

Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas.

Sandra Cristina Kothe Millach¹

Introdução

O primeiro passo para proteger legalmente um novo cultivar é a sua identificação ou descrição através de critérios estabelecidos, ou seja, descritores. Esses estão disponíveis para oito espécies vegetais que incluem algodão, arroz, batata, feijão, milho, soja, sorgo e trigo. De acordo com a Lei de Proteção de Cultivares de nº 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997, descritor é “a característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação do cultivar”.

No Brasil, a Lei abriu uma nova perspectiva e interesse na proteção e lançamento de novos materiais genéticos. A Lei, no entanto, é clara e pontual a respeito dos requisitos necessários para que um cultivar possa ser protegido. O cultivar deve ser comprovadamente distinto, homogêneo e estável. Por distinto, a Lei define “o cultivar que se distingue claramente de qualquer outro cuja a existência na data do pedido de proteção seja reconhecida”. A característica de distinguibilidade deve ser comprovada para que possa ser efetuado o pedido de proteção. O uso de descritores confiáveis e de natureza genética é indispensável nesse caso.

Tradicionalmente os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos para o registro e lançamento de nova variedades. Ainda que a caracterização de cultivares feita desta forma continue sendo predominante e importante, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de busca de outras alternativas. Uma delas têm sido os descritores de proteína de grande utilidade em culturas como o trigo. Mais recentemente, os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, têm recebido maior atenção, especialmente pelo seu potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados. O termo “fingerprinting” ou impressão digital tem sido utilizado para descrever o padrão molecular de um genótipo.

O objetivo desse trabalho é o de revisar os princípios básicos, as potencialidades e as limitações do uso de marcadores moleculares na identificação de cultivares, e discutir algumas implicações destes na proteção legal.

Tipos de descritores

Os principais tipos de descritores hoje disponíveis ao melhoramento de plantas são: os morfológicos, de proteínas, enzimas e os de DNA.

¹ Ph.D., Professora Departamento de Plantas de Lavoura, milach@vortex.ufrgs.br
Fac. Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Cx.P. 776, Porto Alegre, RS, 91501-970 Fone:(051) 316 6005; Fax: 336 5466

Os descritores morfológicos são ainda hoje o “cartão de apresentação” de uma nova variedade. Estes têm tido papel fundamental na divulgação das características agrônômicas de novos materiais genéticos e podem influenciar decisivamente na escolha de variedades por parte de agricultores e outros interessados. Quando se trata da distinguibilidade exigida pela Lei de proteção de cultivares, contudo, os descritores morfológicos apresentam limitações, especialmente na distinção de genótipos elites, aparentados. Em culturas de base genética estreita, eles podem muitas vezes não distinguir adequadamente cultivares comerciais (Smith & Smith, 1992; Pecchioni *et al.*, 1996).

Descritores baseados em proteínas e enzimas, passaram a ser efetivamente utilizados em identificação de cultivares na década de 70. O uso desses representou um avanço para o melhoramento de plantas, não apenas na caracterização de cultivares, mas também porque possibilitou a obtenção de estimativas de distância genética entre genótipos e, assim, o acesso à variabilidade existente. Smith & Smith (1992) apresentam uma extensa lista de trabalhos de caracterização de cultivares feitos com base nesses descritores, e o maior número está registrado para as culturas do trigo e milho.

Dez anos após os primeiros trabalhos com descritores de proteínas e enzimas, surgiram os de DNA, com capacidade de detectar variação genética adicional. O avanço principal que essas técnicas trazem é a possibilidade de acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este. Também, enquanto os descritores de proteína amostram apenas as regiões ativas na expressão gênica, os de DNA permitem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo. Mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes podem ser identificadas com análise de DNA, mas não com a análise morfológica ou de proteínas. O fato de haver um número quase ilimitado de descritores de DNA disponíveis e esses possibilitarem o amplo acesso da variabilidade genética em diversas espécies vegetais, faz dessa uma classe de descritores de crescente importância para caracterização de cultivares.

Marcadores moleculares na caracterização de cultivares

Várias técnicas que permitem revelar variabilidade a nível de DNA estão disponíveis. Características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente são conhecidas como marcadores moleculares.

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) ou ASA (Amplified Specific Amplicon); Microsatélite (ou SSR - “Simple Sequence Repeats”); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas. Contudo, os tipos de marcadores aqui listados são os que ainda estão sendo utilizados para caracterização de cultivares. O detalhamento de cada um dos tipos de

marcadores acima citados pode ser encontrado em Milach (1998a) e Ferreira & Grattapaglia (1995).

A técnica de RFLP é elaborada; mais demorada que as outras técnicas para obtenção de resultados; de custo relativamente alto; e tem revelado um grau de polimorfismo de intermediário a baixo, conforme a espécie. Mesmo assim, os RFLPs têm sido utilizados em um grande número de estudos de caracterização de cultivares (Gebhardt *et al.*, 1989; O'Donoghue *et al.*, 1994; Autrique *et al.*, 1996). Isso tem sido devido principalmente a sua alta consistência e repetibilidade na obtenção dos resultados.

Os minissatélites ou locos VTNR são seqüências repetitivas de DNA, adjacentes e em número variável (Jeffreys *et al.*, 1985). Essa técnica é similar a de RFLP, variando basicamente o tipo de sonda utilizado, e apresentado as vantagens e desvantagens já apresentadas para a técnica anterior. Uma vantagem adicional dos minissatélites é o alto grau de polimorfismo apresentado, decorrente da variação na distribuição dos sítios de restrição, das sondas utilizadas, e do número e tipos das seqüências repetitivas. De fato, utilizando apenas uma sonda de minissatélite, Nybom *et al.* (1990) caracterizaram quatro cultivares de *Malus sp.*, quatro de *Prunus serotina* e oito de *Rubus sp.*

A técnica de RAPD, dentre as apresentadas, é a de menor custo, número de etapas, e tempo para obter os resultados; e é fácil de implementar. Essa, contudo, tem a desvantagem de ser de repetibilidade baixa e pouco consistente de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. Assim, cuidados devem ser tomados na padronização da técnica no laboratório para a caracterização de cultivares. O nível de polimorfismo obtido com RAPDs varia grandemente com a espécie em questão, e tem sido utilizada com sucesso na caracterização de variedades de cevada (Tinker *et al.*, 1993; Penner *et al.*, 1998), e arroz (MacKILL, 1995), entre outras.

Marcadores SCAR são amplificados com *primers* específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas (Paran & Michelmore, 1993). Muitos desses *primers* são obtidos da conversão de marcadores RAPD em SCAR. Essa conversão em geral resulta na diminuição do nível de polimorfismo obtido por SCAR. Contudo, isso pode ser amenizado com a digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados; e com o sequenciamento das bandas monomórficas e subsequente desenvolvimento de *primers* que amplificam seqüências mais variáveis entre os genótipos. A técnica de SCAR é muito semelhante a de RAPD, com a vantagem de ser mais consistente e desvantagem de envolver o desenvolvimento de *primers*, o que eleva o custo.

Os Microssatélites envolvem o desenvolvimento de *primers* específicos, que é um processo elaborado e caro. Mas uma vez que estes estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se a de RAPD, com exceção de que os géis para resolver os fragmentos de DNA devem ser de policrilamida e esses são de custo mais elevado. A maior vantagem dessa técnica é o elevado polimorfismo revelado, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade.

Por fim, a técnica de AFLP possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares. De fato, tem sido utilizado com sucesso em girassol para essa finalidade (Hongtrakul *et al.*, 1997). Entre as vantagens do uso desta estão o alto grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado. AFLP é a mais elaborada das

técnicas de PCR, necessita gel de poliacrilamida para resolução dos fragmentos e é protegida por patente.

Aspectos importantes na proteção de cultivares por marcadores de DNA

Conforme já mencionado, para um cultivar ser registrado e protegido no Brasil, ele deve alcançar os critérios de distinção, uniformidade e estabilidade. Os mesmos critérios são utilizados internacionalmente (Bayle, 1983).

O potencial de uso de marcadores moleculares para a caracterização de cultivares com fins de proteção é enorme, como têm revelado trabalhos com diversas espécies vegetais (Milach, 1998b; Pecchioni *et al*, 1996).

Segundo Smith & Smith (1992), na Europa, onde a proteção de variedades é feita a mais tempo, até a data da publicação daquele artigo, os descritores morfológicos ainda eram a base da caracterização de cultivares para a maioria das espécies. Contudo, na Inglaterra, os padrões eletroforéticos de gliadinas têm sido utilizados junto com os descritores morfológicos para distinção de cultivares de trigo; e novas variedades com padrões idênticos de gliadinas não são recomendadas. Na França, desde 1990 os dados de padrões isoenzimáticos são requeridos para a identificação e registro de novas linhagens de milho, havendo planos de solicitar os padrões de marcadores de DNA. Mesmo assim, o uso de marcadores moleculares para registro de novas variedades ainda é limitado, mesmo em países onde a proteção de cultivares já é praticada a bastante tempo. No entanto, com a recente disponibilidade de tecnologias de DNA que revelam alto nível de polimorfismo e consistência nos resultados, é provável que os marcadores moleculares passem a ser incluídos no registro de novos genótipos.

Existem, contudo, ainda muitas questões relevantes a respeito da implementação rotineira de marcadores moleculares para caracterização de cultivares com vistas a proteção legal por parte dos interessados em usar esta tecnologia. Discutimos algumas delas a seguir.

A primeira delas refere-se a decisão de fazer ou não a caracterização molecular para a proteção legal. Será o uso de técnicas de DNA indispensável ou até mesmo mandatório para proteção legal? Em culturas de base genética estreita, como a soja, o uso da tecnologia de DNA será intensificado e poderá até se tornar indispensável frente ao crescente nível de parentesco entre novos cultivares de um programa de melhoramento. Em culturas que ainda apresentam alto grau de variabilidade genética para características morfológicas é possível que marcadores moleculares sejam de pouco uso para proteção legal. O fato é que a experiência do melhorista na caracterização de seus cultivares será fundamental em decidir em usar ou não esta tecnologia. O custo da caracterização molecular será um fator a ser considerado, pois esse poderá ser alto para culturas em que as técnicas de DNA não foram utilizadas e/ou desenvolvidas, que é o caso de várias espécies nativas do nordeste brasileiro. Neste caso, implementar ou não o uso de marcadores moleculares dependerá também do valor comercial do germoplasma em questão e da necessidade de proteção contra apropriação indevida do mesmo.

Uma vez que a decisão tenha sido de utilizar marcadores moleculares para a proteção de cultivares, uma série de outras questões surgem. Entre elas, as de que tipo de marcador utilizar e qual é o número mínimo de marcadores necessários para caracterizar um grupo de cultivares. As respostas a essas baseiam-se muito na espécie em questão e nas técnicas já desenvolvidas para

cada espécie. Em primeiro lugar, o nível de polimorfismo varia muito de uma espécie para outra. Naquelas em que os níveis de polimorfismo são relativamente altos, como é o caso da aveia hexaplóide cultivada (Milach *et al.*, 1997), um número menor de um tipo de marcador como RFLP (que não é o sistema mais polimórfico existente) é suficiente para a caracterização de cultivares. De fato, utilizando apenas 18 sondas de RFLP com uma enzima de restrição, O'Donoghue *et al.* (1994) conseguiram distinguir, em 100%, 83 cultivares Norte-americanas de aveia. As 18 sondas revelaram 205 locos genéticos polimórficos entre as cultivares analisadas, evidenciando o alto nível de polimorfismo. No caso da soja, para distinguir 10 cultivares, foram necessários utilizar seis clones de RFLP (com três enzimas de restrição) e sete *primers* de RAPD (Prabhu *et al.*, 1997). Mesmos assim apenas 36 locos polimórficos foram identificados. Também o número de variedades a serem caracterizadas é importante. Quanto maior o número de cultivares, maior deve ser o número de locos polimórficos para diferenciá-las.

O polimorfismo detectado para uma espécie varia muito com o tipo de marcador utilizado. Por exemplo, em arroz, o número de locos polimórficos detectados por uma sonda de minissatélite (Zhou & Gustafson, 1995) foi superior que aquele obtido por *primer* de RAPD (Cao & Oard, 1997). A diferença entre esses tipos de marcadores ocorre em outras espécies vegetais.

Outro aspecto importante é o número mínimo de indivíduos que deve ser analisado antes que o padrão molecular de um cultivar seja estabelecido. Isto porque, mesmo em espécies que se reproduzem por autofecundação, encontrar variabilidade dentro de um cultivar é comum. Nesse caso, é possível que a caracterização inicial seja feita com uma mistura de DNA de pelo menos 10 indivíduos, pois essa amostrará os alelos presentes no cultivar. Por outro lado, é importante que esses indivíduos sejam em um momento testados separadamente, pelo menos para uma parte dos marcadores, para que seja estabelecido o nível de variabilidade existente dentro do cultivar. Aqui alertamos que existe pouca informação disponível a respeito da variação dentro do cultivar e do número mínimo de plantas que devem ser testadas para evitar o estabelecimento de um padrão molecular que não represente o cultivar em estudo. Dados obtidos recentemente por nosso grupo (publicação em preparação) revelam que algumas variedades de aveia apresentam grau maior de variabilidade intrínseca que outras. O fato é que variação dentro do cultivar existe e caberá ao pesquisador estudar e amostrar o germoplasma da espécie com que trabalha até que estabeleça o procedimento adequado de amostragem. Esse pode não ser um problema para espécies de propagação vegetativa, com cultivares de origem clonal. Por outro lado, é maior quando o cultivar é uma população composta por indivíduos geneticamente distintos que se reproduzem por fecundação cruzada. No caso de cultivares sintéticos provenientes da mistura de indivíduos de constituição genética fixa, o pesquisador terá que estabelecer o padrão molecular das linhas originais que compõem o sintético.

Na questão do tempo para caracterizar um novo cultivar, esse depende basicamente do tipo de marcador a ser utilizado (enquanto que a análise de RFLP pode levar até 3 semanas, a de RAPD leva apenas um dia), número de pessoas envolvidas, e número de cultivares a serem caracterizados.

Um aspecto também de suma importância será a padronização das técnicas moleculares para a comparação de genótipos dentro de cada espécie, pois variações nos resultados de caracterização molecular podem ocorrer em

função de ajustes nas mesmas. Um exemplo é a técnica de RAPD que é de difícil repetibilidade de um laboratório para o outro. Técnicas como essa devem ser usadas com muita cautela para a proteção legal, pois dão margem a revelação de diferenças que podem não existir, provenientes de artefatos da técnica. O recomendável é que os grupos que já utilizam essa técnica, que possuem vantagens como praticidade do uso, convertam os marcadores de RAPD de interesse naqueles do tipo SCAR, que são de maior especificidade e repetibilidade. De qualquer maneira, com essa ou outras técnicas de marcadores de DNA, será importante que os dados de caracterização do cultivar de um programa de melhoramento possam ser comparados com o de outros. Para isso alguns aspectos importantes serão: apresentar em detalhes a metodologia utilizada na caracterização de um cultivar, na ocasião do pedido de proteção; e que sejam escolhidos para cada espécie alguns cultivares com padrão molecular já estabelecido para serem utilizados como referência para a caracterização dos novos. O importante é que essas medidas sejam discutidas e determinadas para cada espécie no qual os descritores de DNA possam ser utilizados. Em países com tradição na proteção de cultivares, os protocolos de análise de laboratório têm sido padronizados (Draper, 1987).

Usos da caracterização e proteção de cultivares

Os casos do uso de análises de DNA pela justiça americana para comprovação de paternidade e julgamento de crimes em humanos, indicam que as técnicas moleculares podem passar a ser requeridas no reconhecimento de germoplasma em plantas. Existem relatos de uso de dados de análises de eletroforese e cromatografia para comprovação de apropriação indevida de germoplasma em milho e trigo (Smith & Smith, 1992). No entanto, não encontramos registros do uso de análises de DNA com esse objetivo, provavelmente por não terem ocorrido casos desta natureza nos últimos anos, quando as técnicas de análise de DNA passaram a ser mais utilizadas. Mesmo assim, acreditamos que a iniciativa de buscar a caracterização molecular de cultivares com vistas a proteção, especialmente em espécies autógamas, será dos próprios interessados: empresas e melhoristas.

O conhecimento do padrão molecular de cultivares possibilitará também o teste de pureza genética de lotes de semente, e em alguns casos até de grãos. No caso da indústria cervejeira, que ajusta o processamento industrial para cultivares específicas, a identificação precisa do germoplasma pode ser requerida em várias etapas, incluindo na chegada do produto na maltaria. Assim, testes com base na análise molecular estão em desenvolvimento no Canadá, com esse objetivo (Penner *et al.*, 1998).

Várias organizações já utilizam testes bioquímicos para checar a qualidade do processo e da semente produzida (Smith & Smith, 1992). Os marcadores moleculares também poderão ser utilizados com esse objetivo.

A maioria dos trabalhos na literatura que dispõe de informações de caracterização de cultivares, têm como objetivo principal acessar a variabilidade e o nível de diversidade genética das diferentes culturas. De fato, a caracterização de cultivares com marcadores moleculares, quando feita sistematicamente e com técnicas padronizadas, pode levar a obtenção de um banco de dados precioso por parte do programa de melhoramento. Esses dados poderão ser utilizados para inúmeros objetivos, incluindo: a verificação de genealogias não confiáveis ou

com falta de informação (Lee *et al.*, 1990); acesso a variabilidade existente no programa e grau de diversidade genética (O'Donoghue *et al.*, 1994; Cao & Oard, 1997); auxílio no planejamento de cruzamentos, especialmente no caso de genótipos elites e aparentados (Lee, 1995); definição de grupos heteróticos (Hongtrakul *et al.*, 1997) ; entre outros. No caso de descritores morfológicos, isso não é possível, conforme comentado anteriormente.

Considerações finais

A demanda pela caracterização molecular ou o “fingerprinting” de genótipos tende a crescer nos próximos anos no Brasil, especialmente em decorrência da Lei de Proteção de Cultivares. Devido a necessidade de técnicas padronizadas e técnicos treinados para conduzir a caracterização molecular, é provável que a maioria dos programas e empresas de melhoramento de plantas do país busquem a contratação do serviço de laboratórios especializados. Vários desses laboratórios já existem em instituições públicas e privadas no Brasil e poderão satisfazer essa demanda. O importante, contudo, é que sejam estabelecidos padrões mínimos para condução das análises laboratoriais para cada espécie e tipo de marcador utilizado. O ideal seria que para a mesma espécie e marcador em questão, esses padrões fossem nacionais. Na impossibilidade disto ocorrer, haverá necessidade do “fingerprint” de uma cultivar vir acompanhado dos procedimentos utilizados na sua determinação.

Além de obter a caracterização de cultivares, os programas de melhoramento que adotarem o uso de descritores de DNA serão beneficiados com informações adicionais sobre o nível de diversidade e a constituição genética do germoplasma existente.

Referências bibliográficas

- AUTRIQUE, E.; NACHIT, M.M., MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. *Crop Sci.*, 36:735-742.
- BAYLE, D.C. 1983. Isozymic variation and plant breeders rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. pp.425-440. Elsevier, Amsterdam.
- CAO, D.; OARD, J.H. 1997. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. *Crop Sci.*, 37:1630-1635.
- DRAPER, S.R. 1987. ISTA variety committee report of the working group of biochemical tests for cultivar identification. *Seed Sci. Technol.* 15:328-338
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220p.
- GEBHARDT, C.; BLOMENDAHL, C.; SCHACHTSCHABEL, U.; DEBENER, T.; SALAMINI, F.; RITTER, E. 1989. Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. *Theor. Appl. Genet.* 78:16-22.
- HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 95:400-407.

- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 316:76-79.
- LEE, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, 55:265-343.
- LEE, M.; RUSSELL, W.A.; MELCHINGER, A.E.; WOODMAN, W.L. 1990. On the origin of the inbred line B52. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 64:21.
- MACKILL, D.J. 1995. Classifying *japonica* rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci.*, 35:889-894.
- MILACH, S.C.K.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L. 1997. Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. *Theor. Appl. Genet.*, 95:783-790.
- MILACH, S.C.K. 1998a. Marcadores de DNA em plantas. UFRGS, Porto Alegre, 141 p.
- MILACH, S.C.K. 1998b. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: Borém, Giudice, Sakiyama, Sedyama, Moreira, Portugal (eds.) *Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária*. Viçosa, 182p.
- NYBOM, H.; ROGSTAD, S.H.; SCHAAL, B.A. 1990. Genetic variation detected by use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). *Theor. Appl. Genet.* 79:153-156.
- O'DONOUGHUE, L.S.; SOUZA, E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. 1994. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.*, 34:1251-1258.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85:985-993.
- PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M., TERZI, V. 1996. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. *J. Genet. Breed.*, 50:203-219.
- PENNER, G.A.; ZHENG, Y.; BAUM, B. 1998. Identification of DNA fingerprints for two-row barley cultivars registered in Canada. *Genome*. No Prelo.
- PRABHU, R.R.; WEBB, D.; JESSEN, H.; LUK, S.; SMITH, S.; GRESSHOFF, P.M. 1997. Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and Pedigree. *Crop Sci.*, 37:1590-1595.
- SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*, 47:85-140.
- TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.*, 85:976-984.
- ZHOU, Z.; GUSTAFSON, J.P. 1995. Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 91:481-488.