prejuízo de outros QTLs de interesse (independentes). QTLs deletérios por certo complicariam a análise fenotípica nas gerações avançadas de retrocruzamento.
- (g) A obtenção de linhagens quase-isogênicas à linhagem recorrente em apenas uma geração após a detecção de QTL com alelos desejáveis advindos do doador, o que pode acelerar significativamente o programa de melhoramento.

Uma importante consequência de um programa de AB-QTL é a possibilidade de combinar linhagens com diferentes segmentos genômicos introgrididos de vários doadores de uma característica quantitativa para a mesma linhagem recorrente. Para tanto, a informação de mapa do segmento introgridido em cada linhagem serviria de base para seleção de recombinantes de QTLs não alélicos.

Tabela 2. O método AB-QTL vem sendo aplicado em diferentes espécies para o mapeamento de locos associados ao controle de características quantitativas e desenvolvimento de linhagens quase-isogênicas à linhagem-elite recorrente.

Cruzamento	Geração AB-QTL avaliada	Número de característica avaliada	Referência
Tomate (<i>L. esculentum</i> x <i>L. pimpinellifolium</i>)	BC2F1 and BC3	21	Tanksley et al., 1996
Tomate (<i>L. esculentum</i> x <i>L. peruvianum</i>)	BC2, BC3 e BC4	35	Fulton et al., 1997 a,b
Tomate (<i>L. esculentum</i> x <i>L. hirsutum</i>)	BC3	19	Bernacchi et al., 1998a
Tomate (avaliação de linhagens quase-isogênicas de <i>L. esculentum</i> x <i>L. hirsutum</i> e <i>pimpinellifolium</i>)	várias	7	Bernacchi et al., 1998b
Arroz (<i>O. sativa</i> x <i>O. rufipogon</i>)	BC2 testcross	12	Xiao et al., 1998
Tomate (<i>L. esculentum</i> x <i>L. parviflorum</i>)	BC3	30	Fulton et al., 2000
Arroz (<i>O. sativa</i> x <i>O. rufipogon</i>)	BC2F2	8	Moncada et al., 2001
Arroz (<i>O. sativa</i> x <i>O. glumaepatula</i>)	BC2F2	11	Brondani et al., 2002
Tomate (avaliação de linhagens quase-isogênicas de <i>L. esculentum</i> x <i>hirsutum</i> , <i>peruvianum</i> , <i>pimpinellifolium</i> e <i>parviflorum</i>)	várias	16	Fulton et al., 2002
Milho (intra-específico)	BC2 testcross	6	Ho et al., 2002
Arroz (<i>O. sativa</i> x <i>O. rufipogon</i>)	BC2F1	13	Thomason et al., 2003
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> x <i>H. vulgare</i> spp. <i>Spontaneum</i>)	BC2F2	13	Pillen et al., 2003
Arroz (<i>O. sativa</i> x <i>O. rufipogon</i>)	BC2F2	14	Septiningsih et al., 2003
Trigo (intra-específico)	BC2F3	5	Huang et al., 2003
Pêssego (<i>Prunus persica</i> x <i>P. davidiana</i>)	BC2	24	Quilot et al., 2004
Tomate (<i>L. esculentum</i> x <i>L. pennellii</i>)	BC2F1	84	Frery et al., 2004
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> x <i>G. barbadense</i>)	BC3F2	1	Chee et al., 2005
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> x <i>H. vulgare</i> spp. <i>Spontaneum</i>)	BC2 dihaplóide	3 (resistência a doenças)	Von Korff et al., 2005

O método, por sua vez, não é indicado para a detecção de QTLs recessivos, provenientes do genoma doador, visto que é baseado em retrocruzamento avançado. Assim, o genótipo homocigoto para o alelo doador não poderia ocorrer na população de mapa (Tanksley & Nelson, 1996). Tampouco é adequado para a detecção de QTLs com efeito epistático se a população de retrocruzamento utilizada para mapeamento for avançada. AB-QTL também não é indicado para espécies para as quais se tem dificuldade de obtenção de linhagens puras seja por depressão por endogamia, seja por que o ciclo da espécie é muito longo (ex. espécies frutíferas e arbóreas). A obtenção de linhagens puras é importante para que sejam possíveis comparações adequadas entre as linhagens quase-isogênicas derivadas do método com a linhagem recorrente. E por ser baseado em ciclos de retrocruzamento avançado, demandando a obtenção de algumas gerações de recombinação e autofecundação, o método torna-se muito extenso para aproveitamento em espécies de ciclo longo.

Simulações do método AB-QTL indicam que, para detectar eficientemente uma QTL associada à característica quantitativa de interesse proveniente de um doador, o pesquisador deverá utilizar maior número de indivíduos em gerações de retrocruzamento recentes (como RC2) ou um número bem menor de indivíduos em gerações de retrocruzamento mais avançadas (ex. RC3). À medida que a geração de retrocruzamento se torna mais avançada, no entanto, a capacidade de detecção de QTLs é reduzida (Tanksley & Nelson, 1996).

A transferência desses alelos para linhagem-elite e o seu monitoramento no genoma por meio de marcadores moleculares tem permitido ao melhorista obter informações e desenhar novas estratégias de melhoramento (Tabela 2). Dessa forma, utilizando o conceito de genótipo gráfico, é possível certificar que a contribuição positiva para uma característica quantitativa é advinda do alelo recebido do acesso silvestre e não de novas combinações epistáticas de genes da linhagem-elite (Young & Tanksley, 1989, Brondani et al., 2002).

Emprego de análise de retrocruzamento avançado de QTLs no Brasil

As espécies silvestres de arroz vêm sendo utilizadas nos programas de melhoramento genético tanto para a ampliação da base genética das populações quanto para a transferência de características específicas para as variedades cultivadas. O uso desse germoplasma muitas vezes é dificultado devido ao fato de os cruzamentos com o arroz cultivado produzirem híbridos com vários níveis de esterilidade, além de as progênies apresentarem uma série de características indesejáveis. Do ponto de vista taxonômico, o gênero *Oryza* é dividido em quatro complexos: *O. sativa*, *O. officinalis*, *O. ridleyi* e *O. meyeriana* (Buso et al., 2002). O complexo *O. sativa* consiste nas espécies com o genoma diplóide AA, incluindo as espécies cultivadas (*Oryza sativa* e *O. glaberrima*) e seus parentes silvestres, como *O. glumaepatula*, encontrado no Brasil (Buso et al., 2002). As espécies do complexo *O. officinalis* são diplóides com genomas BB, CC, EE ou FF e tetraplóides com genomas BBCC ou CCDD, incluindo três espécies tetraplóides de genoma CCDD que ocorrem no Brasil: *O. latifolia*, *O. alta* e *O. grandiglumis*, embora haja evidência de que se trata da mesma espécie (Buso et al., 2002). Os complexos *O. ridleyi* e *O. meyeriana* são ainda pouco estudados e, aparentemente, incluem as espécies mais divergentes dos outros complexos. Das espécies silvestres de arroz que ocorrem no Brasil, a *Oryza glumaepatula* por ser autógama, diplóide e possuir genoma AA semelhante ao da espécie cultivada *Oryza sativa* é a que apresenta maior potencial de uso no melhoramento genético (Buso et al., 1998, 2002; Brondani et al., 2002). Um exemplo de aplicação do método AB-QTL é descrito a seguir (Brondani, 2000; Brondani et al., 2002), focalizado na introgressão de genes associados ao controle genético de produtividade de *O. glumaepatula* para uma linhagem-elite de *O. sativa*. Para tanto, os seguintes passos foram seguidos (Figura 2):

1. Seleção de uma planta do acesso de *Oryza glumaepatula* RS-16 (Buso et al., 1998) oriunda de uma população coletada no Rio Solimões, Amazônia a qual foi cruzada com a linhagem-elite BG 90-2 de *O. sativa*. Essa é uma das mais produtivas linhagens de arroz irrigado do programa

de melhoramento de arroz da Embrapa e foi por essa razão selecionada. Assim, a obtenção de linhagens quase-isogênicas mais produtivas que BG 90-2 por AB-QTL, por meio da seleção de alelos advindos de *O. glumaepatula*, poderia demonstrar a eficácia do método.

2. Obtenção de plantas híbridas F_1 de cruzamento interespecífico. A natureza híbrida das plantas foi confirmada por marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA e SSR (Simple Sequence Repeats) (Cavalheiro et al., 1996).
3. Retrocruzamento de uma das plantas F_1 com BG 90-2.
4. Obtenção de uma progênie de cerca de 300 plantas RC_1F_1 . Desse total, aproximadamente 100 indivíduos foram selecionados para a construção de um mapa genético (Brondani et al., 2001). Um total de 256 plantas RC_1F_1 remanescentes, com características fenotípicas favoráveis (arquitetura, indeiscência, ciclo) foi retrocruzado novamente com BG 90-2, obtendo-se a geração RC_2F_1 .
5. As plantas RC_2F_1 sofreram novamente seleção negativa para características deletérias e 93 plantas foram autofecundadas para produzir sementes RC_2F_2 .
6. Noventa e seis famílias RC_2F_2 , os dois parentais (BG 90-2 e RS-16) e a cultivar comercial BR-IRGA 409 (controle) foram avaliadas no campo em ensaios multilocais replicados. As características avaliadas foram: dias até o florescimento; altura da planta; número de perfilhos; número de panículas; comprimento da panícula; espiguetas por panícula; porcentagem de grãos cheios por panícula; peso de 100 grãos; produtividade por planta; número de grãos cheios por panícula; produtividade de grãos por panícula.
7. A detecção de QTLs de produtividade foi desenvolvida utilizando os dados fenotípicos coletados de RC_2F_2 e as informações do mapa genético (Brondani et al., 2002).
8. Com base no mapa genético, nas análises de QTLs e nos dados fenotípicos, foram selecionadas famílias RC_2F_2 que foram colhidas em bulk

(RC₂F₃) e avançadas para RC₂F₄ (Figura 2). As famílias RC₂F₄ mais as testemunhas (incluindo BG 90-2) foram avaliadas no campo.

9. Linhagens selecionadas em RC2F2 foram avaliadas ainda em RC2F4 e RC2F7.

Os resultados da análise AB-QTL possibilitaram dissecar o controle genético de produtividade de grãos no cruzamento *O. sativa* x *O. glumaepatula* (Brondani, 2000; Brondani et al., 2002). O percentual de genoma de *O. glumaepatula* (no estado heterozigoto) na geração RC2F1, por exemplo, variou de 0,0% a 26,0%, com média de 6,3%, em contraste com um esperado de 12,5%. Os dados permitiram identificar 22 linhagens RC2F2 que apresentavam 0,0% do genoma de *O. glumaepatula*. Essas linhagens são, portanto, quase-isogênicas a BG 90-2. Não foi possível identificar segmentos do genoma de *O. glumaepatula* nelas com a estringência permitida na análise (um marcador a cada 10 cM em média nos 12 cromossomos de arroz).

Entre as 22 linhagens, oito quase-isogênicas a BG 90-2, denominadas CNAi 9930, CNAi 9931, CNAi 9932, CNAi 9933, CNAi 9934, CNAi 9935, CNAi 9936 e CNAi 9937 foram avaliadas nas gerações RC2F2, RC2F4, RC2F7 (Tabela 3). Em RC2F7, foram também coletados dados de cultivo principal (primeira colheita) e soca (colheita da rebrotação após a primeira colheita) de cada uma das linhagens quase-isogênicas, sem que houvesse necessidade de novo preparo de solo e semeadura (Figura 3a). A possibilidade de fazer duas colheitas do mesmo plantio, uma do cultivo principal e outra da soca, representa uma mudança no modo de produção de arroz, já adotada em outros países como os Estados Unidos. As oito linhagens quase-isogênicas não apresentaram segmentos cromossômicos da espécie silvestre detectáveis com o nível de saturação do mapa de ligação utilizado no estudo (1 marcador a cada 10 cM), mas se mostraram transgressivas para produtividade de grãos em relação à testemunha BG 90-2.

Os componentes de produtividade “número de panículas” (PNR) e “perfilhamento” (TNR) tiveram famílias transgressivas significativamente superiores a BG 90-2. Na segregação transgressiva, os recombinantes apresentam fenótipo superior ao dos genitores. Invariavelmente, os alelos que

contribuíram para um aumento de TNR e PNR eram provenientes de *O. glumaepatula*. Perfilhamento e número de panículas são características que alteram a arquitetura da planta. Se uma panícula é produzida para cada novo perfilho, então a produtividade pode ser positivamente incrementada pela ação combinada dos genes que controlam TNR e PNR.

Uma das famílias RC2F2 (CNAi 9920) apresentou aumento de 145,8% no número de panículas por planta em relação à linhagem elite BG 90-2. CNAi 9920 possui 12,6% do genoma de *O. glumaepatula* e supera BG 90-2 em TNR também. Por sua vez, o comprimento de panícula de CNAi 9920 foi o menor entre todas as 96 famílias testadas. É interessante observar que a característica PNR é negativamente correlacionada com comprimento de panícula (Brondani et al., 2002). O loco marcador RM223 (cromossomo 8) está significativamente correlacionado com o controle de PNR.

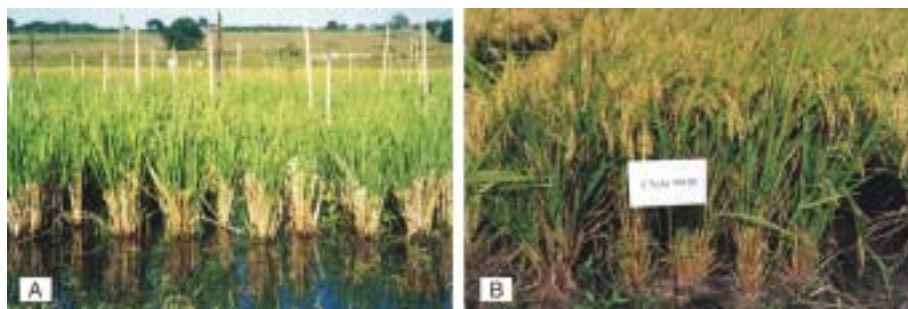


Figura 3. Alteração de arquitetura de linhagem quase-isogênica derivada do cruzamento entre *O. sativa* BG 90-2 e *O. glumaepatula* RS 16 através de AB-QTL. (a) Linhagem com alto perfilhamento, conferindo à planta maior competitividade no *estande* inicial, e a possibilidade de efetuar duas colheitas a partir de um mesmo plantio (plantio principal + soca). (b) Linhagem quase-isogênica CNAi 9930, uma das mais promissoras do programa AB-QTL, reunindo um bom número de características interessantes para o programa de melhoramento genético.

A observação dos dados de produtividade nas gerações RC2F2, RC2F4 e RC2F7 e dos dados do cultivo principal e da soca, além dos dados de qualidade de grãos (Tabela 3), permitiu concluir que as linhagens-elite de *O. sativa* com introgressão de genes da espécie silvestre *O. glumaepatula*, CNAi

9937, CNAi 9935, CNAi 9931, CNAi 9936, CNAi 9934, CNAi 9930, CNAi 9933, CNAi 9932 podem ser utilizadas imediatamente como genitores no programa de melhoramento de arroz irrigado. Essas linhagens apresentam produtividade tão boa quanto uma das linhagens mais produtivas da Embrapa e superam a Metica 1, uma variedade comercial de grande impacto na rizicultura nacional. A linhagem CNAi 9930, especialmente, destacou-se das demais por reunir maior número de características agronômicas favoráveis, apresentando características adequadas para seu lançamento como cultivar comercial (Figura 3b).

Conclusão

O emprego de análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL) é ainda incipiente, mesmo em espécies mais estudadas como o tomate e o arroz. Os resultados obtidos até agora indicam, no entanto, que a estratégia é uma promissora combinação da força de um método de melhoramento clássico como o retrocruzamento com o monitoramento de polimorfismo molecular por meio da análise de DNA. Esse método de melhoramento singular permite que a mesma população de mapa seja utilizada para fins de seleção, tendo como base o monitoramento de QTLs de interesse econômico advindos do doador (espécie silvestre) e introgridos na linhagem elite recorrente. Linhagens avançadas quase-isogênicas, apresentando alelos favoráveis do doador silvestre em QTLs de produtividade, por exemplo, foram desenvolvidas para diferentes espécies. Algumas dessas linhagens, como as desenvolvidas para arroz no Brasil, participam de ensaios de competição varietal com material avançado dos programas de melhoramento. Dada a rapidez e a eficiência dos programas baseados em análise de retrocruzamento avançado de QTLs (cerca de dois anos para espécies anuais) e com a capacidade de genotipagem em escala hoje existente nos laboratórios, a experimentação desse método de melhoramento genético deve ser mais difundida, visando ao maior ganho genético para caracteres quantitativos e, ao mesmo tempo, à ampliação da base genética dos programas de melhoramento.

Tabela 3. Produtividade média de linhagens quase-isogênicas à linhagem recorrente BG 90-2, derivadas de programa AB-QTL baseado no cruzamento *O. sativa* BG 90-2 x *O. glumaepatula* IR-16. Dados de produtividade coletados nas gerações RC2F2, RC2F4 e RC2F7. Foram coletados ainda dados produtividade média de grãos em kg/ha da soma do cultivo principal (CP) mais a soca e isoladamente (CP e SOCA), número de perfilhos (PER), paniculas (PAN), e dados em porcentagem de rendimento de grãos inteiros (INT) e total (TOT) do cultivo principal (CP) e da soca, teor de amilose (TA), temperatura de gelatinização (TG), centro branco (CB), classe dos grãos (CLA), coesividade (C) textura (TX), rendimento de panela (R) e tempo de cozimento (TC) em minutos das linhagens avaliadas.

Nome da linhagem	RC2F2	RC2F4	RC2F7	SOMA (CP+SOCA)	CP	SOCA	TNR	PNR	CP		SOCA		CP		SOCA		CP		R	TC
									INT	TOT	INT	TOT	TA	TG	CB	CLA	C	TX		
BG 90-2	8118 a	9828 a	8781 a	11854 a	8781 a	3073 a	408	406	58	73	54	72	A	A	4	LE	LP	D	250	26
CNAi 9930	10413 a	9839 a	9083 a	12010 a	9083 a	2927 a	421	419	65	73	50	69	A	A	4	LE	S	M	250	25
METICA 1	-	-	8802 a	9822 b	8802 a	1021 c	425	419	68	73	55	69	A	A	3	LF	LP	D	250	25
CNAi 9931	9967 a	9531 a	9292 a	12197 a	9292 a	2906 a	488	485	55	73	49	70	A	A	4	LE	LP	M	250	21
CNAi 9932	9940 a	9244 a	7667 b	10968 a	7667 b	3302 a	400	395	52	73	49	71	A	A	4	LE	LP	D	250	23
CNAi 9933	9823 a	8440 b	8271 a	11593 a	8271 a	3323 a	472	464	65	73	52	71	A	A	4	LE	LP	D	275	25
CNAi 9934	9757 a	9672 a	9135 a	12052 a	9135 a	2917 a	430	420	42	73	51	70	A	A	4	LE	LP	M	233	24
CNAi 9935	9754 a	9643 a	9031 a	12875 a	9031 a	3844 a	515	511	68	74	46	71	A	A	4	LE	LP	D	250	16
CNAi 9936	9660 a	10177 a	8365 a	12281 a	8365 a	3917 a	463	456	57	73	49	70	A	A	4	LE	P	D	225	15
CNAi 9937	9084 a	10256 a	9063 a	12197 a	9063 a	3135 a	404	399	53	73	46	69	A	A	4	LE	LP	D	250	23

Referências bibliográficas

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*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 97, p. 381-397, 1998a

BERNACCHI, D.; BECK BUNN, T.; EMMATTY, D.; ESHED, Y.; INAI, S.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; SAYAMA, H.; UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 97, p. 170-180, 1998b.

BRONDANI, C. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites, construção de mapa genético interespecífico de *Oryza glumaepatula* x *O. sativa* e análise de QTLs para caracteres de importância agrônômica.** 2000. Tese (Doutorado)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2000.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p. 1192-1203, 2002.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *O. glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, v. 134, p. 59-71, 2001.

BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P. H. N.; MORAIS, O. P. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 399-407, 1999.

BROWN, L. R. **State of the World.** New York: Norton, 1994.

BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Analysis of random and specific sequences of nuclear and cytoplasmic DNA in diploid and tetraploid American wild rice species (*Oryza* spp.). **Genome**, v. 44, p. 476-494, 2002.

BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Analysis of genetic variability of South-American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 107-117, 1998.

CASTRO, E. M.; BRESEGUELLO, F.; RANGEL, P. H. N.; MORAIS, O. P. Melhoramento do arroz. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV, 1999. p. 95-130.

CAVALHEIRO, S. T.; BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Paternity analysis of F1 interspecific progenies of crosses between *O. sativa* varieties and its wild relative *O. glumaepatula* using SSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 225, 1996.

CHEE, P.; DRAYE, X.; JIANG, C.; DECANINI, L.; DELMONTE, T.; BREDHAUER, R.; SMITH, W.; PATERSON, A. Molecular dissection of interspecific variation between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* (cotton) by a backcross-self approach: I. Fiber elongation. **Theor. Appl. Genet.**, v. 111, p. 757-763, 2005.

CUEVAS-PÉREZ, F. E.; GUIMARÃES, E. P.; BERRIO, L. E.; GONZÁLES, D. I. Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean, 1971 a 1989. **Crop Science**, v. 32, p. 1054-1059, 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Prelo.

FERREIRA, M. E. Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. In: BORÉM, A.; GIUDICE, M.; SEDIYAMA, T. (Ed.). **Melhoramento genômico**. Viçosa: UFV, 2003. p. 73-129.

FERREIRA, M. E. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Brasília, DF, 2001. p. 223-267.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p. 249-257.

FRARY, A.; NESBITT, T. C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K. B.; TANKSLEY, S. D. Fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, v. 289, p. 85-88, 2000.

FULTON, T. M.; BECK BUNN, T.; EMMATTY, D.; ESHED, Y.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. D. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. **Theor. Appl. Genet.** v. 95, p. 881-894, 1997.

FULTON, T. M.; GRANDILLO, S.; BECK BUNN, T.; FRIDMAN, E.; FRAMPTON, A.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. D. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* *Lycopersicon parviflorum* cross. **Theor. Appl. Genet.**, v. 100, p. 1025-1042, 2000.

FULTON, T. M.; BUCHELI, P.; VOIROL, E.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; TANKSLEY, S. D. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. **Euphytica**, v. 127, p. 163-177, 2002.

HUANG, X. Q.; COSTER, H.; GANAL, M. W.; RODER, M. S. Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor. Appl. Genet.** v. 106, p. 1379-1389, 2003.

HO, J. C.; McCOUCH, S. R.; SMITH, M. E. Improvement of hybrid yield by advanced backcross QTL analysis in elite maize. **Theor. Appl. Genet.** v. 105, p. 440-448, 2002.

HOU, A.; PEFFLEY, E. B. Recombinant chromosomes of advanced backcross plants between *Allium cepa* L. and *A. fistulosum* L. revealed by in situ hybridization. **Theor. Appl. Genet.**, v. 100, p. 1190-1196, 2000.

LEVINGS, C. S. III. Thought on cytoplasmic male-sterility in cms-T maize. **Plant Cell**, v. 5, p. 1285-1290, 1993.

LITT, M.; LUTY, 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**, v. 44, p. 397-401, 1989.

MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; JUPAPARK, C.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E. D.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v. 262, p. 1432-1436, 1993.

MONCADA, P. P.; MARTINEZ, C. P.; BORRERO, J.; CHATEL, M.; GAUCH, H. JR.; GUIMARAES, E.; TOHME, J.; MCCOUCH, S. R. Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* *Oryza rufipogon* BC2F2 population evaluated in an upland environment. **Theor. Appl. Genet.** v. 102, p. 41-52, 2001.

PATERSON, A. H.; DAMON, S.; HEWITT, J. D.; ZAMIR, D.; RABIONOWITCH, 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**, v. 127, p. 181-197, 1991.

PILLEN, K.; ZACHARIAS, A.; LEON, J. Advanced backcross QTL analysis in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 107, p. 340-352, 2003.

QUILOT, B. H.; WU, J.; KERVELLA, M.; GÉNARD, M.; FOULONGNE, K.; MOREAU. QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persicacultivars* and the wild relative species *P. davidiana*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 109, p. 884-897, 2004.

RANGEL, P. H. N.; PEREIRA, J. Á.; MORAIS, O. P.; GUIMARÃES, E.; YOKOKURA, T. Ganhos para produtividade de grãos pelo melhoramento genético do arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado no meio norte do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1595-1604, 2000.

RANGEL, P. H. N.; GUIMARÃES, E. P.; NEVES, P. C. F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p. 349-357, 1996.

SANTOS, A. B. Aproveitamento da soca. In: VIEIRA, N. R.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 463-492.

SANTOS, P. G.; SOARES, P. C.; SOARES, A. A. S.; MORAIS, O. P.; CORNÉLIO V. M. O. Avaliação do progresso genético obtido em 22 anos no melhoramento do arroz irrigado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1889-1896, 1999.

SASAKI, A.; ASHIKARI, M.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ITOH, H.; NICHIMURA, A.; SWAPAN, D.; ISHIYAMA, K.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; KHUSH, G. S.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. A mutant gibberellin synthesis gene in rice. **Nature**, v. 416, p. 701-702, 2002.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SEPTININGSIH, E. M.; TRIJATMIKO, K. R.; MOELJOPAWIRO, S.; MCCOUCH, S. R. Identification of quantitative trait loci for grain quality in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 107, p. 1433-1441, 2003.

SOARES, A. A.; RAMALHO, M. A. P.; SOUSA, A. F. Estimativas do progresso genético obtido pelo programa de melhoramento de arroz irrigado da EPAMIG na década de oitenta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 97-104, 1994.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Biotechnology**, v. 7, p. 257-264, 1989.

TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 191-203, 1996.

TANKSLEY, S. D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T. M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECK-BUNN, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 213-224, 1996.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. **Science**, v. 277, p. 1063-1066, 1997.

THOMAS, W. T. B.; POWELL, W.; WAUGH, R.; CHALMERS, K. J.; BARUA, U. M.; JACK; THOMSON, M. J.; TAI, T. H.; MCCLUNG, A.M.; LAI, X. -H.; HINGA, E. M.; LOBOS, K. B.; XU, Y.; MARTINEZ, C. P.; MCCOUCH, S. R. (2003) Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. **Theor. Appl. Genet.**, v. 107, p. 479-493, 2003.

WEBER, R. D.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEHRHAHN, C.; ALLARD, R. W. The detection and measurement of the effects of individual genes involved in the inheritance of a quantitative character in wheat. **Genetics**, v. 51, p. 109-119, 1965

XIAO, J.; GRANDILLO, S.; AHN, S.; YUAN, L.; TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH S, R. Genes from wild rice improve yield. **Nature**, v. 384, p. 223-224, 1996.

XIAO, J.; LI, J.; GRANDILLO, S.; AHN, S.; YUAN, L.; TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. **Genetics**, v. 150, p. 899-909, 1998.

YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. **Theor. Appl. Genet.**, v. 77, p. 353-359, 1989.

VON KORFF, M.; WANG, H.; LE, J.; PILLEN, K. AB-QTL analysis in spring barley. I. Detection of resistance genes against powdery mildew, leaf rust and scald introgressed from wild barley. **Theor. Appl. Genet.**, v. 111, p. 583-590, 2005.