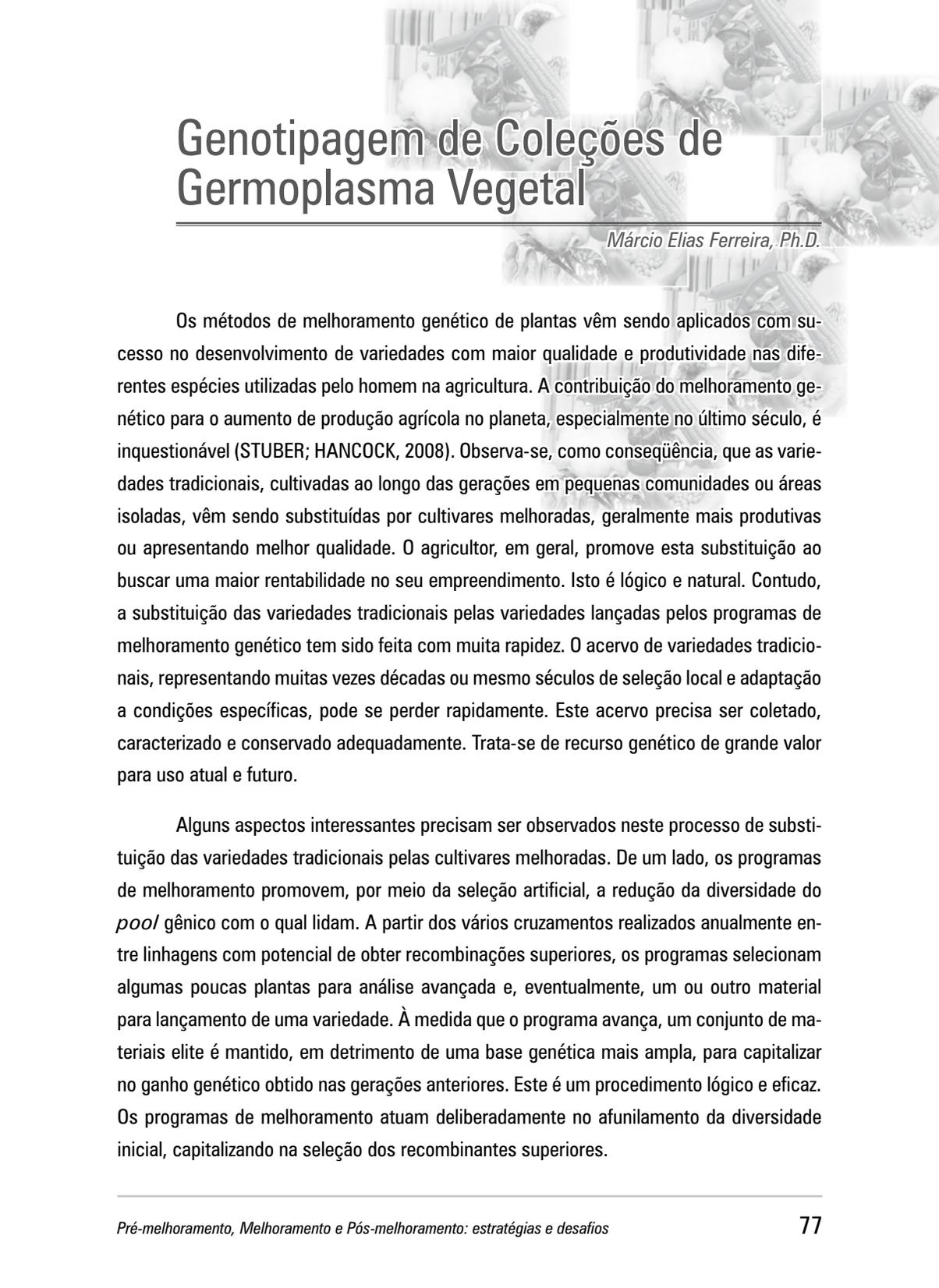




GENOTIPAGEM DE COLEÇÕES DE GERMOPLASMA VEGETAL

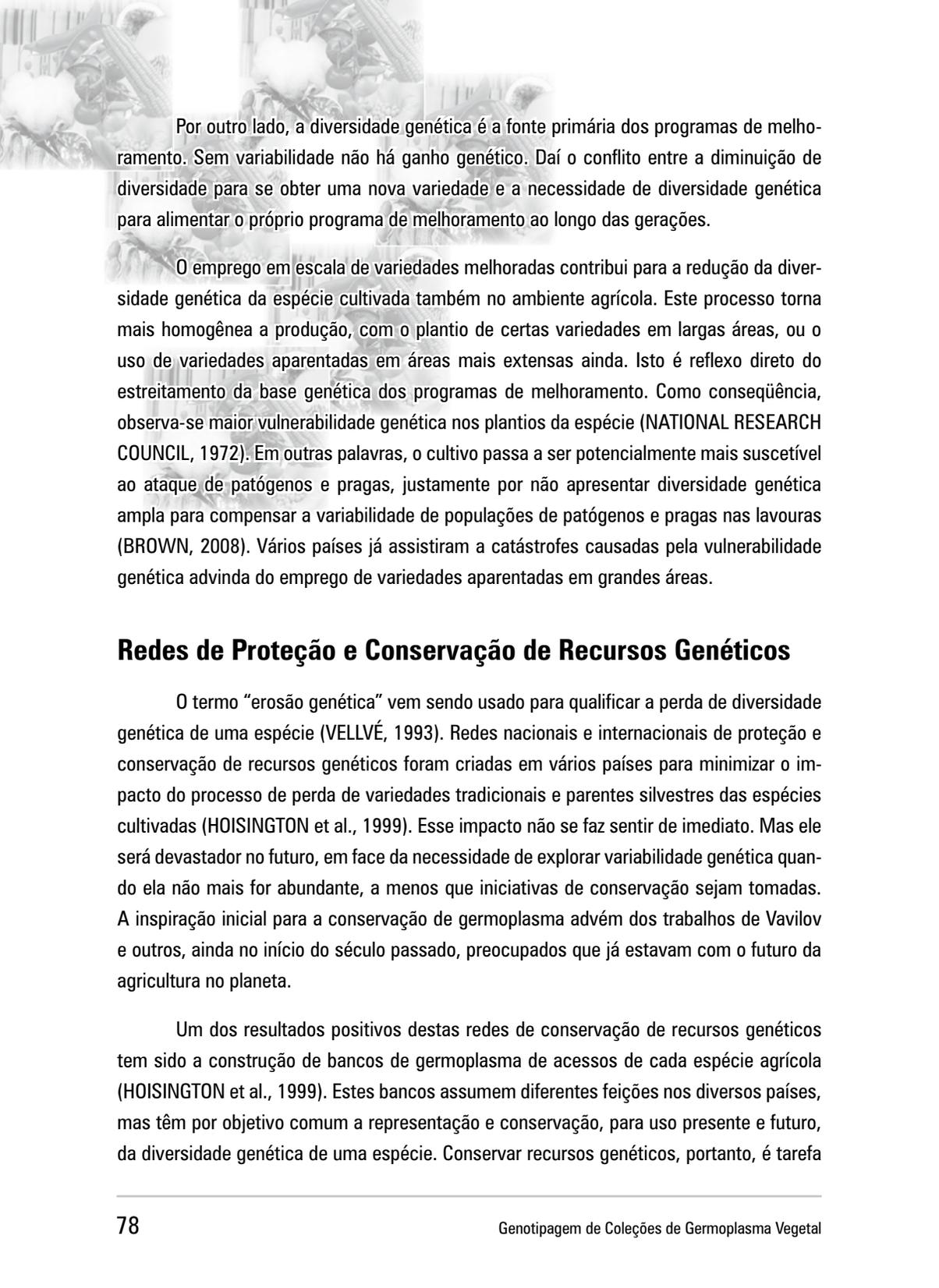


Genotipagem de Coleções de Germoplasma Vegetal

Márcio Elías Ferreira, Ph.D.

Os métodos de melhoramento genético de plantas vêm sendo aplicados com sucesso no desenvolvimento de variedades com maior qualidade e produtividade nas diferentes espécies utilizadas pelo homem na agricultura. A contribuição do melhoramento genético para o aumento de produção agrícola no planeta, especialmente no último século, é inquestionável (STUBER; HANCOCK, 2008). Observa-se, como consequência, que as variedades tradicionais, cultivadas ao longo das gerações em pequenas comunidades ou áreas isoladas, vêm sendo substituídas por cultivares melhoradas, geralmente mais produtivas ou apresentando melhor qualidade. O agricultor, em geral, promove esta substituição ao buscar uma maior rentabilidade no seu empreendimento. Isto é lógico e natural. Contudo, a substituição das variedades tradicionais pelas variedades lançadas pelos programas de melhoramento genético tem sido feita com muita rapidez. O acervo de variedades tradicionais, representando muitas vezes décadas ou mesmo séculos de seleção local e adaptação a condições específicas, pode se perder rapidamente. Este acervo precisa ser coletado, caracterizado e conservado adequadamente. Trata-se de recurso genético de grande valor para uso atual e futuro.

Alguns aspectos interessantes precisam ser observados neste processo de substituição das variedades tradicionais pelas cultivares melhoradas. De um lado, os programas de melhoramento promovem, por meio da seleção artificial, a redução da diversidade do *pool* gênico com o qual lidam. A partir dos vários cruzamentos realizados anualmente entre linhagens com potencial de obter recombinações superiores, os programas selecionam algumas poucas plantas para análise avançada e, eventualmente, um ou outro material para lançamento de uma variedade. À medida que o programa avança, um conjunto de materiais elite é mantido, em detrimento de uma base genética mais ampla, para capitalizar no ganho genético obtido nas gerações anteriores. Este é um procedimento lógico e eficaz. Os programas de melhoramento atuam deliberadamente no afinamento da diversidade inicial, capitalizando na seleção dos recombinantes superiores.



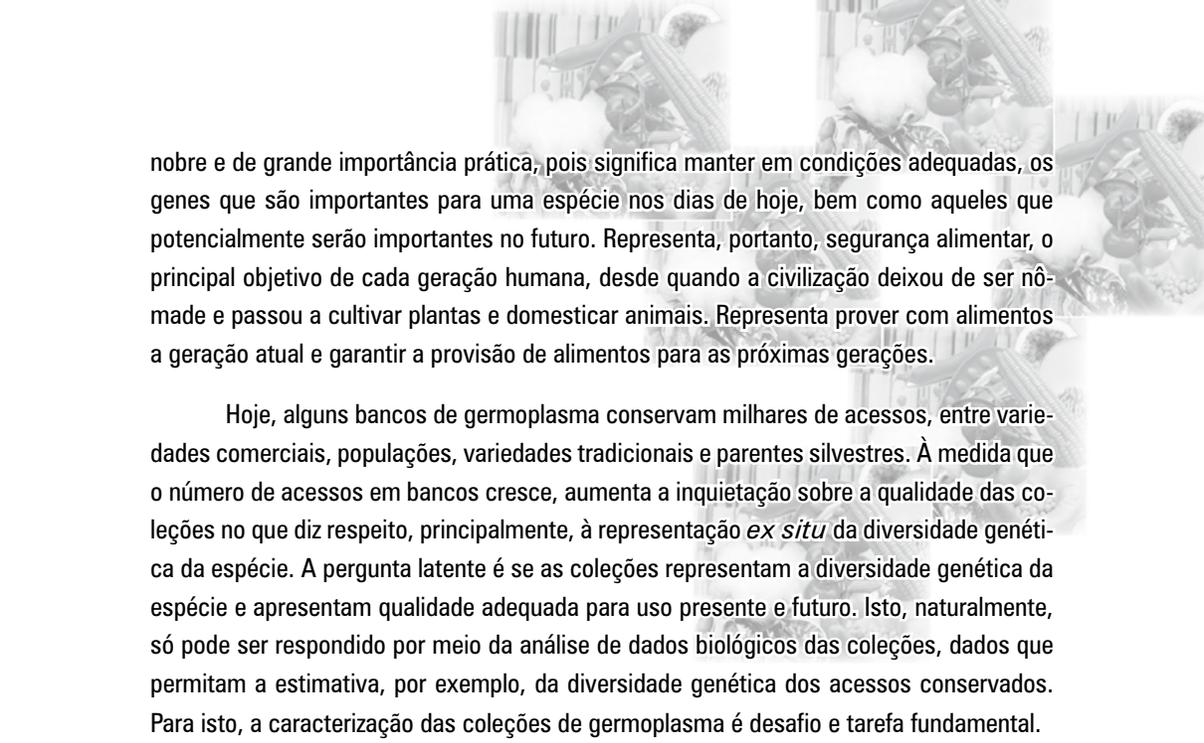
Por outro lado, a diversidade genética é a fonte primária dos programas de melhoramento. Sem variabilidade não há ganho genético. Daí o conflito entre a diminuição de diversidade para se obter uma nova variedade e a necessidade de diversidade genética para alimentar o próprio programa de melhoramento ao longo das gerações.

O emprego em escala de variedades melhoradas contribui para a redução da diversidade genética da espécie cultivada também no ambiente agrícola. Este processo torna mais homogênea a produção, com o plantio de certas variedades em largas áreas, ou o uso de variedades aparentadas em áreas mais extensas ainda. Isto é reflexo direto do estreitamento da base genética dos programas de melhoramento. Como consequência, observa-se maior vulnerabilidade genética nos plantios da espécie (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1972). Em outras palavras, o cultivo passa a ser potencialmente mais suscetível ao ataque de patógenos e pragas, justamente por não apresentar diversidade genética ampla para compensar a variabilidade de populações de patógenos e pragas nas lavouras (BROWN, 2008). Vários países já assistiram a catástrofes causadas pela vulnerabilidade genética advinda do emprego de variedades aparentadas em grandes áreas.

Redes de Proteção e Conservação de Recursos Genéticos

O termo “erosão genética” vem sendo usado para qualificar a perda de diversidade genética de uma espécie (VELLÉ, 1993). Redes nacionais e internacionais de proteção e conservação de recursos genéticos foram criadas em vários países para minimizar o impacto do processo de perda de variedades tradicionais e parentes silvestres das espécies cultivadas (HOISINGTON et al., 1999). Esse impacto não se faz sentir de imediato. Mas ele será devastador no futuro, em face da necessidade de explorar variabilidade genética quando ela não mais for abundante, a menos que iniciativas de conservação sejam tomadas. A inspiração inicial para a conservação de germoplasma advém dos trabalhos de Vavilov e outros, ainda no início do século passado, preocupados que já estavam com o futuro da agricultura no planeta.

Um dos resultados positivos destas redes de conservação de recursos genéticos tem sido a construção de bancos de germoplasma de acessos de cada espécie agrícola (HOISINGTON et al., 1999). Estes bancos assumem diferentes feições nos diversos países, mas têm por objetivo comum a representação e conservação, para uso presente e futuro, da diversidade genética de uma espécie. Conservar recursos genéticos, portanto, é tarefa

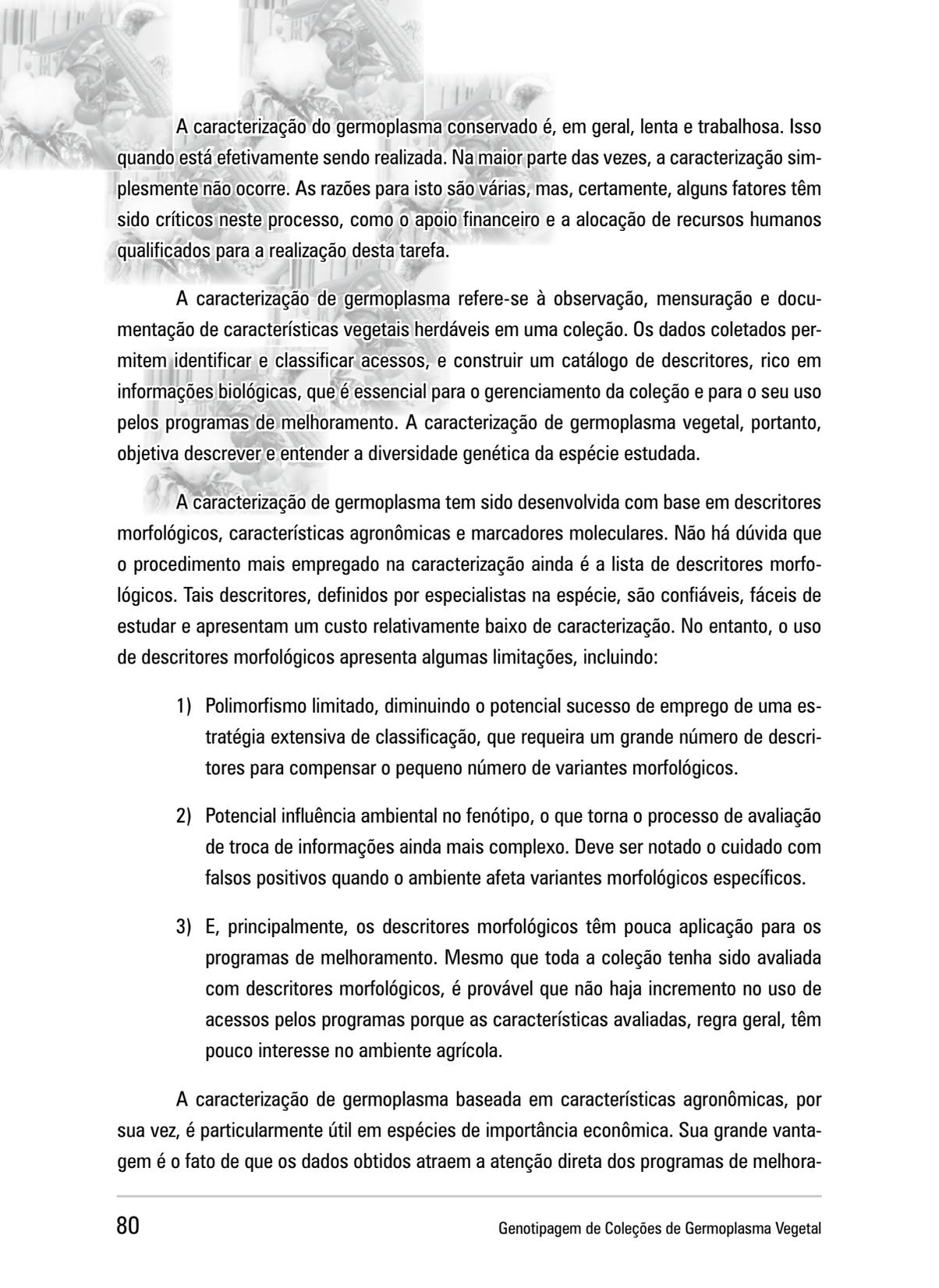


nobre e de grande importância prática, pois significa manter em condições adequadas, os genes que são importantes para uma espécie nos dias de hoje, bem como aqueles que potencialmente serão importantes no futuro. Representa, portanto, segurança alimentar, o principal objetivo de cada geração humana, desde quando a civilização deixou de ser nômade e passou a cultivar plantas e domesticar animais. Representa prover com alimentos a geração atual e garantir a provisão de alimentos para as próximas gerações.

Hoje, alguns bancos de germoplasma conservam milhares de acessos, entre variedades comerciais, populações, variedades tradicionais e parentes silvestres. À medida que o número de acessos em bancos cresce, aumenta a inquietação sobre a qualidade das coleções no que diz respeito, principalmente, à representação *ex situ* da diversidade genética da espécie. A pergunta latente é se as coleções representam a diversidade genética da espécie e apresentam qualidade adequada para uso presente e futuro. Isto, naturalmente, só pode ser respondido por meio da análise de dados biológicos das coleções, dados que permitam a estimativa, por exemplo, da diversidade genética dos acessos conservados. Para isto, a caracterização das coleções de germoplasma é desafio e tarefa fundamental.

Caracterização Morfológica e Agrônômica de Bancos de Germoplasma

A conservação, o gerenciamento e o uso de acessos, mantidos em bancos de germoplasma, apresentam uma série de desafios aos pesquisadores dedicados ao trabalho com recursos genéticos vegetais. Os desafios comuns incluem, por exemplo, o desenvolvimento de estratégias de amostragem representativa de indivíduos em populações naturais para fins de conservação, a melhoria de ferramentas e tecnologia para conservação em longo prazo ou a análise genética em escala de um número cada vez maior de acessos conservados nos bancos. É importante que todos estes desafios tenham sempre como referência a necessidade de manter coleções representativas da diversidade genética da espécie considerada. Isto é importante para a conservação *per se* dos recursos mantidos no banco e, da mesma forma, para o potencial uso do germoplasma conservado pelos programas de melhoramento genético. Portanto, a caracterização dos acessos mantidos na coleção e a investigação das relações de vínculo genético entre os acessos são fundamentais para uma conservação sustentável e incremento do uso dos acessos pelos programas de melhoramento. Mas, infelizmente, constata-se que a caracterização dos acessos depositados nos bancos de germoplasma tem sido muito limitada, no Brasil e em outros países.



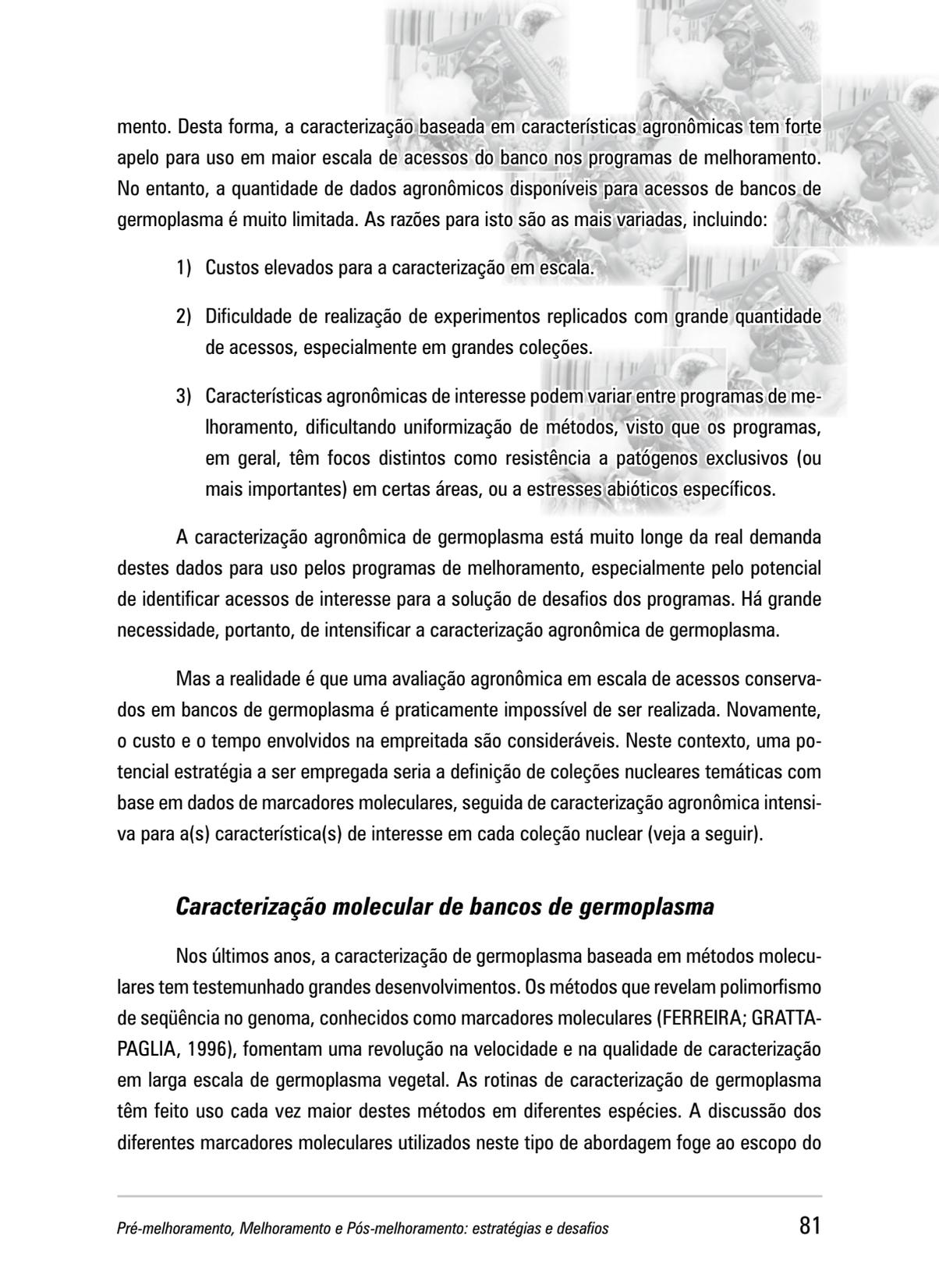
A caracterização do germoplasma conservado é, em geral, lenta e trabalhosa. Isso quando está efetivamente sendo realizada. Na maior parte das vezes, a caracterização simplesmente não ocorre. As razões para isto são várias, mas, certamente, alguns fatores têm sido críticos neste processo, como o apoio financeiro e a alocação de recursos humanos qualificados para a realização desta tarefa.

A caracterização de germoplasma refere-se à observação, mensuração e documentação de características vegetais herdáveis em uma coleção. Os dados coletados permitem identificar e classificar acessos, e construir um catálogo de descritores, rico em informações biológicas, que é essencial para o gerenciamento da coleção e para o seu uso pelos programas de melhoramento. A caracterização de germoplasma vegetal, portanto, objetiva descrever e entender a diversidade genética da espécie estudada.

A caracterização de germoplasma tem sido desenvolvida com base em descritores morfológicos, características agrônômicas e marcadores moleculares. Não há dúvida que o procedimento mais empregado na caracterização ainda é a lista de descritores morfológicos. Tais descritores, definidos por especialistas na espécie, são confiáveis, fáceis de estudar e apresentam um custo relativamente baixo de caracterização. No entanto, o uso de descritores morfológicos apresenta algumas limitações, incluindo:

- 1) Polimorfismo limitado, diminuindo o potencial sucesso de emprego de uma estratégia extensiva de classificação, que requeira um grande número de descritores para compensar o pequeno número de variantes morfológicas.
- 2) Potencial influência ambiental no fenótipo, o que torna o processo de avaliação de troca de informações ainda mais complexo. Deve ser notado o cuidado com falsos positivos quando o ambiente afeta variantes morfológicas específicos.
- 3) E, principalmente, os descritores morfológicos têm pouca aplicação para os programas de melhoramento. Mesmo que toda a coleção tenha sido avaliada com descritores morfológicos, é provável que não haja incremento no uso de acessos pelos programas porque as características avaliadas, regra geral, têm pouco interesse no ambiente agrícola.

A caracterização de germoplasma baseada em características agrônômicas, por sua vez, é particularmente útil em espécies de importância econômica. Sua grande vantagem é o fato de que os dados obtidos atraem a atenção direta dos programas de melhora-



mento. Desta forma, a caracterização baseada em características agrônômicas tem forte apelo para uso em maior escala de acessos do banco nos programas de melhoramento. No entanto, a quantidade de dados agrônômicos disponíveis para acessos de bancos de germoplasma é muito limitada. As razões para isto são as mais variadas, incluindo:

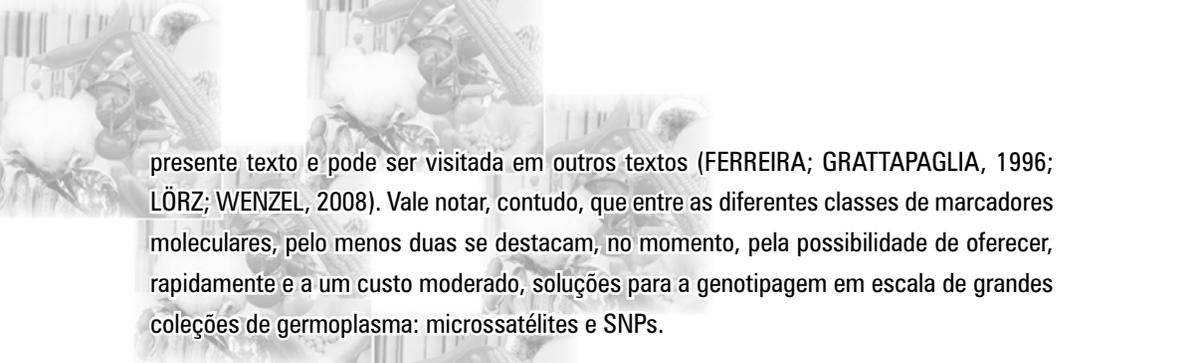
- 1) Custos elevados para a caracterização em escala.
- 2) Dificuldade de realização de experimentos replicados com grande quantidade de acessos, especialmente em grandes coleções.
- 3) Características agrônômicas de interesse podem variar entre programas de melhoramento, dificultando uniformização de métodos, visto que os programas, em geral, têm focos distintos como resistência a patógenos exclusivos (ou mais importantes) em certas áreas, ou a estresses abióticos específicos.

A caracterização agrônômica de germoplasma está muito longe da real demanda destes dados para uso pelos programas de melhoramento, especialmente pelo potencial de identificar acessos de interesse para a solução de desafios dos programas. Há grande necessidade, portanto, de intensificar a caracterização agrônômica de germoplasma.

Mas a realidade é que uma avaliação agrônômica em escala de acessos conservados em bancos de germoplasma é praticamente impossível de ser realizada. Novamente, o custo e o tempo envolvidos na empreitada são consideráveis. Neste contexto, uma potencial estratégia a ser empregada seria a definição de coleções nucleares temáticas com base em dados de marcadores moleculares, seguida de caracterização agrônômica intensiva para a(s) característica(s) de interesse em cada coleção nuclear (veja a seguir).

Caracterização molecular de bancos de germoplasma

Nos últimos anos, a caracterização de germoplasma baseada em métodos moleculares tem testemunhado grandes desenvolvimentos. Os métodos que revelam polimorfismo de seqüência no genoma, conhecidos como marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTA-PAGLIA, 1996), fomentam uma revolução na velocidade e na qualidade de caracterização em larga escala de germoplasma vegetal. As rotinas de caracterização de germoplasma têm feito uso cada vez maior destes métodos em diferentes espécies. A discussão dos diferentes marcadores moleculares utilizados neste tipo de abordagem foge ao escopo do

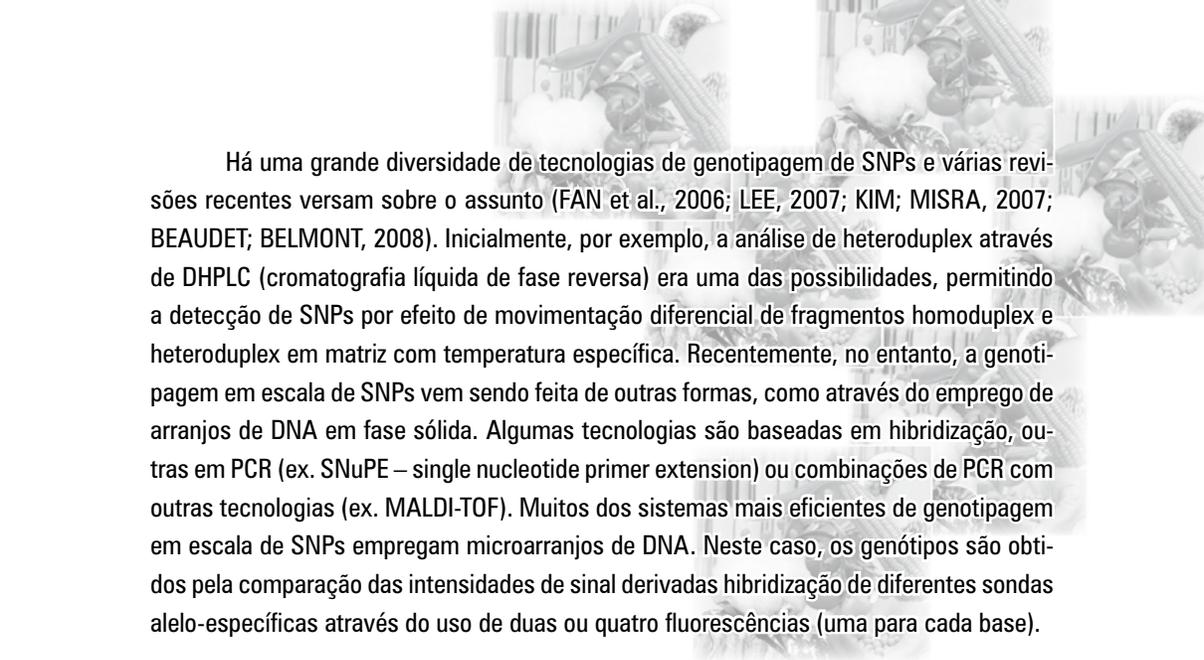


presente texto e pode ser visitada em outros textos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; LÖRZ; WENZEL, 2008). Vale notar, contudo, que entre as diferentes classes de marcadores moleculares, pelo menos duas se destacam, no momento, pela possibilidade de oferecer, rapidamente e a um custo moderado, soluções para a genotipagem em escala de grandes coleções de germoplasma: microsatélites e SNPs.

Microsatélites ou seqüências simples repetidas (Simple Sequence Repeats – SSR) (TAUTZ, 1989; WEBER; MAY, 1989) são regiões genômicas bem exploradas como ferramentas moleculares pelo alto polimorfismo, co-dominância, abundância e alto conteúdo informativo (FERREIRA and GRATTAPAGLIA, 1996). Regiões microsatélites têm sido identificadas no genoma de grande número de espécies vegetais, e marcadores têm sido desenvolvidos para análise genética das mesmas, com base no nível de polimorfismo, qualidade e localização cromossômica. O uso de painéis de marcadores microsatélites marcados com fluorocromos para análise em seqüenciadores automáticos de DNA permite a genotipagem simultânea de um grande número de acessos (PESSOA-FILHO et al., 2007), possibilitando reunir rapidamente informações genéticas relevantes sobre os acessos mantidos nos bancos de germoplasma. Marcadores microsatélites podem ser usados com eficiência para caracterizar molecularmente grandes coleções de germoplasma e extrair informações sobre a diversidade genética destas coleções.

Polimorfismos de nucleotídeo único ou polimorfismo mononucleotídeo, da sigla SNPs (single nucleotide polymorphisms), representam a classe de marcadores de DNA mais abundante do genoma eucarioto, visto que são baseados no polimorfismo definido pela mutação da seqüência de DNA em um sítio do genoma (KWOK et al., 1996; RISCH; MERIKANGAS, 1996). A substituição de uma base por outra, caracterizando uma mutação, ou ainda pequenas inserções e deleções, tipicamente não afeta o fenótipo. Mas, quando ocorre em região codante ou reguladora de expressão gênica, pode ter uma gradação de efeitos no fenótipo observado.

A descoberta de SNPs é geralmente centrada no re-sequenciamento de produtos de PCR (amplicons) em DNA extraído de uma amostra diversa de acessos da espécie estudada, ou análise de dados de bibliotecas genômicas ou de cDNA (SNP eletrônico ou eSNP) obtidas de um grupo de indivíduos de uma espécie (RAFALSKI, 2002). Uma vez descobertos e selecionados os SNPs que serão utilizados em atividades de genotipagem de acessos de coleção de germoplasma, deve-se definir o procedimento de genotipagem de SNPs.



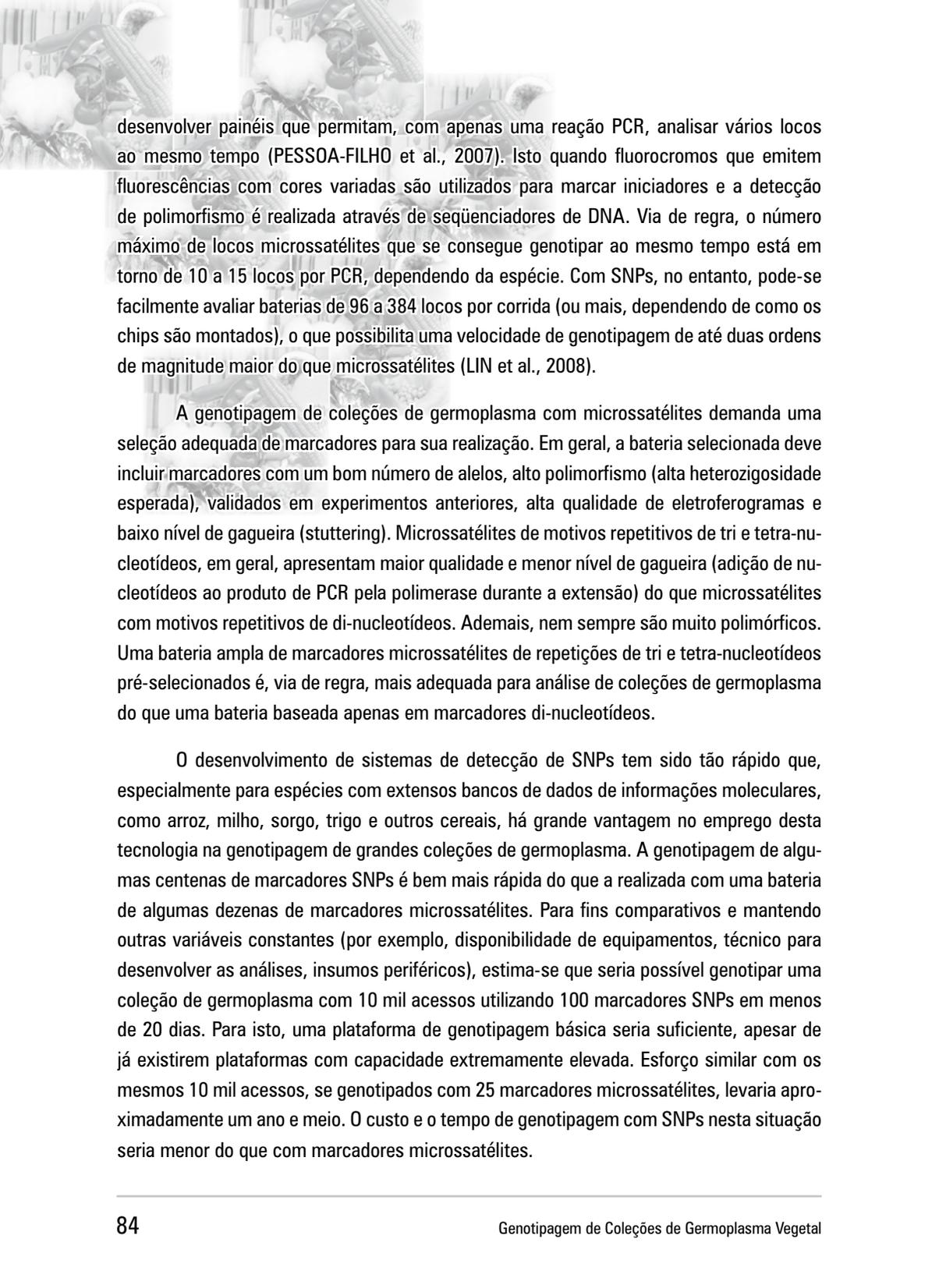
Há uma grande diversidade de tecnologias de genotipagem de SNPs e várias revisões recentes versam sobre o assunto (FAN et al., 2006; LEE, 2007; KIM; MISRA, 2007; BEAUDET; BELMONT, 2008). Inicialmente, por exemplo, a análise de heteroduplex através de DHPLC (cromatografia líquida de fase reversa) era uma das possibilidades, permitindo a detecção de SNPs por efeito de movimentação diferencial de fragmentos homoduplex e heteroduplex em matriz com temperatura específica. Recentemente, no entanto, a genotipagem em escala de SNPs vem sendo feita de outras formas, como através do emprego de arranjos de DNA em fase sólida. Algumas tecnologias são baseadas em hibridização, outras em PCR (ex. SNUPE – single nucleotide primer extension) ou combinações de PCR com outras tecnologias (ex. MALDI-TOF). Muitos dos sistemas mais eficientes de genotipagem em escala de SNPs empregam microarranjos de DNA. Neste caso, os genótipos são obtidos pela comparação das intensidades de sinal derivadas hibridização de diferentes sondas alelo-específicas através do uso de duas ou quatro fluorescências (uma para cada base).

Microsatélites ou SNPs na genotipagem de acessos de grandes coleções?

Tanto marcadores microsatélites como SNPs necessitam de informação de seqüência *a priori* para que os sistemas de detecção sejam desenvolvidos e a genotipagem possa ser realizada. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR de microsatélites são sintetizados a partir do conhecimento das seqüências que flaqueiam a região repetitiva. Os métodos de detecção de SNPs, embora extremamente variáveis, também requerem este tipo de informação.

Marcadores microsatélites são multialélicos, enquanto SNPs são, em sua grande maioria, bi-alélicos. A detecção de SNPs, portanto, não é baseada em tamanho de alelos, como em microsatélites. Não há, por esta razão, necessidade de emprego de eletroforese. Isto auxilia muito o processo de análise, já que a automatização é facilitada, através do emprego de chips de DNA, por exemplo. Marcadores SNPs, no entanto, são menos informativos que microsatélites. A heterozigosidade média esperada de SNPs em algumas plantas é, via de regra, cerca de três vezes menor do que a de locos microsatélites (CHING et al., 2002). A heterozigosidade baseada em haplótipos SNP, contudo, é maior, equivalente a valores encontrados para outros marcadores menos polimórficos, como RFLPs.

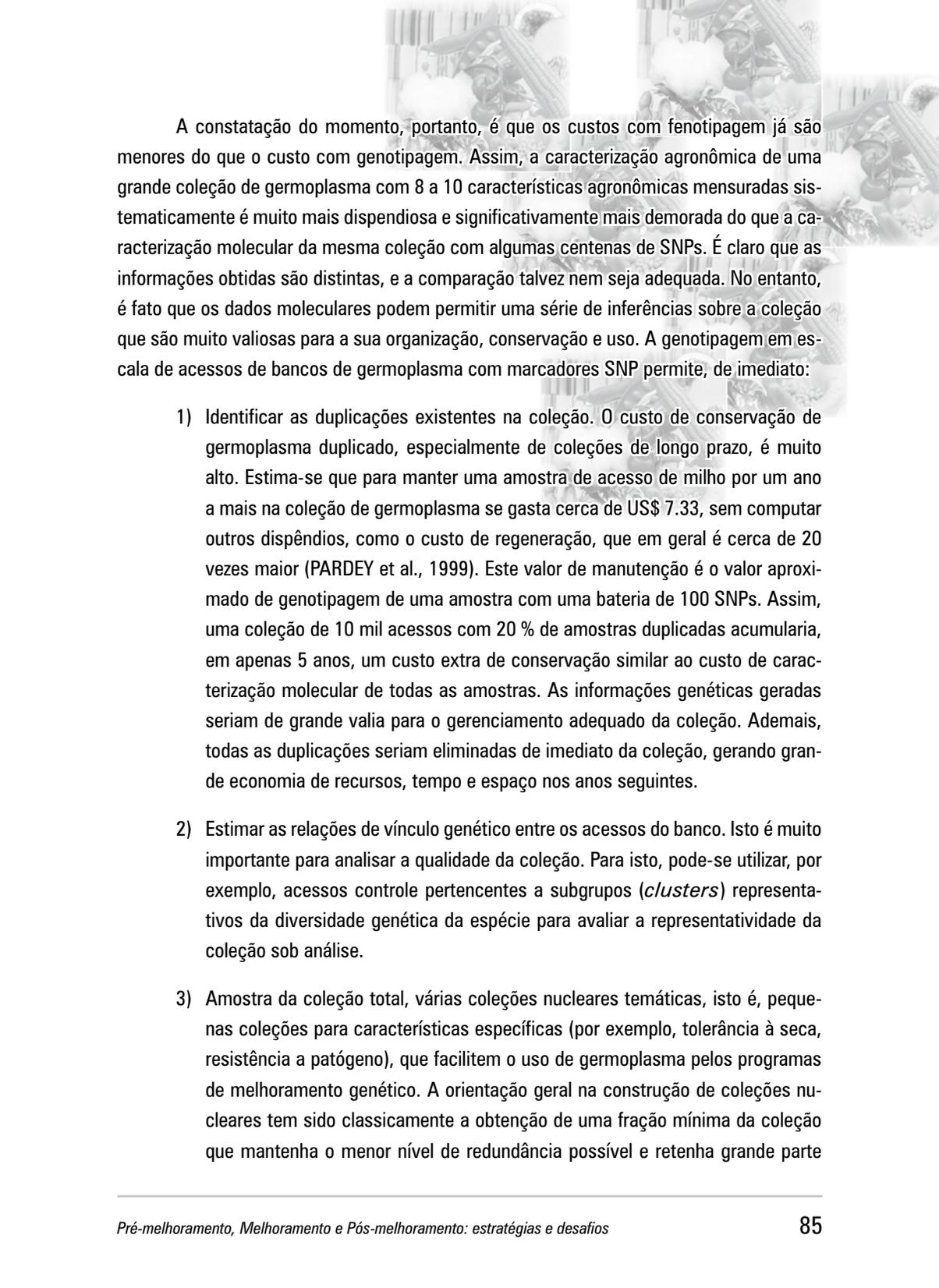
O número de locos marcadores que se consegue genotipar, em cada ensaio, com microsatélites, é hoje, bem menor do que com SNPs. Com microsatélites é possível



desenvolver painéis que permitam, com apenas uma reação PCR, analisar vários locos ao mesmo tempo (PESSOA-FILHO et al., 2007). Isto quando fluorocromos que emitem fluorescências com cores variadas são utilizados para marcar iniciadores e a detecção de polimorfismo é realizada através de seqüenciadores de DNA. Via de regra, o número máximo de locos microssatélites que se consegue genotipar ao mesmo tempo está em torno de 10 a 15 locos por PCR, dependendo da espécie. Com SNPs, no entanto, pode-se facilmente avaliar baterias de 96 a 384 locos por corrida (ou mais, dependendo de como os chips são montados), o que possibilita uma velocidade de genotipagem de até duas ordens de magnitude maior do que microssatélites (LIN et al., 2008).

A genotipagem de coleções de germoplasma com microssatélites demanda uma seleção adequada de marcadores para sua realização. Em geral, a bateria selecionada deve incluir marcadores com um bom número de alelos, alto polimorfismo (alta heterozigosidade esperada), validados em experimentos anteriores, alta qualidade de eletroferogramas e baixo nível de gagueira (stuttering). Microssatélites de motivos repetitivos de tri e tetra-nucleotídeos, em geral, apresentam maior qualidade e menor nível de gagueira (adição de nucleotídeos ao produto de PCR pela polimerase durante a extensão) do que microssatélites com motivos repetitivos de di-nucleotídeos. Ademais, nem sempre são muito polimórficos. Uma bateria ampla de marcadores microssatélites de repetições de tri e tetra-nucleotídeos pré-selecionados é, via de regra, mais adequada para análise de coleções de germoplasma do que uma bateria baseada apenas em marcadores di-nucleotídeos.

O desenvolvimento de sistemas de detecção de SNPs tem sido tão rápido que, especialmente para espécies com extensos bancos de dados de informações moleculares, como arroz, milho, sorgo, trigo e outros cereais, há grande vantagem no emprego desta tecnologia na genotipagem de grandes coleções de germoplasma. A genotipagem de algumas centenas de marcadores SNPs é bem mais rápida do que a realizada com uma bateria de algumas dezenas de marcadores microssatélites. Para fins comparativos e mantendo outras variáveis constantes (por exemplo, disponibilidade de equipamentos, técnico para desenvolver as análises, insumos periféricos), estima-se que seria possível genotipar uma coleção de germoplasma com 10 mil acessos utilizando 100 marcadores SNPs em menos de 20 dias. Para isto, uma plataforma de genotipagem básica seria suficiente, apesar de já existirem plataformas com capacidade extremamente elevada. Esforço similar com os mesmos 10 mil acessos, se genotipados com 25 marcadores microssatélites, levaria aproximadamente um ano e meio. O custo e o tempo de genotipagem com SNPs nesta situação seria menor do que com marcadores microssatélites.



A constatação do momento, portanto, é que os custos com fenotipagem já são menores do que o custo com genotipagem. Assim, a caracterização agrônômica de uma grande coleção de germoplasma com 8 a 10 características agrônômicas mensuradas sistematicamente é muito mais dispendiosa e significativamente mais demorada do que a caracterização molecular da mesma coleção com algumas centenas de SNPs. É claro que as informações obtidas são distintas, e a comparação talvez nem seja adequada. No entanto, é fato que os dados moleculares podem permitir uma série de inferências sobre a coleção que são muito valiosas para a sua organização, conservação e uso. A genotipagem em escala de acessos de bancos de germoplasma com marcadores SNP permite, de imediato:

- 1) Identificar as duplicações existentes na coleção. O custo de conservação de germoplasma duplicado, especialmente de coleções de longo prazo, é muito alto. Estima-se que para manter uma amostra de acesso de milho por um ano a mais na coleção de germoplasma se gasta cerca de US\$ 7.33, sem computar outros dispêndios, como o custo de regeneração, que em geral é cerca de 20 vezes maior (PARDEY et al., 1999). Este valor de manutenção é o valor aproximado de genotipagem de uma amostra com uma bateria de 100 SNPs. Assim, uma coleção de 10 mil acessos com 20 % de amostras duplicadas acumularia, em apenas 5 anos, um custo extra de conservação similar ao custo de caracterização molecular de todas as amostras. As informações genéticas geradas seriam de grande valia para o gerenciamento adequado da coleção. Ademais, todas as duplicações seriam eliminadas de imediato da coleção, gerando grande economia de recursos, tempo e espaço nos anos seguintes.
- 2) Estimar as relações de vínculo genético entre os acessos do banco. Isto é muito importante para analisar a qualidade da coleção. Para isto, pode-se utilizar, por exemplo, acessos controle pertencentes a subgrupos (*clusters*) representativos da diversidade genética da espécie para avaliar a representatividade da coleção sob análise.
- 3) Amostra da coleção total, várias coleções nucleares temáticas, isto é, pequenas coleções para características específicas (por exemplo, tolerância à seca, resistência a patógeno), que facilitem o uso de germoplasma pelos programas de melhoramento genético. A orientação geral na construção de coleções nucleares tem sido classicamente a obtenção de uma fração mínima da coleção que mantenha o menor nível de redundância possível e retenha grande parte



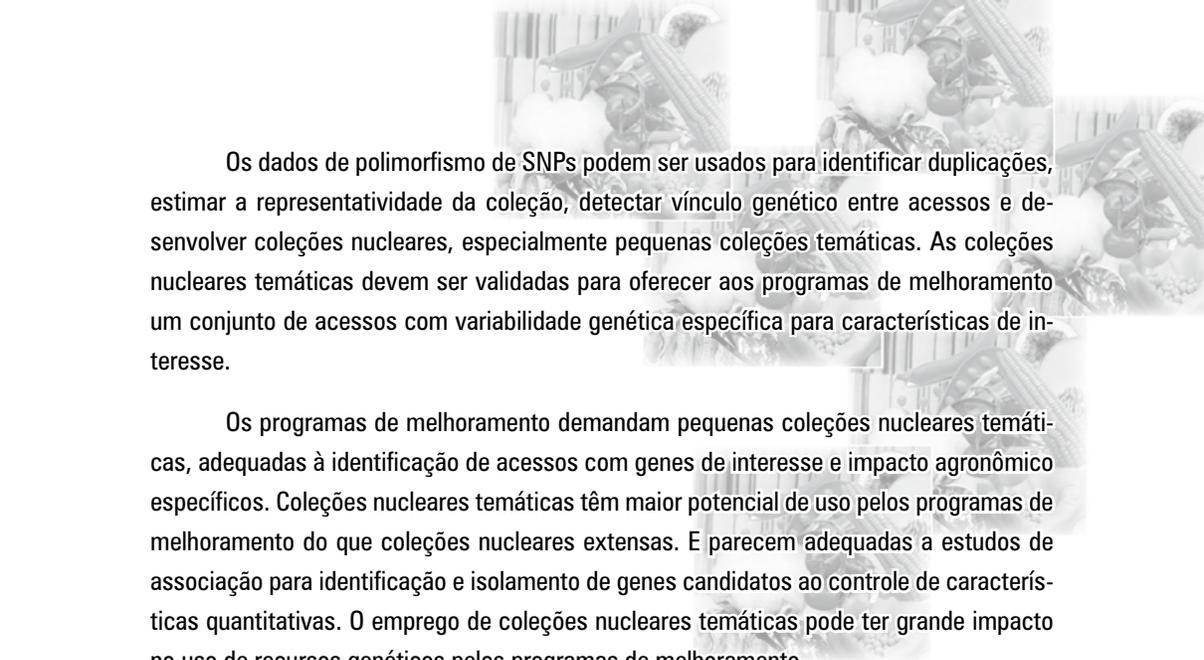
da diversidade genética (FRANKEL; BROWN, 1984). Do ponto de vista prático, para algumas espécies isto quase sempre tem resultado em coleções nucleares que, embora menores do que a original, ainda atingem alguns milhares de acessos (YAN et al., 2007). Isto, por certo, tem sido um grande avanço na redução do tamanho de grandes coleções, mas não necessariamente tem facilitado o emprego destas coleções pelos programas de melhoramento. Várias coleções menores, de algumas poucas centenas de acessos, mas com alta variabilidade para características específicas podem ser mais úteis para uso pelos programas de melhoramento.

O emprego de marcadores SNP na genotipagem de grandes coleções pode ser usado para definir várias coleções nucleares temáticas, que seriam em seguida validadas com maior facilidade pela caracterização agrônômica para as características específicas. Note-se ainda que as coleções nucleares além de serem usadas para avaliação intensiva de características de importância agrônômica, servem ao propósito de estudos de associação visando ao isolamento de genes candidatos ao controle de características quantitativas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2006), através de re-sequenciamento e fenotipagem intensivos. Tais iniciativas permitem afirmar que a integração de tecnologia genômica na caracterização de bancos de germoplasma terá papel cada vez mais importante na conservação e uso de recursos genéticos no melhoramento de plantas.

Considerações Finais

As coleções de germoplasma de algumas espécies atingem grandes volumes de acessos, e continuam crescendo. A caracterização de germoplasma é fundamental para estimar a qualidade das coleções e avaliar a representação da diversidade genética da espécie nas mesmas. Os dados de caracterização são também essenciais para aumentar o uso de acessos pelos programas de melhoramento.

A caracterização baseada em descritores morfológicos, embora importante, é pouco útil para os programas de melhoramento. A caracterização agrônômica, embora desejada, é cara e difícil de ser realizada. A caracterização molecular e, neste momento, especialmente o uso de marcadores SNP, é uma grande alternativa para facilitar a organização e uso dos acessos mantidos em bancos de germoplasma.



Os dados de polimorfismo de SNPs podem ser usados para identificar duplicações, estimar a representatividade da coleção, detectar vínculo genético entre acessos e desenvolver coleções nucleares, especialmente pequenas coleções temáticas. As coleções nucleares temáticas devem ser validadas para oferecer aos programas de melhoramento um conjunto de acessos com variabilidade genética específica para características de interesse.

Os programas de melhoramento demandam pequenas coleções nucleares temáticas, adequadas à identificação de acessos com genes de interesse e impacto agrônomico específicos. Coleções nucleares temáticas têm maior potencial de uso pelos programas de melhoramento do que coleções nucleares extensas. E parecem adequadas a estudos de associação para identificação e isolamento de genes candidatos ao controle de características quantitativas. O emprego de coleções nucleares temáticas pode ter grande impacto no uso de recursos genéticos pelos programas de melhoramento.

Referências

BEAUDET, A. L.; BELMONT, J. W. Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. *Annual Review of Medicine*, Palo Alto, v. 59, p. 113-129, 2008.

BROWN, W. L. Genetic diversity and genetic vulnerability: an appraisal. *Economic Botany*, New York, v. 37, n. 1, p. 4-12, 2008.

CHING, A.; CALDWELL, K. S.; JUNG, M.; DOLAN, M.; SMITH, O. S.; TINGEY, S.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. J. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics*, v. 3, n. 19, p. 1-14, 2002.

FAN, J. B.; CHEE, M. S.; GUNDERSON, K. L. Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews - Genetics*, London, v. 7, n. 8, p. 632-644, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1996. 220 p. (Embrapa Cenargen. Documentos, 20).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. (Ed.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. cap. 8, p. 273-306.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Current plant genetic resources: a critical appraisal. In: CHOPRA, V. L.; JOSHI, B. C.; SHARMA, R. P.; BANSAL, H. C. (Ed.). *Genetics: new frontiers*. New Delhi: Oxford: IBH, 1984. v. 4, p. 1-11.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J. M.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? Proceedings of the National Academic of Sciences, Washington, v. 99, p. 5937-5943, 1999.

KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. Annual Review of Biomedical Engineering, v. 9, p. 289-320, 2007.

KWOK, P. Y.; DENG, Q.; ZAKERI, H.; NICKERSON, A. Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. Genomics, San Diego, v. 31, p. 123-126, 1996.

LEE, J. E. High-throughput genotyping. Forum of Nutrition, v. 60, p. 97-101, 2007.

LIN, C. H.; YEAKLEY, J. M.; McDANIEL, T. K.; SHEN, R. Medium - to high -throughput SNP genotyping using VeraCode microbeads. In: BUGERT, P. (Ed.). DNA and RNA profiling in human blood: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2008. p. 129-142. (Methods in Molecular Biology, 496).

LÖRZ, H.; WENZEL, G. (Ed.). Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement. 2. ed. New York: Springer, 2008. 478 p. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 55).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Genetic vulnerability of crops. Washington: National Academy of Sciences, 1972.

PARDEY, P. G.; KOO, B.; WRIGHT, B. D.; VAN DUSEN, M. E.; SKOVMAND, B.; TABA, S. Costing the ex situ conservation of genetic resources: maize and wheat at CIMMYT. Washington: International Food Policy Institute, 1999. (EPTD Discussion Papes, 52).

PESSOA-FILHO, M. A.; BELO, A.; ALCOCHETE, A.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. A set of multiplex panels of microsatellite markers for rapid molecular characterization of rice accessions. BMC Plant Biology, v. 7, p. 23, 2007.

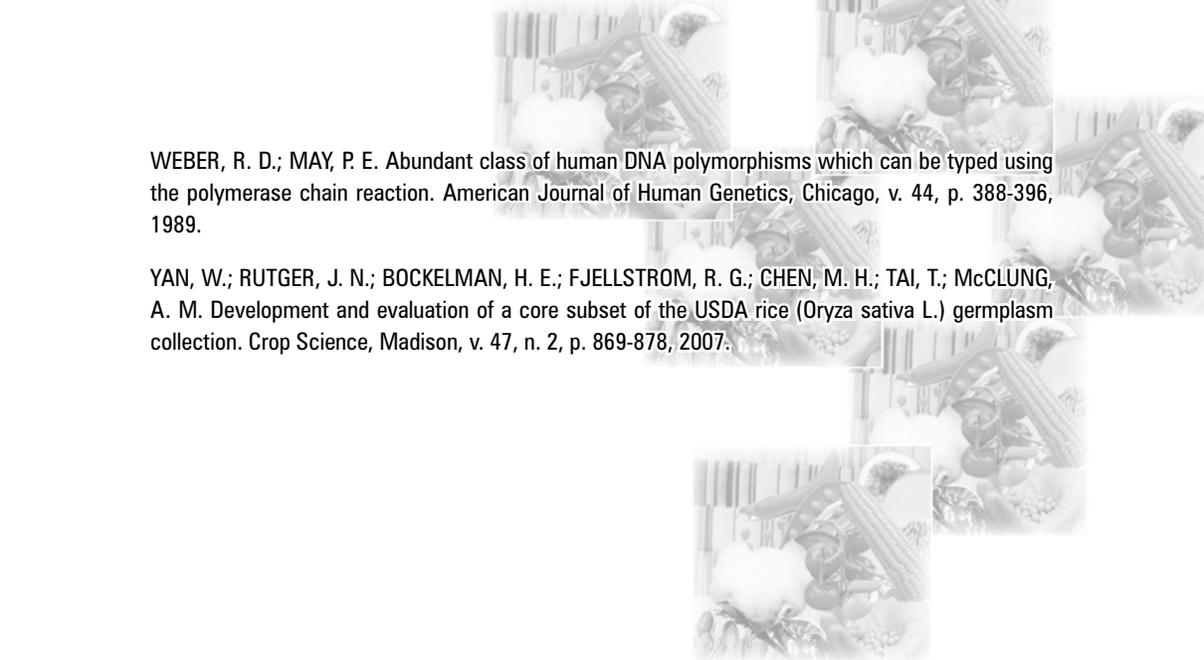
RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science, Washington, v. 273, p. 1516-1517, 1996.

STUBER, C. W.; HANCOCK, J. Sustaining plant breeding national workshop. Crop Science, Madison, v. 48, p. 25-29, 2008.

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

VELLÉ, R. The decline of diversity in European agriculture. Ecologist, Cornwall, v. 23, p. 64-69, 1993.



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*, Chicago, v. 44, p. 388-396, 1989.

YAN, W.; RUTGER, J. N.; BOCKELMAN, H. E.; FJELLSTROM, R. G.; CHEN, M. H.; TAI, T.; McCLUNG, A. M. Development and evaluation of a core subset of the USDA rice (*Oryza sativa* L.) germplasm collection. *Crop Science*, Madison, v. 47, n. 2, p. 869-878, 2007.