

Técnicas com Marcadores Moleculares Usadas nas Ciências da Saúde

Molecular Marker Techniques Used in Health Sciences

HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO¹
VICENTE MILITÃO NETO¹
LEANDRO COSTA LIMA VERDE²

RESUMO

Os marcadores moleculares nos dias de hoje estão cada vez mais sendo utilizados pelos pesquisadores para desvendar seqüências de DNA para vários fins. Existem dois tipos de marcadores moleculares: os que hibridizam e os que amplificam. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) e Minisatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles que amplificam o DNA, incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) Microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Os que hibridizam possuem uma grande desvantagem, sendo de grande custo e tempo para realizá-los. Como vantagem estes marcadores possuem uma consistência nos resultados. O VNTR possui um alto grau de polimorfismo. Os que amplificam possuem uma baixa consistência nos resultados, mas em compensação o tempo de obtenção dos resultados e a facilidade no uso destas técnicas, além dos custos, vêm colocando estes marcadores nos mais utilizados pelos pesquisadores.

DESCRIPTORIOS

Marcadores Moleculares. Hibridização. Amplificação.

SUMMARY

Molecular markers have been used by many researchers to access DNA sequences. Basically two types of molecular markers are used; based on hybridization, such as, RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) and VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) or based on amplification, such as, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) and AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). The molecular markers based on hybridization have a great problem: their high costs and execution time. However, they have the advantage of generating consistent data. On the other hand, the amplifying molecular markers do not have this advantage, but they have a low cost, short period of time is required and there is easiness in the execution. In this way, these molecular markers are the most used by researchers.

DESCRIPTORIOS

Molecular markers. Hybridization. Amplification.

¹ Professor do Departamento de Ciências Físicas e Biológicas da Universidade Regional do Cariri – URCA.

² Biólogo.

Marcadores moleculares são seqüências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos. Devido ao fato de serem características herdáveis e estáveis, os pesquisadores os utilizam para aumentar a quantidade de informações de uma espécie, maximizando as diferenças e aumentando a diversidade genética. A utilização dos marcadores moleculares tem sido aplicada na análise de diversidade genética e da biodiversidade. A variação de uma mesma região gênica em indivíduos diferentes, embora da mesma espécie, recebe o nome de polimorfismo. A análise de informações genômicas tem tido grande avanço com a utilização dos marcadores moleculares. Com a evolução dessas técnicas, cada vez mais informações são descobertas. Entretanto, uma das desvantagens é o custo de algumas técnicas, o que dificulta sua utilização na rotina dos laboratórios. Outro problema é a extrema sensibilidade à contaminação de algumas dessas técnicas, ocasionando resultados de interpretação duvidosa.

Existem diferentes técnicas que permitem identificar diretamente os polimorfismos de DNA. Os marcadores moleculares mais utilizados são diferenciados pelas técnicas utilizadas para a revelação das características entre indivíduos. Existem duas metodologias básicas de marcadores moleculares: os que hibridizam e os que amplificam o DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) e Minisatélites ou *locos* VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles que amplificam o DNA, incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) Microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILACH, 1998). Muitos pesquisadores com o intuito de obter um resultado mais confiável, utilizam mais de um marcador (BERIAM, 1999; FILHO *et al.*, 2002; LUCON, 1999; SILVA *et al.*, 2003; VEKEMANS *et al.*, 1998) ou fazem uma comparação de resultados para utilizar o mais indicado (BART-DELABESSE *et al.*, 2001; SALLA *et al.*, 2002; SOARES-RAMOS *et al.*, 2003). Outros fazem uma junção dos marcadores (SWEENEY e DANNEBERGER, 2000).

Molecular markers are DNA sequences that differentiate two or more individuals. Since they are inherited and stable characteristics, researchers use them to increase the quantity of information of a species, maximizing differences and increasing genetic diversity. The use of molecular markers has been applied in the analysis of genetic diversity and biodiversity. The variation, in the same genetic region, in different individuals, although from the same species, is called polymorphism. The analysis of genomic information has had great advances with the use of molecular markers. However, one of the disadvantages is the cost of some techniques making it difficult to use in laboratory routines. Another problem is the extreme sensibility towards contamination of some of these techniques making result interpretation doubtful.

There are different techniques that allow direct identification of DNA polymorphism. The molecular markers that are mostly used are differentiated by the techniques used for the revelation of characteristics among individuals. There are two basic molecular marker methodologies, those that hybridize DNA and those that amplify DNA. Among those identified by hybridization are RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) and minisatellites or *loci* VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Among those that amplify DNA, are marker types: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) Micro-satellite or SSR (*Simple Sequence Repeats*) and AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILACH, 1998). Many researchers whose objective has been to obtain trustworthy results have used more than one marker (BERIAM, 1999; FILHO *et al.*, 2002; LUCON, 1999; SILVA *et al.*, 2003; VEKEMANS *et al.*, 1998) or compare results to use what is more indicated (BART-DELABESSE *et al.*, 2001; SALLA *et al.*, 2002; SOARES-RAMOS *et al.*, 2003). Others make use of a combination of markers (SWEENEY and DANNEBERGER, 2000).

MÉTODOS*Marcadores moleculares revelados por hibridização**Tipo RFLP*

O polimorfismo de comprimento de DNA fragmentado (RFLP), descrito inicialmente em 1980, consiste de várias etapas como a extração de DNA; digestão com enzimas de restrição; separação dos fragmentos por eletroforese; transferência do DNA para uma membrana de nitrocelulose; hibridização da membrana com sonda molecular radioativa; e exposição da membrana a filme de raios X (MILACH, 1998). Para a realização dessa técnica, três fatores devem ser levados em conta. O primeiro é o tipo de DNA a ser analisado, o segundo é o substrato eletroforético a ser usado, e terceiro, os métodos de visualização dos fragmentos (ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2001).

A variabilidade, obtida com as clivagens das enzimas de restrição, é o reflexo de mutações pontuais ou ainda rearranjos que possam ter ocorrido em uma determinada região, ou ainda substituições da base nitrogenada na sequência de nucleotídeos, a qual é reconhecida por uma determinada enzima de restrição, alterando, dessa forma, o número de sítios de clivagem e, como consequência, o tamanho e o número dos fragmentos (ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2001). As sondas moleculares podem ser obtidas de diferentes formas. São sequências de DNA em torno de 1000 pares de bases de extensão tratadas com material radioativo e utilizadas para hibridizar o DNA a ser analisado (MILACH, 1998). A seleção de fragmentos informativos em geral é baseada na escolha de sequências homólogas a segmentos de um único *loco* no genoma. Isto facilita os estudos de segregação Mendeliana para a construção de mapas genéticos, em espécies diplóides e em poliplóides (CARRERA *et al.*, 2002). Existem três métodos de visualização dos fragmentos: quando se possui mais de 50ng de DNA por banda, utilizando o brometo de etídio; quando detectado em pequenas quantidades de DNA (picogramas), utiliza-se a coloração por prata; quando ocorre a marcação das moléculas de DNA com fósforo ou enxofre radioativos, é utilizado um filme de Raios-X para visualizar o fracionamento dos fragmentos no gel (ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Tipo minisatélites ou locos VNTR

A técnica de minisatélites foi desenvolvida no

METHODS*Molecular markers revealed by hybridization**RFLP Type*

The Restriction Fragment of Length Polymorphism, first described in 1980, consists of various stages, such as, the extraction of DNA; digestion with restriction enzymes; fragment separation through electrophoresis; DNA transfer to a nitrocellulose membrane; membrane hybridization with radioactive molecular probe; and membrane exposure to a film of x-rays (MILACH, 1998). For this technique to occur, three factors should be taken into account. The first is the type of DNA to be analyzed; the second, the electrophoresis substrate to be used; and third, the methods used for fragment visualization (ARIAS and INFANTE-MALACHIAS, 2001).

The variability obtained from the restriction enzyme cleavages, reflects punctual mutations, or rearrangements that can have occurred in a certain area, or even substitutions on the nucleotide sequence of the nitrogenous base, which is recognized by a certain restriction enzyme, altering in this way, the number of site cleavages, and consequently, the size and number of fragments (ARIAS and INFANTE-MALACHIAS, 2001). The molecular probes can be obtained in different ways. They are DNA sequences around 100 extension base pairs treated with radioactive material and utilized to hybridize the DNA to be analyzed (MILACH, 1998). In general, the selection of informed fragments is based on the choice of homologous sequences to segments in unique loci in the genome. This facilitates the Mendel segregation studies for genetic maps in diploid and polyploid species (CARRERA *et al.*, 2002). There are three fragment visualization methods: when there is more than 50ng of DNA in a band, using ethidium bromide; when small quantities of DNA (picograms) are detected, silver coloring is used; when DNA molecular markers occur with radioactive phosphorus and sulfur, a film of x-rays are used to visualize the fractions of fragments on the gel (ARIAS and INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Minisatellites or loci VNTR type

The minisatellite technique was developed in

ano de 1985. São seqüências de DNA cuja unidade repetitiva é observada lado a lado inúmeras vezes em um *locus*, e que se repetem também em vários outros *loci* no genoma. Uma seqüência repetitiva minisatélite, isolado do núcleo, pode ser utilizado como sonda para gerar em uma única reação uma impressão digital do DNA de um organismo. Por amostrar inúmeros *locos* ao mesmo tempo, este perfil eletroforético observado é muitas vezes suficiente para identificar e diferenciar um indivíduo do outro, com base nas variações observadas no DNA (FERREIRA, 2001).

A metodologia dessa técnica baseia-se na procura de pequenos números variáveis de seqüências idênticas repetidas lado a lado, possuindo de 15 a 100 pares de bases e, são repetidas até 50 vezes (LUCON, 1999). Os minisatélites constituem uma variação da técnica RFLP, modificando o tipo de sonda, o número e tipo de seqüência repetida (MILACH, 1998).

Marcadores moleculares revelados por amplificação

Tipo PCR

A primeira metade da década de 80 assistiu ao desenvolvimento de um método de amplificação de seqüência de DNA que tem revolucionado a análise genética nestes últimos anos: a reação de polimerase em cadeia (PCR) (FERREIRA *et al.*, 2001).

A técnica baseia-se na capacidade da DNA polimerase de replicar seqüências de DNA em certas condições laboratoriais a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica (*primers*) que flanqueiam a seqüência que se deseja amplificar. Uma determinada seqüência de DNA é amplificada, ciclo após ciclo (variações alternadas e cíclicas de temperatura - desnaturação; anelamento; extensão), em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel de eletroforese na forma de uma banda (FERREIRA *et al.*, 2001). Atualmente, dada a constante inovação e facilidades dos protocolos para extração de DNA (ROCA *et al.*, 2003), as facilidades na síntese de iniciadores e ao custo cada vez menor da enzima, a técnica de PCR como diagnóstico tem sido cada vez mais utilizada na fitopatologia, principalmente nos casos onde o diagnóstico precoce é imprescindível para produtividade (FILHO, 1999).

Tipo RAPD

No início da década de noventa, três grupos apresentaram uma variação da técnica de PCR: um

1985. It consists of DNA sequences whose repeated unit is observed side-by-side innumerable times in loci, and is also repeated in other locum in the genome. A repeated minisatellite sequence, isolated from the nucleus, can be used as a probe which can generate, in a unique reaction, a fingerprint of an organism's DNA. Since innumerable loci are presented at the same time, this electrophoretic profile observed is enough to identify one individual from another, and differ one individual from the other, based on the variations observed in the DNA (FERREIRA, 2001).

This technique's methodologies is based on the search for small variable number of sequences, identical, repeated, side-by-side, having 15 to 100 base pairs and are repeated up to 50 times (LUCON, 1999). Minisatellites consist of a variation of the RFLP technique, modifying the probe type, the number and the type of repeated sequence (MILACH, 1998).

Molecular markers revealed by amplification

PCR Type

The first half of the 80s observed the development of an amplification method of DNA sequence which has revolutionized genetic analysis in the past years: the reaction of polymerase in a chain (PCR) (FERREIRA *et al.*, 2001).

The technique is based on the capacity of DNA polymerase to replicate DNA sequences in certain laboratorial conditions starting from a pair of small replicating strand fragments (*primers*) which can flank the sequences to be amplified. A certain sequence of DNA is amplified, cycle after cycle (alternated and cyclical temperature variations- denaturizing; coiling; extending), in geometric progression making electrophoretic gel visualization possible, in the form of a band (FERREIRA *et al.*, 2001). Currently, because of constant innovation and easiness in protocol for the extraction of DNA (ROCA *et al.*, 2001), the easiness in the beginning synthesis and at a very low cost of enzymes, the PCR technique, as diagnosis has been greatly used in Phytopathology, principally in cases where early diagnosis is essential for productivity (FILHO, 1999).

RAPD Type

At the beginning of the decade, ninety-three groups presented a variation of the PCR technique, one

denominado de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), outro de AP-PCR (*Amplified Polymorphism – Polymerase Chain Reaction*) e DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*). O emprego de técnicas baseadas na amplificação enzimática de DNA tem grande apelo por não ser necessário conhecimento *a priori* das seqüências que serão amplificadas. Esta variação foi desenhada para contornar o problema do conhecimento prévio da seqüência de DNA que se deseja amplificar, possibilitando a utilização da técnica em organismos onde não existia nenhum conhecimento da seqüência de DNA (FERREIRA, 2001).

O princípio da técnica em primeiro lugar é construir iniciadores (*primer*) com seqüências arbitrárias, que satisfaçam algum critério com relação às suas propriedades de hibridação. O procedimento mais comum é que tenham 10 nucleotídeos e que pelo menos 6 deles sejam C ou G. Utiliza-se um único primer, de tal forma que, se houver duas seqüências que hibridizem com esse primer, dispostas de modo palindrômico a uma distância igual ou menor que 2Kb, haverá amplificação do fragmento interno (MATIOLI e PASSOS-BUENO, 2001). A metodologia utilizada no RAPD é semelhante à do PCR. A diferença é que no RAPD, como a seqüência dos *primers* (iniciadores) é aleatória, qualquer DNA que estiver contaminando a reação poderá ser amplificado e assim obter um resultado variável, sendo necessário um controle rigoroso da pureza dos materiais e do DNA (MILACH, 1998).

O polimorfismo detectado em um *loco* RAPD refere-se, em última análise, a mutações que ocorrem na fita de DNA impedindo o anelamento do primer a intervalos de fita que permitam a amplificação do segmento pela polimerase, inserções ou deleções de seqüências (FERREIRA, 2001).

Tipo SCAR e STS

Marcadores SCAR e STS são amplificados com iniciadores específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas. Muitos desses iniciadores são obtidos da conversão de marcadores RAPD e RFLP em SCAR e STS, respectivamente.

As técnicas de SCAR e STS são muito similares e as diferenças entre elas é muito tênue, pois o SCAR pode amplificar regiões de DNA que contenham seqüências repetitivas e o STS amplifica DNA de cópia simples. SCAR surgiu como uma variação de STS e foi assim denominada pela conversão de marcadores de RAPD em SCAR.

called RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), another called AP-PCR (*Amplified Polymorphism – Polymerase Chain Reaction*) and DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*). The use of techniques based on DNA enzymatic amplification is appealing because previous knowledge of the sequences that will be amplified is not necessary, making the technique possible to use with organisms that which there was no knowledge of DNA sequence (FERREIRA, 2001).

The principle of this technique is to firstly, build primers with arbitrary sequences, which satisfy some kind of criterion related to the hybridization properties. The most common procedure consists of having 10 nucleotides, and that at least 6 of them are C or G. Only one primer is used, in such a way that, if there are two sequences that hybridize with the primer, disposed in a palindrome manner, at a distance equal or smaller than 2Kb, there will be amplification of the interior fragment (MATIOLI and PASSOS-BUENO, 2001). The methodology used on RPD is similar to the one used on PCR. The difference is that, since the sequence of primers is at random and the DNA that contaminates the reaction may be amplified, and therefore obtains a variable result, in that way, being necessary rigorous control of materials and DNA purity (MILACH, 1998).

Finally, the polymorphism detected in RAPD loci refers to the mutations that happen in the DNA strand, impeding the primer from coiling at strand intervals that allow amplification of the polymerease segment, insertions or deletions of sequences (FERREIRA, 2001).

SCAR and STS Type

SCAR and STS markers are amplified with specific indicators, developed based on the previously mapped or characterized sequences. Many of those indicators are obtained from the conversion of RAPD, and RFLP on SCAR and STS markers, respectively.

The SCAR and STS techniques are very similar. Differences are subtle because SCAR can amplify DNA areas that contain repeated sequences and, STS amplifies simple copy DNA. SCAR appeared as a variation of STS and was denominated because of the RAPD and SCAR conversion markers.

Tipo microsátélites ou SSR

Os primeiros trabalhos utilizando microsátélites foram realizados em meados da década de 80 (HOSBINO *et al.*, 2002). Esta técnica baseia-se no uso de dois pares de iniciadores e da reação de PCR para detectar variações em *locos* de seqüências repetitivas. Seqüências repetitivas simples são seqüências de nucleotídeos (um, dois, três ou quatro nucleotídeos) (FERREIRA, 2001).

A técnica consiste de uma seleção de clones que contém a repetição usando sondas sintéticas complementares à repetição que se deseja e purificam-se os clones selecionados. Em seguida, os clones são seqüenciados e iniciadores específicos são construídos. Por fim, os iniciadores são testados para checar se são realmente informativos. Em geral, somente cerca de 10 a 20% dos iniciadores são informativos, tornando essa técnica de custo elevado e de intenso trabalho (FERREIRA, 2001). Além de que os géis para resolver os fragmentos de DNA devem ser de poliacrilamida. Elevando mais ainda o custo (MILACH, 1998).

O polimorfismo é revelado em um *loco* devido a diferenças no número de vezes em que um dinucleotídeo se repete naquele *loco*. Estas variações no número de repetições constituem-se, em última análise, em variações no comprimento do segmento (FERREIRA, 2001).

Tipo AFLP

Esta técnica consiste na combinação do RFLP e do PCR. A técnica envolve a digestão de DNA com enzima de restrição, conforme requer uma análise de RFLP e a amplificação de segmentos do DNA do PCR (FERREIRA *et al.*, 2001).

Essa técnica permite que fragmentos anônimos do genoma sejam amplificados por PCR após terem sido originados pela digestão do genoma por enzimas de restrição. Essa técnica envolve as seguintes etapas: digestão do genoma por uma enzima de restrição; ligação de adaptadores aos fragmentos gerados; amplificação dos fragmentos a partir de iniciadores que hibridizam com os adaptadores. Como as seqüências que existem nos adaptadores são escolhidas arbitrariamente, a grande vantagem desse método é que as condições de amplificação são ótimas de acordo com parâmetros determinados livremente pelo pesquisador (MATIOLI *et al.*, 2001).

Um grande número de *locos* pode ser amostrado em um único gel AFLP. O número médio de *locos* polimórficos também é alto nestas amostras (FERREIRA, 2001). O polimorfismo obtido com AFLP está baseado

Microsatellites or SSR Type

The first works using microsatellites were done around the mid 80s (HOSBINO *et al.*, 2002). This technique is based on the use of two pairs of initiators and the PCR reaction to detect variations in the repeated loci sequences. Simple repeated nucleotide sequences (one, two, three, or four nucleotide)(FERREIRA, 2001).

The technique consists of a selection of clones that contain the repetition using synthetic probe, complementary to the repetition desired and purification of the clones selected. Following, the clones are sequenced and specific initiators are built. Finally, initiators are tested to check if they are in fact informative. In general, only 10 to 20% of initiators are informative, making this technique costly and requiring intense work (FERREIRA, 2001); besides that, the gel used to solve the DNA fragments have to be polyacrylamide, elevating costs much more (MILACH, 1998).

Polymorphism is revealed in loci due to differences in number of times in which a dinucleotide is repeated in that locus. These variations in the numbers of repetitions constitute, as a last analysis, variations in the length of the segment (FERREIRA, 2001).

AFLP Type

This technique consists of a combination of RFLP and PCR types. The technique involves the digestion of DNA with a restriction enzyme, according to the analysis of RFLP required and the DNA amplification segment of PCR (FERREIRA *et al.*, 2001).

This technique allows the anonymous genome fragments to be amplified by PCR after having been originated by digestion of the genome by a restriction enzyme. The technique involves the following stages: digestion of the genome by a restriction enzyme; connection of adaptors to the fragments generated; fragment amplification starting from the initiators that hybridize with the adaptors. Since the sequences that exist in the adaptors are chosen at random, the great advantage of the method is that amplification conditions are perfect according to parameters determined freely by the researcher (MATIOLI *et al.*, 2001).

A great number of loci can be shown in a unique AFLP gel. The average number of polymorphic loci is also high in these samples (FERREIRA, 2001). The polymorphism obtained with AFLP is based on

em diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos (MILACH, 1998).

APLICAÇÃO

Marcadores moleculares revelados por hibridização

Tipo RFLP

Os marcadores do tipo RFLP apresentam uma série de vantagens em relação a marcadores, morfológicos, citológicos ou de isoenzimas. Eles são herdados como marcadores mendelianos livres de efeitos pleiotrópicos, não são afetados pelo ambiente, podem ser obtidos em número elevado e têm distribuição aleatória no genoma (ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2001). Comparada ao seqüenciamento de nucleotídeos propriamente dito, a técnica de RFLP é bem mais simples e barata (SALOMÃO, 1997). Essa técnica possui uma excelente reprodutibilidade nos resultados, ou seja, o padrão de fragmentos produzidos por uma determinada enzima de restrição para um dado DNA deve ser mantido e permanecer constante quando a digestão é refeita (ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2001). A desvantagem desta técnica se deve ao seu custo relativamente alto, além de ter revelado um grau de polimorfismo de intermediário a baixo, conforme a espécie. Outra desvantagem é o fato de ela ser mais demorada que as outras para a obtenção de resultados se o método de visualização for o do filme de Raio X. O tempo para obter os resultados pode variar de 7 a 21 dias, conforme o tempo necessário para expor o filme de raio X à membrana de nitrocelulose (MILACH, 1998).

Os pesquisadores têm utilizado esta técnica para investigar a variabilidade genética a partir do DNA de cloroplastos (VEKEMANS *et al.*, 1998), para análises do DNA ribossomal 16S das bactérias (SOARES-RAMOS *et al.*, 2003), para identificação e detecção de fungos fitopatogênicos e de maneira geral (BART-DELABESSE *et al.*, 2001; LUCON, 1999) e de fitobactérias (BERIAM, 1999).

Tipo minisatélites ou locos VNTR

Pode ser utilizada como método de identificação e detecção de fungos fitopatogênicos (LUCON, 1999) e análise de variação genética (FREITAS *et al.*, 2002), entre outras. Esta técnica apresenta as vantagens e desvantagens da técnica de RFLP, com a vantagem adicional

differences between genotypes in the distribution of restriction sites and in the differential fragment amplification (MILACH, 1998).

APPLICATION

Molecular markers revealed by hybridization

RFLP Type

RFLP type markers show a series of advantages in relation to morphologic, cytological or enzyme markers. They are inherited as Mendelian markers free from pleiotropics, not being affected by the surroundings, and can be obtained in big number and have a distribution at random in the genome (ARIAS and INFANTE-MALACHIAS, 2001). Comparing to the sequencing of nucleotides, the RFLP technique is much easier and cheaper (SALOMÃO, 1997). This technique possesses an excellent product reproducibility; that is, the fragment pattern produced by a certain restriction enzyme for a certain DNA must be kept and maintained constant when digestion is remade (ARIAS and INFANTE-MALACHIAS, 2001). A disadvantage of this technique is the relatively high cost, besides having revealed an amount of polymorphism from intermediate to low, according to the species. Another disadvantage is the fact that it takes longer than other techniques to obtain results if the method is visualization by x-ray film. The period to obtain results may vary from 7 to 21 days, according to the necessary time to expose the x-ray film to the nitrocellulose membrane (MILACH, 1998).

Researchers have used this technique to investigate genetic variability from chloroplast DNA (VEKEMANS *et al.*, 1998), for analysis of ribosomal 16S bacteria DNA (SOARES-RAMOS *et al.*, 2003), for the identification and detection of Phytopathogenic fungus and in a general way (BART-DELABASSE *et al.*, 2001; LUCON, 1999) and phyto bacteria (BERIAM, 1999).

Minisatellites or loco VNTR Type

It can be used as an identification method and detection of Phytopathogenic fungus (LUCON, 1999) and analysis of genetic variation (FREITAS *et al.*, 2002), among others. This technique presents advantages and disadvantages of the RFLP technique, with the

do alto grau de polimorfismo apresentado, decorrente da variação na distribuição dos sítios de restrição, das sondas utilizadas, e do número e tipos de seqüências repetitivas (MILACH, 1998).

Marcadores moleculares revelados por amplificação

Tipo PCR

A alta sensibilidade aliada à especificidade e rapidez fazem esta técnica como poderosa ferramenta para auxiliar os pesquisadores na detecção de vírus e viróides em plantas, além do estudo e entendimento da relação vírus-vetor e no transporte de vírus célula a célula, permitindo o desenvolvimento de técnicas para controle das viroses e para o melhor entendimento dos mecanismos de resistência (EIRAS, 1999). Esta técnica também é utilizada para detecção de DNA de adenovírus em linfócitos humanos (ARAÚJO *et al.*, 2001), estimativa de frequência alélica (RIBEIRO *et al.*, 2000), caracterização gênica (BASTOS *et al.*, 2000, detecção de vírus de plantas (EIRAS *et al.*, 1999), investigação filogenética utilizando DNA cloroplástico (VEKEMANS *et al.*, 1998), identificação e detecção de fitobactérias (BERIAM, 1999) e fungos fitopatogênicos (LUCON, 1999), diagnóstico molecular de bactérias (FILHO, 1999) e construção de mapas genéticos (CORRÊA *et al.*, 1997). Algumas variações da PCR levaram ao desenvolvimento de técnicas poderosas na análise de diversidade genética, como RAPD, SSR e AFLP (FERREIRA, 2001).

Tipo RAPD

Esta técnica apresenta muitas vantagens, pois como o PCR é de fácil manejo, com poucas etapas, resultado rápido, custo baixo e necessitando de pequenas quantidades de amostra do DNA genômico. Porém, desvantagens como a baixa repetibilidade de resultados, o alto cuidado com o material estéril para não ocorrer contaminação com outros DNAs, além de não detectar a distinção entre indivíduos heterozigotos dos homozigotos estão presentes. Apesar destas dificuldades, a técnica de RAPD é muito utilizada na área vegetal e florestal, apresentando um bom conteúdo informativo das espécies a um baixo custo e resultados rápidos (MILACH, 1998).

Esta técnica é muito utilizada como método de identificação e detecção de fitobactérias (BERIAM, 1999) e fungos fitopatogênicos (LUCON, 1999), para análise da variabilidade genética (ALMEIDA *et al.*, 2000; BART-DELABESSE *et al.*, 2001; BERED *et al.*, 2000;

additional advantage of the high degree of polymorphism presented derived from the variation in the distribution of the restriction sites, from the probes used, and the repeated sequence types (MILACH, 1998).

Molecular markers revealed by amplification

PCR Type

The high sensibility allied to the specificity and speed make this technique a powerful tool for researchers to detect virus and virus in plants, besides the study and comprehension of the relation between virus-vector and the transportation of the virus cell to the cell, allowing the development of techniques for viruses control and to better understand the resistance mechanisms (EIRAS, 1999). This technique is also used for the detection of adenovirus of DNA in human lymphocytes (ARAÚJO *et al.*, 2001), estimation of allelic frequency (RIBEIRO *et al.*, 2000), gene characterization (BASTOS *et al.*, 2000), detection of plant virus (EIRAS *et al.*, 1999), phylogenetic investigation using phytopatogenic fungus and fibrobacteria detection (LUCON, 1999), molecular bacteria diagnosis (FILHO, 1999) and genetic map construction (CORRÊA *et al.*, 1997). Some PCR variation drove to the development of powerful technique in the analysis of genetic diversity, like RAPD, SSR and AFLP (FERREIRA, 2001).

RAPD Type

This technique presents many advantages because PRC is of simple handling, consists of a small number of stages, fast results, low cost and requires a small amount of genomic DNA samples. However, disadvantages such as the low repeatability of results, the high care with the sterile material for contamination not to occur amongst other DNAs, besides not detecting the distinction between heterozygote individuals of the homozygote are present. Nevertheless, although there are these difficulties, the RAPD technique is used in the vegetable and forest field, presenting good information content about species at low costs and fast results (MILACH, 1998).

This technique is greatly used as a method for identification and fibro bacteria detection (BERIAM, 1999) and phylogenetic fungi (LUCON, 1999), for analysis of genetic variability (ALMEIDA *et al.*, 2000; BART-DELABASSE *et al.*, 2001; BERED *et al.*, 2000;

COLOMBO *et al.*, 1998; DELAMARE *et al.*, 2002; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; KO *et al.*, 1998; LEAL *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2000; MALUF *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2002; SALLA *et al.*, 2002; SAWAZAKI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 1998), análise molecular do DNA ribossômico 16S de bactéria (SOARES-RAMOS *et al.*, 2003), identificação de alelos resistentes (FILHO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003), construção de mapa genético (CORRÊA *et al.*, 1997), análise de DNA fóssil (IÑIGUEZ *et al.*, 2003) e para caracterizar coleções de germoplasma (LOWE *et al.*, 1996).

Tipo SCAR e STS

Possui a vantagem de serem mais consistentes e a desvantagem de envolverem o desenvolvimento de iniciadores, o que eleva o custo. Uma vez que os iniciadores estejam disponíveis, estas técnicas apresentam custo comparável ao RAPD (MILACH, 1998). Os pesquisadores utilizam esta técnica principalmente para encontrar alelos de resistência (FILHO *et al.*, 2002).

Tipo microsátélites ou SSR

As vantagens apresentadas por essa técnica são a codominância e o alto grau de polimorfismo, o que torna os microsátélites perfeitos para análise de cruzamento em plantas, pois permite a identificação de todos os alelos de um *loco* de microsátélite, encontrados em baixa frequência em uma população, permitindo o conhecimento da origem do pólen e quando ocorreu fecundação cruzada ou autofecundação dentro de uma população. Já as limitações são a genotipagem. Nesse caso, a determinação do número de repetições a partir de um fragmento clonado e a sua posterior utilização para amplificação em outras espécies, sem seqüenciamento, pode conduzir a erros na estimativa das distâncias genéticas. Os alelos nulos, com a ocorrência de mutações de ponto, inserções ou deleções, no sítio de anelamento do iniciador podem impedir a amplificação de um dado *loco* de microsátélite. Os atuais modelos mutacionais consideram como igualmente provável a ocorrência de mutações que aumentam ou diminuem o número de unidades repetidas no microsátélite, independente do seu tamanho. Podem também ser gerados artefatos de PCR, a partir do qual dois tipos comuns de erros são cometidos: a amplificação de alelos com comprimento incorreto e a não amplificação de um alelo nos indivíduos heterozigotos (HOSBINO *et al.*, 2002).

COLOMBO *et al.*, 1998; DELAMARE *et al.*, 2002; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; KO *et al.*, 1998; LEAL *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2000; MALUF *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2002; SALLA *et al.*, 2002; SWAZAKEI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 1998), ribosome 16S bacteria DNA molecular analysis (SOARES-RAMOS *et al.*, 2003), resistant coiling identification (FILHO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003) genetic map construction (CORRÊA *et al.*, 1997), DNA fossil analysis (IÑIGUEZ *et al.*, 2003) and to characterize germ plasma collection (LOWE *et al.*, 1996).

SCAR and STS Type

They possess the advantage of being more consistent, and the disadvantage of involving the development of initiators which raises costs. Once initiators are available, these techniques present costs comparable to the RAPD (MILACH, 1998). Researchers use this technique especially to find resistance alleles (FILHO *et al.*, 2002).

Micro satellites or SSR Type

The advantages presented for this technique are the codominance and the high degree of polymorphism which make microsattellites perfect for the analysis of plant breeding, because it allows the identification of all the alleles of a *loco* of micro satellites, found in low frequency, in a population, allowing the knowledge of the origin of pollen and when crossed fertilization happens or self-fertilization inside a population. However, the limitations are genotype. In this case, to determine the number of repetitions starting from a cloned fragment and its later use for amplification in other species, without sequencing, can lead to errors in the estimation of long distance genetics. The null alleles, with point mutations, insertions and deletions, on the initiators coiling site can avoid amplification of a certain microsattellite *loco*. Current mutational models consider the occurrences of mutations that increase and decrease the number of repeated units in the microsattellite equally probable, not depending on size. PRC artifacts can also be generated, from the starting point that two common errors can be committed: the amplification of alleles with incorrect length and the non-amplification of an allele in heterozygote individuals (HOSBINO *et al.*, 2002).

Esta técnica tem sido utilizada como identificação de alelos de resistência (SILVA *et al.*, 2003), análise genética (BRONDANI *et al.*, 2000; PRIOLLI *et al.*, 2002), análise da distribuição geográfica e diversidade de espécies (FERNANDES-MATIOLI *et al.*, 2000) e para análise da variabilidade genética (BART-DELABASSE *et al.*, 2001; SALLA *et al.*, 2002).

Tipo AFLP

A rapidez de obtenção de dados alia-se ao baixo custo e à simplicidade técnica, tornando a acessibilidade da técnica AFLP bastante alta (FERREIRA, 2001), além do alto grau de polimorfismo e do maior número de marcadores obtidos por gel analisado (MILACH, 1998). Em contraste com o RAPD, a técnica de AFLP é poderosa porque gera numerosos fragmentos de DNA a partir de nanogramas de DNA e como as condições de reação são estridentes, isso proporciona uma boa reprodutibilidade (LUCON, 1999). Uma limitação para vários laboratórios é a etapa de marcação radioativa e a disponibilidade de isótopos radioativos (FERREIRA, 2001).

Esses marcadores são muito empregados como método de identificação e detecção de fungos fitopatogênicos (LUCON, 1999) e na construção de mapas gênicos (SANTOS e SIMON, 2002).

O marcador de maior custo é o RFLP e o de menor é o RAPD. O RFLP se torna caro devido ao uso de enzimas de restrição, porém tem uma repetibilidade boa. Já o RAPD se torna de baixo custo, devido a utilização de iniciadores sem o conhecimento prévio da seqüência a qual se deseja amplificar. Porém não possui boa repetibilidade. O marcador AFLP é o de maior eficiência, porém com um custo alto inicialmente. Os demais marcadores, por possuírem endonucleases, se tornam de alto custo e são pouco utilizados. A utilização dos marcadores tem que ser muito bem pensada, pois cada um tem a sua vantagem e desvantagem, além de ter a sua especificidade. Dessa forma, uma boa escolha da técnica implicará num melhor andamento de um determinado projeto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sérgio Augusto Melo Coutinho pela revisão final.

This technique has been used as identification of resistance alleles (SILVA *et al.*, 2003), genetic analysis (BRONDANI *et al.*, 2000; PRIOLLI *et al.*, 2002), geographical and diversity species distribution analysis (FERNANDES-MATIOLI *et al.*, 2000) and for the genetic variability analysis (BART-DELABASSE *et al.*, 2001; SALLA *et al.*, 2002).

AFLP Type

The speed to obtain data is allied to the low cost and technique simplicity, making the AFLP technique highly accessible (FERREIRA, 2001), besides the high degree of polymorphism and the greater number of markers obtained by gel analysis (MILACHI, 1998). In contrast with RAPD, the AFLP technique is powerful because it generates a number of DNA fragments from nanograms of DNA, and since reaction conditions are limited, it provides good reproducibility (LUCON, 1999). One limitation for various laboratories, is the radioactive marking stage and the availability of the radioactive isotopes (FERREIRA, 2001).

These markers are very frequently used as identification methods and detection of phytopatogenic fungus (LUCON, 1999) and the construction of genetic maps (SANTOS and SIMON, 2002).

The marker which costs the most is the RFLP and the one whose cost is the lowest is RAPD. The RFLP becomes more expensive because of the use of restriction enzymes; however, it has a good repeatability. The RAPD has a lower cost because of the use of initiators, without the previous knowledge of which sequence one wishes to amplify. However, it does not have a good repeatability. The AFLP marker is more efficient, but it has a high initial cost. The other markers, for having endonucleases, become of a high cost and seldom used. The use of markers has to be thought beforehand, since each one has its advantages and disadvantages, besides having their specificity. In that way, a good choice of the technique will implicate the progress of a certain project.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sergio Augusto Melo Coutinho for the final revision.

REFERÊNCIAS

References

- ALMEIDA FC, MOREIRA MAM, BONVICINO CR, CERQUEIRA R. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4):793-797, 2000.
- ARAÚJO AA, YOKOSAWA J, DURIGON EL, VENTURA AM. Polymerase chain reaction detection of adenovirus DNA sequences in human lymphocytes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32(s.n.):153-157, 2001.
- ARIAS MC, INFANTE-MALACHIAS ME. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA. In: Sergio Russo (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001.
- BART-DELABESSE E, SARFATI J, DEBEAUPUIS JP, LEEUWEN WV, BELKUMAV, BRETAGNE S, LATGE JP. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(7):2683-2686, 2001.
- BASTOS RG, FEDERIZZI J, DESCHAMPS JC, CARDELLINO R, DELLAGOSTIN OA. Characterization of swine stress gene by DNA testing using plucked hair as a source of DNA. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4):815-817, 2000.
- BERED F, CARVALHO FIF, BARBOSA NETO JF. Variabilidade genética em trigo. *Bioteχνologia Ciência & Desenvolvimento*. 14(s.n.):22-25, 2000.
- BERIAM LOS. Método de identificação e detecção de fitobactérias. *Biológico*. 61(2):145-149, 1999.
- BRONDANI C, BRONDANI RPV, GARRIDO LR, FERREIRA MF. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4):753-762, 2000.
- CARRERAAD, PIZARRO G, POVERENE M, FEINGOLD AJ, BERRY ST. Variability among inbred lines and RFLP mapping of sunflower isozymes. *Genetics and Molecular Biology*. 25(1):65-72, 2002.
- CHAGAS FILHO HD. Diagnóstico molecular da bactéria *Xylella fastidiosa*. *Biológico*. 61(2):51-53, 1999.
- COLOMBO C, SECOND G, VALLE TL, CHARRIER A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. *Genetic and Molecular Biology*. 21(1):105-113, 1998.
- CORREARX, BARROS EG, FALEIRO FG, MOREIRAMA. RAPD-PCR amplification of soybean DNA using pairwise combinations of primers. *Brazilian Journal of Genetics*. 20(2):307-310, 1997.
- DELAMARE APL, ARTICO LO, GRAZZIOTIN FG, ECHEVERRIGARAY S, COSTA SOP. Total protein electrophoresis and RAPD fingerprinting analysis for the identification of *Aeromonas* at the species level. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33(s.n.): 358-362, 2002.
- EIRAS M. Detecção de vírus de plantas através de técnicas moleculares. *Biológico*. 61(2):155-157, 1999.
- FERNANDES-MATIOLI FMC, MATIOLI SR, ALMEIDA-TOLEDO LF. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4):803-807. 2000.
- FERREIRA ME. Irene Garay e Braulio FS. Dias (Eds.) Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento*. Petrópolis: Vozes, 2001.
- COLETTA FILHO HD. Diagnóstico molecular da bactéria *Xylella fastidiosa*. *Biológico*. 61(2):51-53, 1999.
- MARTINS FILHO S, SEDIYAMA CS, MOREIRA MA, BARROS EG. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Genetics and Molecular Biology*. 25(3):317-321, 2002.
- FREITAS PD, GALLETI JUNIOR PM. PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetics and Molecular Biology*. 25(4):431-434, 2002.
- GLIENKE-BLANCO C, AGUILAR-VILDOSO CI, VIEIRAMLC, BARROSO PAV, AZEVEDO JL. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetics and Molecular Biology*. 25(2):251-255, 2002.
- HOSBINOAA, PALMIERI DA, BRAVO JP, PEREIRA TEB, LOPES CR, GIMENES MA. Aplicações de marcadores moleculares do tipo microssatélite na caracterização e conservação de recursos genéticos vegetais mantidos em bancos de germoplasma. *Bioteχνologia Ciência & Desenvolvimento*. 29(s.n.):146-150, 2002.
- ÍNIGUEZ A, ARAÚJO A, FERREIRA LF, VICENTE ACP. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(Suppl. I):63-65, 2003.
- KO MK, YANG J, JIN YH, LEE CH, OH B.J. Genetic relationships of *Viola* species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 73(5):601-605, 1998.
- LEAL TCA, LEAL NC, ALMEIDAAMP. RAPD-PCR typing of *Yersinia enterocolitica* (Enterobacteriaceae) 0:3 serotype strains isolated from pigs and humans. *Genetics and Molecular Biology*. 22(3):315-319, 1999.
- LIMALHC, NÁVIAD, INGLIS PW, OLIVEIRAMRV. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4):781-785, 2000.
- LOWE AJ, HANOTTE O, GUARINO L. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*. 107(s.n.):50-54, 1996.
- LUCON CMM. Métodos de identificação e detecção de fungos fitopatogênicos. *Biológico*. 61(2):151-153, 1999.
- MALUF MP, GUERREIRO FILHO O, FAZUOLI LC. Biotecnologia: aporte tecnológico ao melhoramento do cafeeiro no IAC. *O Agrônomo*. 53(2):5-7, 2001.

28. MARTINEZ EM, CORREIA JAS, VILLELA EV, DUARTE NA, FERREIRA LF, BELLO AR. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of DNA extracted from *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) eggs and its prospective application to paleoparasitological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(Suppl. 1):59-62, 2003.
17. MARTINS FILHO S, SEDIYAMA CS, MOREIRA MA, BARROS EG. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. *Genetics and Molecular Biology*. 25(3):317-321, 2002.
29. MATIOLI SR, PASSOS-BUENO MRS. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: Sergio Russo Matioli (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001.
30. MILACH SCK. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998.
31. PIRES EJP, SAWAZAKI HE, TERRAMM. Redimeire: nova mutação da uva "Itália". *O Agrônomo*. 53(2):16, 2001.
32. PRIOLLI RHG, MENDES-JUNIOR CT, ARANTES NE, CONTEL EPB. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*. 25(2):185-193, 2002.
33. RIBEIRO LA, BARON EE, MARTINEZ ML, COUTINHO LL. PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4):831-834, 2000.
34. ROCAMG, DAVIDE LC, WHEALS AE. Template preparation for rapid PCR in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Brazilian journal of Microbiology*. 34(s.n.):8-12, 2003.
35. RODRIGUES, FM, DINIZ-FILHO JAF, BATAUS LAM, BASTOS RP. Hypothesis testing of genetic similarity based on RAPD data using Mantel tests and model matrices. *Genetics and Molecular Biology*. 25(4):435-439, 2002.
36. SALLAMFS, RUAS CF, RUAS PM, CARPENTIERI-PÍPOLO V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24(1):15-22, 2002.
37. SALOMÃO MG. Marcadores moleculares e seu papel nos estudos de sistemática, evolução, história natural e conservação. *Revista Universidade Guarulhos – Série Pós-Graduação*. 2(1):29-36, 1997.
38. SANTOS CAF, SIMON PW. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F₂ populations of carrot. *Genetics and Molecular Biology*. 25(2):195-201, 2002.
39. SAWAZAKI HE, BARBOSA W, COLOMBO CA. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereira através de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24(2):447-452, 2002.
40. SILVA GF, SANTOS JB, RAMALHO MAP. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. *Genetics and Molecular Biology*. 26(4):459-463, 2003.
41. SOARES-RAMOS JRL, RAMOS HJO, CRUZ LM, CHUBATSU LS, PEDROSA FO, RIGO LU, SOUZA EM. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genetics and Molecular Biology*. 26(4):537-543, 2003.
42. SWEENEY P, DANNEBERGER K. Inheritance of restriction amplification fragment length polymorphisms in Perennial Ryegrass. *Crop Science*. 40(s.n.):1126-1129, 2000.
43. VEKEMANS X, HARDY O, BERKEN B, FOFANA B, BAUDOIN JP. Use of PCR-RFLP on chloroplast DNA to investigate phylogenetic relationships in the genus *Phaseolus*. *Biotechnology and Agronomical Social Environment*. 2(2):128-134, 1998.
44. WANG J, HE G, PRAKASH CS, LU S. Analysis of genetic diversity in Chinese sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] germplasm using DNA amplification fingerprinting. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 113(s.n.):13-16, 1998.

CORRESPONDÊNCIA**Correspondence**

Henrique Douglas Melo Coutinho
 Universidade Regional do Cariri - URCA
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
 Departamento de Ciências Físicas e Biológicas - DCFB
 Av. cel. Antônio Luiz, 1161 – pimenta
 63100-000 Crato – Ceará – Brasil

E-mail

hdouglas@zipmail.com.br
 rebrasa@ccs.ufpb.br