

Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações



ORGANIZADORAS

Andreia Carina Turchetto-Zolet

Caroline Turchetto

Camila Martini Zanella

Gisele Passaia



Sociedade
Brasileira de
Genética

© 2017

Todos os direitos desta edição são reservados à Sociedade Brasileira de Genética.

Comissão Editorial Sociedade Brasileira de Genética

Editor

Tiago Campos Pereira
Universidade de São Paulo

Comissão Editorial

Carlos Frederico Martins Menck
Universidade de São Paulo

Louis Bernard Klaczko
Universidade Estadual de Campinas

Marcio de Castro Silva-Filho
Universidade de São Paulo

Maria Cátira Bortolini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Marcelo dos Santos Guerra Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Pedro Manoel Galetti Junior
Universidade Federal de São Carlos

Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). –
Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
181 p.

ISBN 978-85-89265-26-3

1. DNA. 2. Biologia molecular. 3. Genética. I. Turchetto-Zolet, Andreia Carina; Turchetto, Caroline; Zanella, Camila Martini; Passaia, Gisele, orgs.



Rua Cap. Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 - Ribeirão Preto - SP
16 3621-8540 | 16 3621-3552

Capítulo 1

Marcadores genéticos baseados em DNA

Dra. Caroline Turchetto, Prof^ª. Dra. Andreia Carina Turchetto-Zolet,

Dra. Gisele Passaia, Dra. Camila Martini Zanella

Um marcador genético é qualquer caráter visível ou um fenótipo que de alguma forma seja analisável, para o qual os alelos em *loci* individuais segregam de uma maneira mendeliana, tais como as características visíveis das ervilhas estudadas por Mendel. Os marcadores genéticos morfológicos foram os primeiros utilizados, e são ainda hoje, a base do melhoramento genético convencional, em que características desejáveis são selecionadas nos genitores para os cruzamentos. Os marcadores genéticos bioquímicos, tais como os terpenos e as isoenzimas, foram marcadores genéticos utilizados antes do surgimento dos marcadores moleculares. Esses marcadores bioquímicos foram aplicados a uma série de estudos. As primeiras moléculas a serem utilizadas como marcadores genéticos bioquímicos foram metabólitos secundários tais como antocianinas e compostos fenólicos, usados para distinguir entre diferentes variedades de plantas (Grover e Sharma, 2014). Marcadores enzimáticos (Alozimas) tiveram grande importância, apesar de apresentarem baixo grau de polimorfismo, tendo sido utilizados por um curto período de tempo, quando passaram a ser substituídos por marcadores de DNA capazes de detectar uma maior variabilidade entre indivíduos.

Polimorfismos de DNA surgem como resultado de uma variação (mutação) e são geralmente referidos pelo tipo de mutação que os criou. O desenvolvimento e uso de marcadores moleculares para a detecção e exploração desses polimorfismos do DNA é um dos avanços mais significativos no campo da genética molecular. Isto se deve ao fato de que a utilização de marcadores localizados no DNA fornece um número praticamente ilimitado de informação distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma. Por isso, os marcadores moleculares são altamente valorizados em diversas áreas que envolvem genética, biologia molecular e biotecnologia, tais como genética de populações, filogeografia, filogenia molecular, mapeamento genético, diagnósticos de doenças genéticas, testes de paternidade e para quem investiga as relações entre genótipo e fenótipo.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, a manipulação do DNA em laboratório tornou-se uma técnica recorrente. No início dos anos 1980, o uso de marcadores moleculares passou a integrar rotineiramente a análise do DNA das mais diversas espécies. Desde então, eles vêm sendo aperfeiçoados e evoluindo juntamente com os avanços nas técnicas de sequenciamento em larga escala (Figura 1.1). A presença de vários tipos de marcadores moleculares e diferenças nos seus princípios, metodologias e aplicações requerem uma consideração cuidadosa na escolha de um ou mais desses métodos de acordo com a aplicação, bem como com os recursos (técnico, financeiro, equipamentos) disponíveis em cada centro de pesquisa.

Os marcadores de DNA são divididos em três categorias principais: os baseados em hibridização, os baseados em PCR (Reação em cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*) e por fim, marcadores baseados em sequenciamento. Os marcadores também podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominantes e codominantes. Os marcadores codominantes possibilitam diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que não é possível com marcadores dominantes, para os

quais apenas é possível identificar a presença ou ausência de um determinado alelo. Esta característica é bem importante dependendo do objetivo do estudo; por exemplo, não é possível realizar análise de paternidade com marcador dominante.

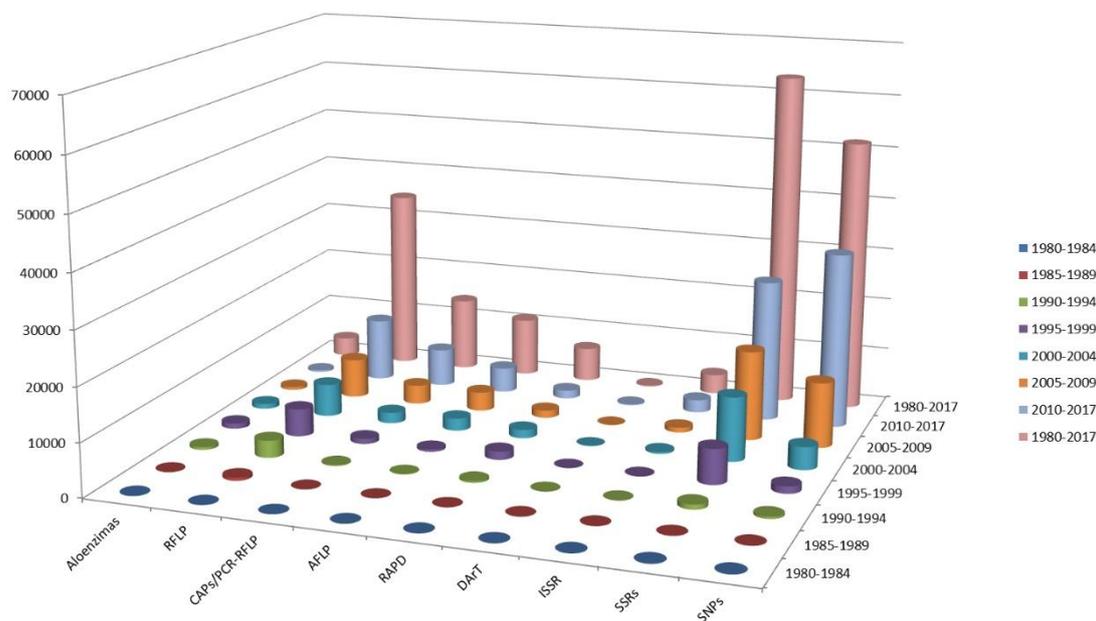


Figura 1.1 - Estimativa aproximada da popularidade dos marcadores moleculares nos últimos 37 anos. A construção deste gráfico foi baseada em dados obtidos através de buscas sistemáticas na base de dados da *Web of Science* usando como palavras chave o nome do marcador por extenso, sigla e o ano da publicação. Pesquisa realizada em Abril de 2017.

As técnicas de hibridização e PCR contribuíram para os avanços nos marcadores genéticos de DNA. O sistema de marcador genético baseado em hibridização é embasado na propriedade de pareamento de bases complementares. Este sistema permitiu o desenvolvimento de métodos que utilizam pequenos fragmentos de DNA como sondas para revelar polimorfismos apenas nas sequências homólogas à esta sonda. Um sistema de marcador genético derivado desta abordagem é a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Botstein et al., 1980) que foi o primeiro marcador genético baseado em DNA desenvolvido. Uma breve descrição do procedimento RFLP é mostrada no Capítulo 3. O polimorfismo deste marcador é baseado nos diferentes tamanhos de fragmentos gerados por enzimas de restrição. Este marcador foi utilizado para a construção do primeiro mapa molecular em humanos em 1980 (Botstein et al., 1980). Por ser codominante e identificar um *locus* específico, este tipo de marcador é informativo e capaz de discriminar genótipos individuais (Gebhardt et al., 1989). Este marcador foi e ainda hoje é utilizado em diferentes abordagens de estudo, tais como mapeamento genômico em plantas, marcação gênica, dinâmica populacional e relacionamento taxonômico (Figura 1.1), (Bonierbale et al., 1988; Yoshimura et al., 1992; Raybould et al., 1996; Jena e Kochert, 1991; Liu et al., 2016). Além disso, esta técnica foi também utilizada como base para a identificação e

isolamento de regiões repetitivas, tais como os microssatélites (por exemplo, Ali et al. 1986; ver Capítulo 6). Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações, como a necessidade de grandes quantidades de DNA (5-20 microgramas); o fato de espécies relacionadas e/ou indivíduos da mesma espécie poderem apresentar os mesmos alelos; o uso de radioatividade ou outras técnicas de coloração, além de tratar-se de uma abordagem intensiva em relação a trabalho e tempo, fatores estes que contribuíram para, em muitas aplicações, a escolha por outro tipo de marcador molecular. Entretanto, embora hoje em dia a utilização da técnica original do RFLP seja menor em comparação com outras classes de marcadores baseadas em PCR, ela foi a base de vários avanços subsequentes de marcadores relacionados (Chambers et al., 2014), como os CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), os quais também são chamados de marcadores PCR-RFLP, utilizados com frequência para uma detecção rápida de polimorfismos em sequências conhecidas (Figura 1.1), como detalhado no Capítulo 3.

Diferentes técnicas para a análise de marcadores de DNA foram desenvolvidas a partir do surgimento da PCR, permitindo a amplificação de uma grande quantidade de uma sequência específica de DNA sem necessidade de clonagem, começando com apenas algumas moléculas da sequência alvo. Uma vantagem dos métodos de marcadores baseados em PCR sobre os métodos de marcadores baseados em hibridização é que o último requer o isolamento de grandes quantidades de DNA. Entre os marcadores baseados em PCR, podemos citar, por exemplo: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

A técnica de RAPD foi descrita em 1990 independentemente por dois grupos de pesquisa (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Marcadores RAPD foram os primeiros marcadores desenvolvidos baseados em PCR. Nesta técnica é utilizado um único *primer* de geralmente 10 bases de uma sequência arbitrária com 60% ou mais de conteúdo GC. A amplificação ocorre quando o sítio do *primer* (iniciador ou oligonucleotídeo) está presente no DNA alvo em orientação oposta dentro de aproximadamente 2000 bases. Assim, a correspondência entre os fragmentos amplificados de diferentes espécies pelos mesmos iniciadores RAPD é natural (Rieseberg, 1996). Os polimorfismos RAPD resultam da variação da sequência nos locais de anelamento do *primer* e/ou variação de comprimento na sequência alvo situada entre os locais de ligação do *primer*. O RAPD é uma técnica não radioativa que requer uma pequena quantidade de DNA (15-25 ng), a maior vantagem desta técnica em relação a técnica de RFLP, e pode ser realizada em poucas horas. Outra vantagem é o grande número de marcadores obtidos distribuídos ao longo do genoma. Entretanto, o uso deste marcador é limitante por diversas características, como, por exemplo, o aparecimento de bandas não parentais na progênie restringindo o uso para mapeamento molecular (Riedy et al., 1992). Além disso, esse marcador se comporta como marcador dominante e apresenta baixa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios e experimentos, principalmente associados ao uso de baixa temperatura de anelamento, que pode resultar em uma baixa especificidade ou até no não anelamento do *primer*. Pode ser influenciado, por exemplo, pela utilização de diferentes reagentes, incluindo *Taq* DNA polimerases, ou diferenças na qualidade do DNA (Schierwater e Ender, 1993; Skroch e Nienhuis, 1995).

Outra técnica descrita por Meyer et al. (1993), a qual essencialmente combina os benefícios do RAPD (grande número de marcadores obtidos distribuído sobre o genoma), aliados ao aumento na reprodutibilidade e especificidade, são os marcadores ISSR (*Inter-simple sequence repeats*). ISSR é uma técnica baseada em SSR em que a amplificação é realizada com um único *primer* consistindo de várias repetições (motivo

de SSR) e ancorado geralmente com 2 a 4 nucleotídeos arbitrários. A reprodutibilidade decorre do fato de serem utilizados *primers* mais longos para amplificação por PCR em comparação com RAPD, e a utilização de temperatura de anelamento mais altas na PCR. Como no caso dos RAPDs, praticamente nenhum conhecimento prévio de sequência alvo é necessária para os ISSRs, podendo assim ser aplicados com facilidade em espécies não-modelos. A ancoragem de sequências de iniciadores com sequências não repetidas garante que a amplificação seja iniciada na mesma posição de nucleotídeo em cada ciclo (Zietkiewicz et al., 1994). As amplificações são visualizadas em gel de agarose ou poliacrilamida. A principal vantagem deste método é o fato de que este tipo de marcador não requer etapas demoradas e caras, apesar do fato de os ISSRs apresentarem herança dominante. Este marcador ainda é utilizado atualmente em estudos principalmente de descrição de diversidade genética, como, por exemplo, genótipos de milho (Muhammad et al., 2017), genótipos de banana (Silva et al., 2017), *Campomanesia phaea*, espécie nativa da floresta Atlântica (Santos et al., 2016), entre outros (Figura 1.1).

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) são resultado da combinação entre as técnicas utilizadas nos marcadores tipo RFLP e RAPD, onde enzimas de restrição e amplificação por PCR são as bases da técnica. AFLP baseia-se na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição gerados por enzimas de restrição específicas (geralmente uma de corte raro e uma de corte frequente) e ligados a adaptadores oligonucleotídicos (Vos et al., 1995; ver Capítulo 4). Assim como marcador RAPD, AFLP também estão distribuídas ao longo do genoma e, assim, são adequados para a construção de mapas de ligação genética (Becker et al., 1995); contudo apresentando uma maior reprodutibilidade que os RAPDs (Savelkoul et al., 1999), tornando-os mais confiáveis para estudos de genética de populações, por exemplo. Por outro lado, marcadores AFLPs mostram uma herança dominante, sendo genotipados pela presença ou ausência das bandas/alelos. Essa técnica é ainda relativamente cara, requer intenso trabalho e conhecimento técnico. AFLP tem sido uma técnica popular para estudos de genética de populações e diversidade, bem como em estudos ecológicos e evolutivos. Um considerável número de técnicas variantes do AFLP tem sido reportado na literatura, utilizando modificação no protocolo de clivagem por enzimas de restrição. Um exemplo é a técnica descrita por Suazo e Hall (1999), em que uma única enzima de corte raro é utilizada na mesma etapa de ligação de adaptadores. Além disso, a técnica de AFLP foi base para descrição de metodologias de isolamento de outros marcadores, como por exemplo, os microssatélites (ver Capítulo 6) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) por meio do sequenciamento dos fragmentos em plataformas de sequenciamento de alto rendimento (técnica denominada de RAD-seq; ver Capítulo 4).

Marcadores do tipo microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*) foram desenvolvidos pela primeira vez para uso em mapeamento genético em humanos (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989) e desde então vêm sendo amplamente utilizados em diversas áreas da ciência (Figura 1.1). Este tipo de marcador é baseado na amplificação por PCR de regiões específicas do genoma utilizando um par de *primers locus* específico. Os microssatélites são abundantes no genoma, fáceis de automatizar, codominantes, multialélicos, robustos e reprodutíveis. Os padrões de polimorfismo exibidos pelos SSR são maiores do que qualquer outro sistema de marcador contemporâneo. O método de bibliotecas enriquecidas para busca por SSR tem sido o mais popular, sendo que diferentes métodos de enriquecimento foram descritos. Outros procedimentos alternativos para identificação de SSR foram relatados baseado na

técnica de AFLP e RAPD (Zane et al., 2002), como mencionado acima. Inicialmente as sequências das bibliotecas eram determinadas pelo método de Sanger para posterior identificação de motivos de SSR nessas sequências e a possibilidade de projeção de *primers* nas regiões flanqueadoras, requerendo um considerável investimento para o desenvolvimento. Microssatélites têm sido um dos marcadores mais beneficiados com os avanços em técnicas de sequenciamento em larga escala. Com a disponibilidade de dados de sequências em domínio público, a identificação de motivos de SSR a partir de dados genômicos, de sequências de unigenes e de sequências alvos expressas (EST - *Expressed Sequence Tags*) utilizando ferramentas de bioinformática tornou-se uma abordagem extremamente atrativa e conhecida (Sharma et al., 2007). A popularidade dessa abordagem levou ao desenvolvimento de um número de *softwares* para identificação dos motivos de SSR, bem como prever o potencial polimórfico dos microssatélites identificados. Para organismos não-modelos, foram também reportadas tentativas generalizadas de transferabilidade de marcadores de espécies taxonomicamente relacionadas. O advento da NGS (*Next Generation Sequencing* ou Sequenciamento de Nova Geração) simplificou muito o processo de isolamento de microssatélites, facilitando o desenvolvimento de alto rendimento de marcadores mesmo em espécies não-modelo em curto espaço de tempo e bom custo-benefício (Csencics et al., 2010). Por exemplo, um estudo completo utilizando NGS pode revelar 100.000 *loci* de microssatélites em um genoma eucariótico (Abdelkrim et al., 2009) (ver Capítulo 6).

A identificação de uma sequência genômica específica analisada dentre vários indivíduos provê valiosa informação genética, pois fornece a completa informação da região investigada e a possibilidade de utilização de modelos evolutivos de mutação para as sequências analisadas. Apesar de não ser um marcador no sentido estrito, a análise da sequência de DNA também deve ser incluída nesta discussão devido a longa história de utilização em genética populacional e ainda tem sido a base para inferências filogeográficas e filogenéticas. Embora este método tenha sido inicialmente demorado e dispendioso, avanços recentes na tecnologia de sequenciamento permitem a análise de sequências de muitas regiões de DNA para muitos indivíduos (ver Capítulo 5).

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) são polimorfismos específicos a diferenças em uma única posição no genoma, um único nucleotídeo (substituição, deleção ou inserção). A maioria dos SNPs ocorre em regiões não codificadoras do genoma, um importante subconjunto corresponde a mutações em genes que estão associados a doenças ou outros fenótipos. A principal vantagem dos SNPs é o seu elevado potencial para uma análise automatizada de alto rendimento a custo moderado. O avanço nas plataformas de sequenciamento de alto rendimento tem contribuído para a descoberta de grande número de SNPs revolucionando projetos de avaliação da diversidade genética bem como estudos de associação genômica nos últimos anos (Figura 1.1). Outra possibilidade, muito importante para estudos com espécies não-modelo em que não se tem um genoma de referência disponível, é a identificação e genotipagem de SNP em um único passo, que pode ser combinado com a construção de uma biblioteca de representação genômica reduzida por meio da utilização de vários métodos disponíveis, como o sequenciamento em plataformas de alto rendimento (ver Capítulo 8).

Os marcadores tipo DArT (*Diversity arrays technology*) são baseados em hibridização para genotipar centenas de *loci* num único ensaio (Jaccoud et al., 2001) (Capítulo 7). Marcadores do tipo DArT geram impressões digitais de genoma marcando a presença versus ausência de fragmentos de DNA. Embora não muito popular comparado a outros marcadores (Figura 1.1), nos últimos anos, o DArT assumiu o

status de marcador altamente confiável, robusto e útil para a análise da diversidade genética, bem como o mapeamento genético usando estudos de ligação ou associação em uma variedade de culturas como o *Eucalyptus* (Sansaloni et al., 2010), trigo (Orabi et al., 2014), cevada (Lex et al., 2014), cenoura (Grzebellus et al., 2014), cana-de-açúcar (Aitken et al., 2014). A implementação das tecnologias de NGS ao método original de DArT, denominado DArTseq tem se demonstrado bastante eficiente e atualmente vem sendo utilizado em programas de melhoramento genético, como por exemplo, associação de características agronômicas em trigo (Mwadzingen et al., 2017).

Cada uma das tecnologias de marcadores moleculares tem suas vantagens e algumas limitações (Tabela 1.1). A escolha do marcador molecular depende tipicamente das questões biológicas que são abordadas, da quantidade de DNA disponível para o experimento, dos conhecimentos técnicos do investigador, das considerações monetárias e do equipamento disponível no laboratório. Além disso, uma série de outros fatores relacionados com o organismo alvo e a sua complexidade do genoma também desempenham um papel importante na seleção do marcador ou tecnologia a ser utilizada. Da mesma forma, a escolha do marcador deve ser adequada para atender os objetivos do estudo em questão.

Os marcadores moleculares proporcionaram ferramentas importantes para discriminar entre alelos. Em termos de genética clássica, as diferenças visíveis ou detectáveis no fenótipo são alelos. Em termos de genética molecular, diferentes sequências de DNA são denominadas alelos, que eventualmente também podem criar diferenças fenotípicas. Mesmo que os alelos detectados no nível do DNA não causem necessariamente variações fenotípicas, eles podem estar ligados a tais fenômenos.

O sequenciamento em plataformas de alto rendimento foi um marco importante e fundamental para a geração de dados moleculares de forma mais barata, rápida e em larga escala (ver Capítulo 2 para uma revisão). A partir de 2005 as tecnologias de sequenciamento em larga escala passaram a ser comercializadas e sua utilização para a identificação de marcadores moleculares em escala genômica passou a ser implementado rotineiramente no mundo todo. Essas tecnologias de sequenciamento de DNA permitem a triagem de *loci* múltiplos em muitos indivíduos simultaneamente. Estes métodos oferecem a vantagem de gerar informação explícita a partir de uma determinada região genômica levando frequentemente ao desenvolvimento simultâneo de milhares de marcadores adequados para a ampla gama de estudos.

Tabela 1.1. Comparações de diferentes marcadores moleculares em relação a algumas vantagens e limitações relacionadas a cada um deles.

Marcador	Vantagens	Limitações
RAPDs e derivados	<ul style="list-style-type: none"> • Produz um grande número de bandas que podem então ser usadas para caracterização individual; • Técnica simples e rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa reprodutibilidade; • Principalmente dominante; • Difícil de analisar; • Comparações entre estudos é difícil.
CAPS	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida identificação de genótipo fenótipo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecimento prévio da sequência.
AFLPs	<ul style="list-style-type: none"> • Grande número de marcadores por reação; • Alta reprodutibilidade; 	<ul style="list-style-type: none"> • Marcador do tipo Dominante (não identifica indivíduos

	<ul style="list-style-type: none"> • Rapidez; • Não há necessidade de conhecimento prévio do genoma. 	<ul style="list-style-type: none"> • homozigotos e/ou heterozigotos); • Homoplasia de tamanho das bandas geradas.
Microssatélites (SSR)	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente informativo (multialélico); • Fácil de isolar; • Codominante; • Alta reprodutibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Complexo comportamento mutacional; • Alelos nulos; • Comparações entre estudos requer preparação especial; • Espécie-específico.
SNPs	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa taxa de mutação; • Altamente abundante; • Novas abordagens analíticas estão sendo desenvolvidas atualmente; • Fácil comparação entre estudos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Substancial heterogeneidade da taxa entre sítios; • Baixo conteúdo informativo para um único SNP.
DArT	<ul style="list-style-type: none"> • Alta reprodutibilidade; • Alta acurácia; • Não há necessidade de conhecimento prévio do genoma; • Análises em paralelo; • Flexibilidade na aplicação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Essencialmente dominante.

Referências Bibliográficas

- Abdelkrim J, Robertson B, Stanton JA, Gemmell N (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genome sequencing. *Biotechniques* 46: 185–92.
- Aitken KS, McNeil MD, Hermann S, et al. (2014). A comprehensive genetic map of sugarcane that provides enhanced map coverage and integrates high-throughput Diversity Array Technology (DArT) markers. *BMC Genomics* 15: 152.
- Ali S, Muller CR, Epplen JT (1986) DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum Genet* 74: 239–43.
- Becker J, Heun M (1995) Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley. *Genome* 38: 991–8.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveals models of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095–103.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314–31.
- Chambers GK, Curtis C, Millar CD, et al. (2014) DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. *Investig Genet* 5: 3.

- Csencsics D, Brodbeck S, Holderegger R (2010) Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *J Heredity* 101: 789–93.
- Gebhardt C, Ritter E, Debener T, et al. (1989) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* 78: 65–75.
- Grzebellus D, Iorizzo M, Senalik D, et al. (2014). Diversity, genetic mapping, and signatures of domestication in the carrot (*Daucus carota* L.) genome, as revealed by Diversity Arrays Technology (DArT) markers. *Mol Breed* 33: 625–37.
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29: e25.
- Jena KK, Kochert G (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L. *Plant Mol Biol* 16: 837–9.
- Lex J, Ahlemeyer J, Friedt W, Ordon F (2014). Genome-wide association studies of agronomic and quality traits in a set of German winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using Diversity Arrays Technology. *J Appl Genet* 55: 295–305.
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397–401.
- Liu Z, Furnier GR (1993) Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor Appl Genet* 87: 97–105.
- Liu WL, Shih HC, Weng IS, et al. (2016) Characterization of Genomic Inheritance of Intergeneric Hybrids between *Ascocenda* and *Phalaenopsis* Cultivars by GISH, PCR-RFLP and RFLP. *PLoS One* 11(4): e0153512.
- Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 31: 2274–80.
- Mir RR, Hiremath PJ, Riera-Lizarazu O, Varshney RK (2013) *Evolving Molecular Marker Technologies in Plants: From RFLPs to GBS*. In Lübberstedt T, Varshney RK (Editors). *Diagnostics in Plant Breeding*. Springer: New York. Pp. 229-247.
- Muhammad RW, Qayyum A, Ahmad MQ, et al. (2017) Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequences repeats. *Genetic and Molecular Resources* 16 (1).
- Mwadingeni L, Shimelis H, Rees DJG, Tsilo TJ (2017) Genome-wide association analysis of agronomic traits in wheat under drought-stressed and non-stressed conditions. *Plos One* 12 (2): e0171692.
- Orabi J, Jahoor A, Backes G (2014) Changes in allelic frequency over time in European bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties revealed using DArT and SSR markers. *Euphytica* 197: 447–62.
- Raybould AF, Goudet J, Mago RJ, et al. (1996) Genetic structure of a linear population of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (sea beet) revealed by isozyme and RFLP analysis. *Heredity* 76: 111–17.
- Riedy MF, Hamilton III WJ, Aquadro CF (1992) Excess of non parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res* 20: 918.
- Rieseberg LH (1996). Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol* 5: 99–105.

- Sansaloni CP, Petroli CD, Carling J, et al. (2010). A high density diversity arrays technology (DArT) microarray for genome-wide genotyping in Eucalyptus. *Plant Methods* 6: 16.
- Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, et al. (1999) Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol* 37: 3083–91.
- Santos DN, Nunes CF, Setotaw TA, Pio R, Pasqual M, Cançado GM (2016) Molecular characterization and population structure study of cambuci: strategy for conservation and genetic improvement. *Genetic and Molecular Resources* 15(4).
- Schierwater B, Ender A (1993) Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res* 19: 4647–8.
- Sharma PC, Grover A, Kahl G (2007) Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends Biotechnol* 25: 490–8.
- Silva AV, Nascimento AL, Vitória MF, Rabbani AR, Soares AN, Lédo AS (2017) Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Genetic and Molecular Resources* (16 (1)).
- Skroch P, Neinhuis J (1995). Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet* 91: 1086–91.
- Suazo A, Hall HG (1999) Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *BioTechniques* 26: 704–9.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23, 4407–14.
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388—396.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24): 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. (1990) DNA polymorphisms *amplified* by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531–5.
- Yoshimura S, Yoshimura A, Saito A, et al. (1992) RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogenic lines of rice for bacterial blight resistance genes, Xa-1, Xa-3 and Xa-4. *Jpn J Genet* 67: 29–37.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11: 1–16.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–83.