SELEÇÃO GENÔMICA AMPLA (GWS) E ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA (GWAS) NO MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS: ABORDAGEM CONCEITUAL, GENÉTICA QUANTITATIVA E APLICAÇÕES

Daniela Popim Miqueloni[1], Rosangela Maria Simeão[2], Giselle Mariano Lessa de Assis[3]

[1]Doutora em Agronomia (Produção Vegetal), Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brasil. Email: danimique@yahoo.com.br
[2]Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Corte, Campo Grande MS, Brasil.
[3]Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brasil.

Recebido em: 04/10/2019 – Aprovado em: 30/11/2019 – Publicado em: 15/12/2019
DOI: 10.18677/EnciBio_2019B52

RESUMO

Atualmente, desenvolvimento da tecnologia de análise genômica de alta resolução e alto rendimento tem a capacidade de gerar informações sobre milhões de pares de bases em um único ensaio, permitindo a detecção de variação em um único nucleotídeo de uma sequência de DNA. Este contexto possibilitou o surgimento de novas abordagens para a seleção assistida por marcadores, dentre elas os estudos de associação genômica ampla (GWAS), que visam o mapeamento genético por meio das associações entre os locos e a característica fenotípica na população e buscam detectar efeitos dos genes sobre os valores genéticos dos indivíduos; e a seleção genômica ampla (GWS), que detecta genótipos favoráveis por meio de informações genotípicas para inferir sobre os valores fenotípicos futuros, ou valores genômicos. Estas técnicas têm sido exploradas por meio de estudos de simulação e aplicação nos programas de melhoramento tradicionais para diversas culturas. Por outro lado, sua aplicação no melhoramento de forrageiras é restrita, especialmente no Brasil, porém com resultados promissores. Neste contexto, este estudo traz uma abordagem conceitual do tema sob a visão da genética quantitativa, buscando evidenciar sua aplicação no melhoramento genético de forrageiras.
PALAVRAS-CHAVE: espécies forrageiras, mapeamento genético, marcadores moleculares.

GENOMIC-WIDE SELECTION (GWS) AND GENOMIC-WIDE ASSOCIATION STUDY (GWAS) IN FORAGE BREEDING: CONCEPTUAL APPROACH, QUANTITATIVE GENETICS AND APPLICATIONS

ABSTRACT

The development of high-resolution and high-throughput genomic analysis technology now is enable to generate information about millions of base pairs in only one test, allowing detection of single nucleotide variation in a DNA sequence. This context enabled the emergence of new approaches to marker-assisted selection, among them the Genome-Wide Association Studies (GWAS), which aim at genetic mapping through associations between loci and phenotypic characteristics in the population and seek to detect effects of genes on the genetic values of individuals;

and Genome-Wide Selection (GWS), which detects favorable genotypes through genotypic information to infer future phenotypic values, or genomic values. These techniques have been explored through simulation studies and application in traditional breeding programs in various cultures. On the other hand, its application in forages breeding is restricted, especially in Brazil, but with promising results. In this context, this study brings a conceptual approach of the subject from the perspective of quantitative genetics, seeking to highlight its application in the forages breeding.
KEYWORDS: forage species, genetic mapping, molecular markers.

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético vem sendo utilizado na agricultura de forma empírica desde a antiguidade por meio da domesticação e seleção. Na idade contemporânea, os estudos de Mendel no final século XIX trouxeram as bases genéticas para as técnicas modernas de melhoramento de plantas e animais e, a partir dos anos de 1950, as pesquisas sobre a natureza, função e regulação do gene contribuíram para o desenvolvimento da genética molecular.

Essa evolução tecnológica trouxe grandes avanços para a área, sendo, de fato, um dos mais importantes, uma vez que o desenvolvimento de cultivares oriundas de melhoramento genético foi responsável por mais da metade dos aumentos na produtividade das culturas ao longo do século passado (RAMALHO et al., 2012; BORÉM et al., 2014).

De forma geral, um programa de melhoramento genético, embora efetivo, é relativamente lento, pois tradicionalmente baseia-se em caracteres fenotípicos e inúmeros ciclos de recombinação, avaliação e seleção. Com a evolução da genética molecular houve o avanço no conhecimento da biologia dos organismos e, como consequência, uma série de métodos surgiram para auxiliar no melhoramento, que até a década de 1960 era realizado por características morfológicas de menor interesse agrícola (SOUZA, 2001).

O estudo de cada genótipo e a obtenção de informações sobre variabilidade, identificação e localização de genes específicos e suas associações com características fenotípicas foi possibilitado pelo desenvolvimento dos marcadores moleculares, que pela análise do genoma permite inúmeras aplicações no melhoramento de plantas de forma rápida por não necessitar de sucessivas gerações e independer do estádio fenológico (RESENDE, 2008).

Neste sentido, o uso dos marcadores moleculares trouxe a possibilidade do desenvolvimento de técnicas que melhoram o entendimento das bases genéticas de diversas características complexas, como a associação genômica ampla (*Genome-Wide Association Studies* – GWAS), que identifica as variações no genoma e as associa com o fenótipo de interesse por meio de testes de hipótese, auxiliando na construção de mapas genéticos.

Outras técnicas são os métodos de seleção baseado em marcadores, que oferecem alta eficiência e rapidez nos ganhos genéticos, como a seleção genômica ampla (*Genome-Wide Selection* – GWS) proposta por Meuwissen et al. (2001), que difere da seleção assistida por marcadores (*Molecular Marker Assisted Selection* - MAS) por não necessitar de conhecimento prévio das posições das características quantitativas (*Quantitative Trait Loci* – QTL) e considerar o genoma como um todo na estimação dos efeitos genéticos (RESENDE, 2008; SAGURTHI et al., 2015).

A aplicação da GWS em plantas perenes e espécies de propagação vegetativa traz diversas vantagens, como aumento da acurácia e redução do tempo requerido para um ciclo completo de seleção devido ao uso da matriz de parentesco

para cada característica, o que permite explorar toda a variação genética populacional (RESENDE et al., 2014a).

No Brasil, esta técnica começou a ser aplicada recentemente com sucesso em culturas anuais e perenes (CASTRO et al., 2016; LIMA et al., 2019; RESENDE et al., 2012a; VIANA et al., 2016). Em espécies forrageiras, apesar do uso da pastagem como principal componente das dietas de ruminantes, poucos estudos nacionais trazem tal abordagem, apontando, porém, para seu grande potencial (PEREIRA et al., 2018).

FUNDAMENTOS DA GWS E GWAS

Segundo Resende et al. (2012b), a aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento genético se divide em duas linhas: *detecção* de marcadores associados a características quantitativas (QTL) e seu *mapeamento* baseado em análise e desequilíbrio de ligação, chamado de estudos de associação genômica ampla (GWAS); e o *uso* desses marcadores nos programas de seleção genética, pela seleção assistida por marcadores moleculares (MAS) e seleção genômica ou seleção genômica ampla (GWS).

A GWS surgiu no início dos anos 2000 como uma nova abordagem para a MAS, selecionando indivíduos favoráveis por seus valores genéticos genômicos preditos, fundamentada, como a GWAS, na ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os marcadores e os locos que governam os QTLs da população estudada (MEUWISSEN et al., 2001; RESENDE, 2008). Já os estudos de GWAS, também utilizados na MAS, procuram associações entre os locos e a característica fenotípica na população e buscam detectar efeitos dos genes com significância estatística sobre os valores genéticos dos indivíduos (RESENDE et al., 2014a).

Breve retrospecto

Os caracteres de segregação contínua, isto é, com muitos fenótipos intermediários entre os tipos extremos, ao contrário das características analisadas por Mendel, não obedecem à lei da segregação independente e precisam ser estudados por métodos estatísticos. Esses caracteres, denominados quantitativos ou QTLs, termo cunhado em 1975 por Geldermann, e ligados principalmente às características de interesse econômico, começaram a ser estudados por Galton e seus discípulos na Inglaterra no final do século XIX, que naquela época mostraram que tal variação era parcialmente herdável (ALLARD, 1971).

Na década de 1910, a “hipótese dos fatores múltiplos” foi proposta de forma independente por Nilsson-Ehle e East para explicar a herança dos caracteres de distribuição, ou herança, contínua, com base no fato de que uma característica é influenciada por um grande número de genes mendelianos, onde cada um contribui com um pequeno efeito para o fenótipo (RAMALHO et al., 2012).

A partir de então, descobertas ao longo dos anos, como a estrutura em dupla hélice do DNA por Watson e Crick na década de 1950, as enzimas de restrição na década de 1970 por Boyer, a transgenia e os marcadores moleculares na década seguinte, permitiram o avanço do conhecimento da genética até os dias atuais, como as ciências e tecnologias “ômicas”, genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, e a bioinformática (BORÉM et al., 2014; FALEIRO et al., 2011).

Atualmente, com a ampliação das possibilidades para o sequenciamento genômico, a tendência passa a ser a integração e aplicação desse conhecimento em outras áreas pela genômica translacional (KANG et al., 2016), que mantém as bases da genética quantitativa e de populações para seu desenvolvimento e aplicação.

Genética de populações

A frequência dos alelos e dos genótipos que compõem os diversos indivíduos de uma população forma a estrutura dessa população. Conhecer essa estrutura é fundamental para se realizar e, ou, predizer as mudanças em magnitude no sentido desejado, além de fornecer as bases para a compreensão de sua evolução por meio dos mecanismos da hereditariedade em nível populacional (CRUZ, 2005).

A frequência alélica corresponde às proporções dos diferentes alelos de um determinado gene e a frequência genotípica, às proporções dos genótipos para o gene em questão na população. A população é definida como a reunião de indivíduos com diversos genótipos e sistema de acasalamento definido, que formam descendentes em frequência proporcional à contribuição dos gametas dos genitores.

A população onde não há migração, mutação e seleção, resultando em frequência alélica, e consequentemente, genotípica constantes ao longo das gerações, é dita em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), fenômeno demonstrado de forma independente por Hardy e Weinberg em 1908 (RAMALHO et al., 2012).

Os processos que afetam as frequências gênicas, segundo Cruz (2005), podem ser sistemáticos (mutação, migração e seleção), conhecidos em magnitude e direção; e dispersivos (deriva genética e amostragem), que não possuem direção conhecida.

Resende (2008) define cada um em função das frequências alélicas e seu desequilíbrio de ligação (desvios entre as frequências esperadas e observadas):

- Mutação: fenômeno aleatório e raro que pode gerar na população a chamada carga genética, ou seja, alelos não neutros desfavoráveis, que reduzem o valor adaptativo dos indivíduos, ou pode atuar favoravelmente na manutenção da variabilidade, e, por consequência, para a resposta à seleção, desde que ocorra continuamente;
- Migração: juntamente com a diversidade alélica caracteriza o fluxo gênico entre populações, podendo atuar como um fator de aumento da variabilidade, o que contribui tanto para o melhoramento genético quanto para a conservação e que tende a desaparecer após algumas gerações;
- Seleção: altera os componentes de médias e variâncias dos valores genéticos e fenotípicos por desequilibrar as frequências gaméticas, reduzindo a covariância entre genitores, e promovendo endogamia e deriva genética. Nesse fenômeno, as frequências alélicas possuem efeito de menor dimensão por serem proporcionais ao número de alelos que afetam o caráter poligênico sob seleção;
- Deriva genética: processo dispersivo que ocorre em pequenas populações como consequência do reduzido número efetivo, ou seja, a quantidade de indivíduos que participa efetivamente do intercruzamento para geração de descendentes. Por outro lado, a amostragem também reduz o número efetivo, sendo causa, por tanto, da deriva genética. Segundo Resende (2008), as mudanças nas frequências alélicas causadas pela deriva podem ser preditas apenas em quantificação, pela variância das frequências, mas não em direção porque as alterações ocorridas são aleatórias devido à amostragem de gametas para a formação da nova geração.

Genética quantitativa

Os estudos das características quantitativas, e de QTLs, são realizados a partir do modelo básico $F = g + e$, onde F é o valor fenotípico medido nos indivíduos, g é o valor genotípico oriundo da ação do genótipo e e, a influência do meio. Devido ao atributo poligênico, os QTLs refletem o efeito ambiental de forma acentuada e para sua caracterização genética é necessário o uso de grandes populações e de parâmetros estatísticos.

O conhecimento da natureza da ação gênica (aditiva, dominante ou codominante) para a determinação da superioridade genética também é essencial (CRUZ, 2005; RESENDE et al., 2008). Dessa forma, a partir das características fenotípicas mensuradas, objetiva-se obter a parte devida aos efeitos genotípicos, ou seja, isolados da influência ambiental. Assim, após várias gerações, espera-se que a população resultante de seleção esteja homozigótica para todos os locos, exceto para os relacionados à característica de interesse, e, selecionando-se os homozigotos para o caráter em questão, a diferença dos caracteres quantitativos pode ser atribuída aos genes fortemente ligados a eles (ALLARD, 1971).

De forma geral, a seleção atua causando a alteração das frequências alélicas nos locos que controlam o caráter sob seleção. Esse processo leva à modificação da média genotípica da população na direção desejada e é baseado na predição do valor genético dos indivíduos e na sua seleção ou não.

O valor genético é obtido a partir das médias e componentes de variâncias oriundos das observações fenotípicas em uma população e pode ser desdobrado em uma parte herdável, chamada valor genético aditivo, devido ao efeito gamético dado pelo desvio da média da progênie, e outra não herdável, chamados desvios de dominância, referentes às interações entre alelos ou dentro do loco definidos em termos populacionais (CRUZ, 2005).

Assim, para as observações fenotípicas em um dado momento, tem-se o modelo geral: $F = \mu + a + d + e$, onde μ é a média geral, a é o efeito aditivo, d é o efeito de dominância e e o efeito ambiental. Outros parâmetros que orientam o processo de seleção e de melhoramento visando à produção futura, como herdabilidade, repetibilidade, correlações e ganho, são estimados pelos respectivos componentes de variância do modelo apresentado (CRUZ, 2005).

Os componentes de variância, por sua vez, podem ser estimados por vários métodos dentro de, principalmente, duas abordagens, a frequentista e a bayesiana (RESENDE et al., 2012b). Na primeira, três métodos de estimação são os mais comuns: momentos, funções quadráticas e função de verossimilhança.

Dentre os métodos derivados dos momentos estão ANOVA de Fisher e os métodos de Henderson (1953), onde os quadrados médios são igualados às respectivas esperanças matemáticas. Os estimadores quadráticos são o não viesado de norma mínima e o de variância mínima, MINQUE e MIVQUE, respectivamente, e o iterativo de norma mínima, I-MINQUE.

Os métodos de verossimilhança mais utilizados são o de máxima verossimilhança (ML), e máxima verossimilhança restrita (REML), que se baseiam na maximização do logaritmo da função densidade de probabilidade das observações e na maximização da função de verossimilhança independente de efeitos fixos e considerando seus graus de liberdade (RESENDE et al., 2012b).

A inferência bayesiana se fundamenta no conceito de probabilidade de um evento baseada nas ideias de Laplace. Considerando os conhecimentos anteriores, ou *a priori*, e posteriores, ou *a posteriori*, da ocorrência do evento, pode-se calcular a probabilidade de uma hipótese com base na probabilidade *a priori* e em novas informações adicionais, proporcionadas por experimentos (RESENDE, 2008). Assim, a inferência bayesiana procura medir o grau de incerteza sobre a ocorrência desse evento, utilizando o conhecimento da distribuição *a posteriori* dos parâmetros a serem estimados, ou seja, maximizando sua função de densidade de probabilidade ao invés da função de verossimilhança (RESENDE et al., 2012b).

Marcadores moleculares

De acordo com Souza (2001), qualquer forma alélica proveniente do genoma pode ser utilizada como marcador genético, podendo ser um fenótipo, uma proteína ou fragmento de DNA, que revela polimorfismos genéticos, ou seja, formas alélicas correspondentes ao mesmo loco, mas diferentes entre si. Por convenção, considera-se um loco polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum é menor que 99%, ou seja, pelo menos um indivíduo entre 100 possui um alelo distinto dos demais.

No contexto do melhoramento genético, os marcadores moleculares são importantes para o entendimento da domesticação, evolução e mecanismos genéticos que envolvem as características agronômicas de interesse (CAIXETA et al., 2014).

Os marcadores com base no DNA não sofrem qualquer influência ambiental ou gênica, ou seja, efeitos epistáticos ou pleiotrópicos, além de não serem limitados como os morfológicos e fornecerem maior quantidade de informação, uma vez que o nível de polimorfismo é alto para cada loco estudado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os marcadores, de modo geral, podem ser divididos de várias formas, como número de locos que podem detectar, graus de polimorfismo e características de dominância (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Caixeta et al. (2014) classificam os marcadores pelo método de análise: marcadores baseados em PCR; marcadores baseados na técnica de hibridização e marcadores baseados em sequenciamento.

Marcadores baseados em PCR - A tecnologia de reação da polimerase em cadeia, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida na década de 1980, trouxe inúmeros avanços para a biologia molecular. Sua técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de segmentos de DNA em presença da DNA polimerase e produz inúmeros ciclos de desnaturação do material genético; anelamento, com a hibridização do DNA com o *primer*; e extensão, que evolve a adição de nucleotídeos com base na sequência alvo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Inúmeros marcadores com base em PCR estão disponíveis para diversas culturas, entre eles:

- marcadores microssatélites, que variam de um a seis pares de bases e são amplamente distribuídos no material genético dos eucariotos;
- ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) ou repetição entre sequências simples, que é baseado em fragmentos de DNA entre duas regiões microssatélites idênticas;
- AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, que permite a análise simultânea de diferentes regiões do DNA aleatoriamente distribuídas no genoma;
- marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) ou região amplificada de sequência caracterizada, definida como um fragmento do DNA que foi identificado por PCR através de um par específico de *primers* (CAIXETA et al., 2014).

Marcadores baseados na técnica de hibridização - O primeiro marcador desenvolvido com base na hibridização de fragmentos com sequências homólogas de DNA foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados. Esse marcador foi usado inicialmente em 1975 e baseia-se na digestão do DNA com enzimas de restrição, separação dos fragmentos do DNA por eletroforese em gel de agarose com transferência dos fragmentos para membrana celulósica e detecção dos fragmentos com sonda de

sequência conhecida, uma técnica de alto custo e de difícil reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Marcadores baseados em sequenciamento - Marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*) ou tecnologia de arranjos de diversidade, podem ser usados para caracterizar milhões de polimorfismos de forma rápida, sendo derivados da construção de arranjos de DNA com um conjunto de diferentes genótipos, criados pela digestão de vários genótipos com enzimas de restrição, e pela hibridização com uma sonda de DNA extraída de um indivíduo, possui comportamento predominantemente dominante e alta reprodutibilidade (CAIXETA et al., 2014).

O sequenciamento de DNA consiste na determinação da ordem das bases de nucleotídeos: adenina, guanina, citosina e timina. Vários métodos de sequenciamento são utilizados atualmente, entre eles o método Sanger, que consiste na interrupção da sequência através da incorporação aleatória de um nucleotídeo modificado com corante fluorescente. Hoje, os sequenciamentos de nova geração e de segunda geração estão emergindo com capacidade de gerar informações sobre milhões de pares de bases em um único ensaio (VOSS-FELS; SNOWDON, 2016).

O SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), ou polimorfismo de nucleotídeo único é baseado na variação em um único nucleotídeo de uma sequência de DNA. De forma geral, ocorre em regiões de codificação ou com funções regulatórias do genoma e pode ser classificada como sinônima, sem alteração na função do aminoácido que codifica uma proteína; ou não sinônima, com alteração na função do aminoácido, e pode ser conservativa ou não conservativa (CAIXETA et al., 2014).

A escolha do tipo de marcador em pesquisas genéticas baseia-se no objetivo a ser alcançado, levando em consideração as características da espécie estudada, além do próprio marcador, como facilidade, reprodutibilidade, maior rapidez nos resultados e menores custos, assim como o conhecimento de sua base de atuação, vantagens e limitações e os tipos e quantidades disponíveis para a cultura de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; RAMALHO et al., 2012).

Segundo Souza (2001), as diferentes aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas podem ser classificadas em: análise da diversidade genética entre indivíduos, com vistas à identificação de genótipos de interesse específico, gestão de recursos genéticos e divisão de genótipos em grupos heteróticos; construção de mapas genéticos e mapeamento de características de interesse, quantitativas ou qualitativas; e seleção assistida por marcadores moleculares.

Mapas genéticos

A construção de mapas genéticos é considerada uma das ferramentas de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares, com amplas aplicações em análises filogenéticas e melhoramento, por meio dos estudos de sintenia (Figura 1), clonagem de genes e, principalmente, a localização de QTLs associados a caracteres de importância econômica (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). O mapeamento de QTLs permite conhecer o número e a localização no cromossomo de locos envolvidos na herança complexa, determinar sua ação gênica e a decomposição da interação genótipo x ambiente (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 2016; NAKAYA; ISOBE, 2012).

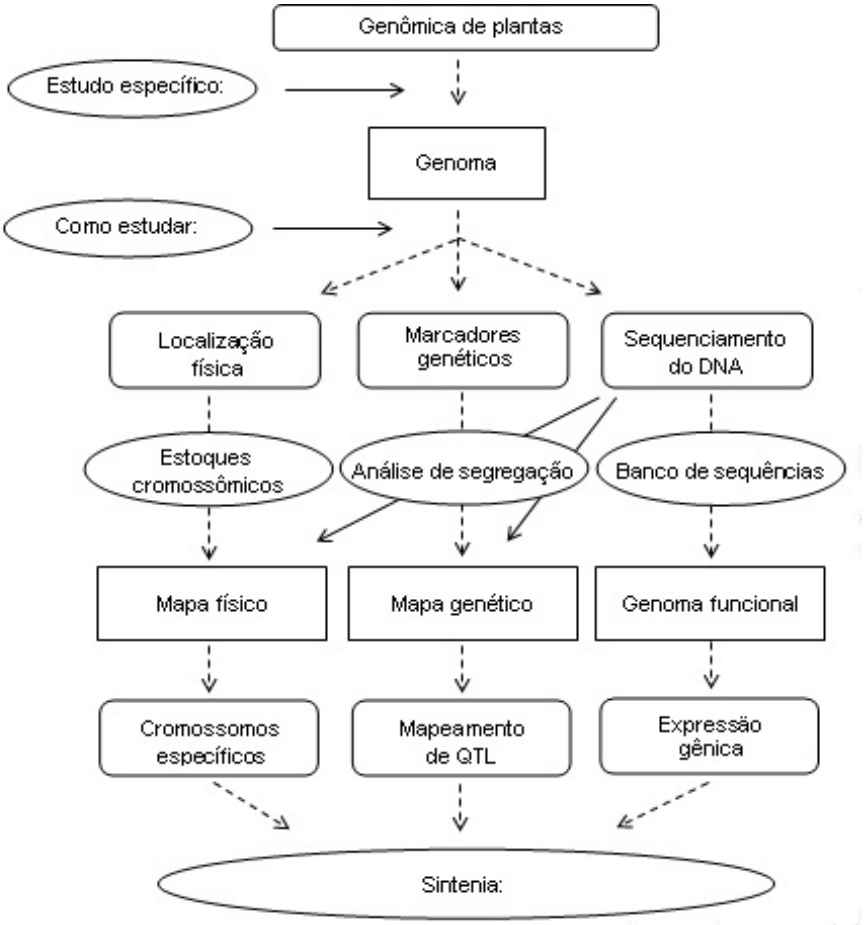

Figura 1 – Abordagens para o estudo do genoma em plantas.
Fonte: Carneiro e Vieira (2002).

Os mapas genéticos são construídos com base no polimorfismo para as características a serem mapeadas, sendo o desequilíbrio de ligação o fundamento mais utilizado na técnica. Esse desequilíbrio é atribuído à ligação física entre os locos, que altera a frequência esperada de ligações, gerando recombinações não aleatórias dentro do cromossomo, o que permite detectar a ligação entre eles (RESENDE, 2008).

Assim, para o desenvolvimento de um mapa genético, a estrutura populacional da espécie de interesse deve ser conhecida, com reprodução sexuada e descendência e uma fonte de marcadores com comportamento mendeliano, originado de cruzamento entre genitores altamente contrastantes (SORKHEH et al., 2008; SOUZA, 2001).

A análise molecular, por meio de marcadores, ocorre na população segregante com a construção do mapa, com auxílio de técnicas estatísticas e computacionais, que calcula as distâncias por meio das frequências de recombinação entre os milhares de marcadores alocados nos cromossomos da espécie. Em seguida, a avaliação fenotípica, por meio da genética quantitativa, é realizada com base nos caracteres de interesse cujos genes se desejam marcar (RAMALHO et al., 2012).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (2016), a capacidade de detecção de um QTL varia em função da magnitude de seu efeito sobre o caráter de interesse, do tamanho da população segregante analisada, da frequência de recombinação entre

o marcador e o QTL e da herdabilidade do caráter. O aumento do poder estatístico e a limitação da ocorrência de falsos positivos também são importantes, principalmente quando há a chamada distorção da segregação mendeliana, causada, também, pela amostragem ou viabilidade diferencial de gametas, devendo ser verificada pelo teste de aderência, que não admite a ocorrência de distorções (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Por fim, o ordenamento dos locos é um processo que busca minimizar o número de *crossing-overs;* assim, diversos métodos podem ser utilizados, aumentando sua complexidade conforme o aumento do número de locos e visando à melhor combinação (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). A distância entre dois locos deve manter o caráter poligênico do QTL. Dessa forma, é definida em Morgans e, diferente da frequência, é aditiva; além disso, pode ser expressa em funções de mapeamento, que convertem as unidades do mapa de Morgans em medidas de distâncias com propriedades como independência de permutas nos intervalos e interferência.

Segundo Resende (2008), três abordagens são utilizadas no mapeamento de QTLs: genes candidatos, mapeamento via análise de ligação e mapeamento via desequilíbrio de ligação. A primeira considera que um gene envolvido com uma característica de interesse possui uma mutação que causa sua variação, então esse gene é sequenciado e o DNA associado às variações fenotípicas encontradas; no entanto, o alto número de genes candidatos é uma desvantagem desta abordagem.

As abordagens de mapeamento buscam identificar regiões do cromossomo associadas à variação fenotípica e consideram que estes genes não são conhecidos e marcados por genes de efeito nulo. Assim, buscam associações entre alelos dos genes marcadores e a variação dos QTLs.

A abordagem de análise de ligação (*Linkage Analysis* – LA) se fundamenta na associação entre alelos do marcador e classes fenotípicas do QTL e a estratégia de análise de desequilíbrio de ligação (*Linkage Desequilibrium Analysis* – LDA) se baseia na associação entre marcador e QTL. Ambas são baseadas no desequilíbrio de ligação, porém, na LA o desequilíbrio é explorado dentro de famílias ou cruzamentos, e na LDA em toda a população, e, nesse caso, marcador e QTL devem estar em ligação muito próxima, o que faz da característica de interesse generalizada e persistente na população.

Atualmente, o desenvolvimento das tecnologias de análise genômica de alta resolução permitiu a ampla adoção da LDA em detrimento da LA devido às suas limitações quanto ao uso de marcadores para análises genéticas com grande número de indivíduos (VOSS-FELS; SNOWDON, 2016).

De forma geral, os fatores que afetam o desequilíbrio de ligação são os processos que afetam as frequências alélicas do EHW. O aumento ocorre devido a populações de tamanhos efetivos reduzidos, estratificadas ou miscigenadas, endogamia, isolamento genético de linhagens, baixa taxa de recombinação, deriva genética e epistasia. Por outro lado, cruzamentos aleatórios, alta taxa de recombinação e mutação levam à sua diminuição (RESENDE, 2008; SORKHEH et al., 2008; VALENTE et al., 2016).

Diversas estratégias podem ser utilizadas na construção dos mapas por LDA, como o mapeamento por marcas simples, por meio de regressão; mapeamento de intervalo, que analisa dois marcadores adjacentes formando um intervalo; mapeamento de intervalo composto, quando há múltiplos QTLs ligados no intervalo e a interferência dos QTLs adjacentes é removida; a genotipagem seletiva, que aumenta o número de indivíduos analisados em relação aos caracteres avaliados;

replicação de genótipos, com redução da variação ambiental por meio do aumento do número de genótipos e com o número constante de determinações.

Diversas abordagens estatísticas também podem ser empregadas, como o método dos momentos, método dos quadrados mínimos, máxima verossimilhança, combinações entre eles, e inferência bayesiana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2016; RESENDE, 2008; RESENDE et al., 2012b).

Análise de associação

Segundo Ferreira e Grattapaglia (2016), análise de associação e estudos de ligação têm o mesmo fundamento genético, ou seja, o desequilíbrio de ligação dentro da população; porém, o último necessita do prévio conhecimento da estrutura populacional. Assim, a análise de associação, utilizada no ajuste fino do mapeamento genético, pode ser entendida como um estudo de ligação sem o uso do *pedigree* da população (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2016; RESENDE, 2008). Dessa forma, no sentido estatístico, o mapeamento de associação se refere à covariância entre marcador polimórfico e o caráter de interesse, enquanto a LDA representa a covariância dos polimorfismos de dois marcadores e, ou, genes.

A análise de associação é aplicada por meio da GWAS, que explora todo o genoma através de marcadores SNPs e associa o QTL à característica fenotípica de interesse. Essa técnica, validada por estudos de genômica humana, mostra-se como uma poderosa abordagem de identificação de genes envolvidos com caracteres de interesse em grandes culturas e tem sido cada vez mais usada nos últimos anos (WEI et al., 2016; SORKHEH et al., 2008).

Na GWAS, o ajuste dos efeitos dos QTLs e marcadores na expressão fenotípica do caráter ocorre marcador a marcador em grandes populações, devendo ser não estruturadas com cruzamentos aleatórios e um ancestral comum, sendo seu principal objetivo identificar genes candidatos para o controle genético da característica de interesse (RESENDE JUNIOR et al., 2013).

Em virtude do uso de indivíduos não aparentados, o que aumenta a variabilidade genética captada, o número de marcadores deve ser muito elevado, na ordem de centenas de milhares, o que só pode ser viabilizado após o desenvolvimento da tecnologia de análise genômica de alta resolução e alto rendimento (VOSS-FELS; SNOWDON, 2016).

Outra limitação é o nível de significância adotado, que deve ser sensivelmente considerado, uma vez que, devido aos milhares de marcadores testados, o nível de 5% geralmente adotado nos diversos testes poderia causar ocorrências igualmente elevadas de falsos positivos (RESENDE et al., 2012b).

Falsos positivos também podem ocorrer pelo efeito de uma eventual presença de estrutura populacional, além da identificação de locos epistáticos, que ainda representa um dos maiores desafios da GWAS (SIVASUBRAMANIAN et al. 2015). Neste aspecto, o uso do mapeamento de associação aninhada (*Nested Association Mapping* – NAM), aplicado de forma pioneira no milho, pode minimizar esses problemas por meio de uma abordagem integrada, que combina o mapeamento clássico de QTL e o de associação, além de considerar as estruturas dentro das populações (BOOPATHI et al., 2015; SIVASUBRAMANIAN et al., 2015).

Diversos métodos de análise de dados, também utilizados em mapeamento de QTLs, podem ser aplicados na GWAS, como regressão de marcas únicas, que analisa apenas um marcador por vez; regressão simultânea, regressão via quadrados mínimos parciais, via componentes principais e via componentes independentes, métodos esses que consideram todos os locos marcadores de forma

simultânea; além dos métodos bayesianos, que propiciam informações sobre a arquitetura genética dos QTLs e suas posições por modelagem da frequência dos SNPs não nulos (RESENDE et al., 2012b; RESENDE et al., 2010).

Devido à grande quantidade de informação gerada, pesquisas recentes têm mostrado a necessidade de sua utilização em uma abordagem interdisciplinar chamada genômica translacional. Tal abordagem busca integrar, transferir e aplicar o abundante conhecimento adquirido por meio destas técnicas genômicas de alto rendimento de culturas amplamente estudadas para as demais espécies (KANG et al., 2016; VOSS-FELS; SNOWDON, 2016). Isto já ocorre desde a primeira década dos anos 2000 entre genômica e medicina humanas (KHOURY et al., 2018).

As técnicas de mapeamento de QTL e GWAS em plantas geram informações sobre histórico de domesticação e arquitetura genética que têm o potencial de acelerar os estudos de biologia e melhoramento, além de trazer avanços na genômica comparativa, sistemática e evolutiva vegetal (VOSS-FELS; SNOWDON, 2016; WEI et al., 2016).

Seleção assistida por marcadores

A detecção de marcadores ligados a uma característica de interesse torna possível a seleção de indivíduos com base no marcador, sem a necessidade de avaliação do fenótipo da característica sob análise (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Dessa forma, é realizada a seleção assistida por marcadores (*Marker-Assisted Selection* – MAS). Sua aplicação otimiza a eficiência de programas de melhoramento genético, principalmente quando a característica de interesse é de avaliação difícil e de alto custo e em estudos com espécies perenes de ciclo longo, significando possibilidades de redução do tempo e custos do programa (SOUZA, 2001).

A MAS surgiu basicamente na década de 1990, com os primeiros trabalhos em espécies perenes, onde marcadores moleculares em estreita ligação com os QTLs são utilizados para orientar seu mapeamento e seleção, e implementada por meio de um modelo de herança mista, combinando o componente poligênico com outro de grande efeito devido ao QTL (RESENDE et al., 2012b). Dessa forma, a MAS pode otimizar a eficiência da seleção com a hibridação das linhagens selecionadas por meio da caracterização genotípica dos marcadores, bem como dos caracteres fenotípicos nos indivíduos (LANDE; THOMPSON, 1990).

A MAS é realizada dentro de famílias ou cruzamentos e também pode ser feita por marcadores em equilíbrio de ligação. Contudo, nesta modalidade, há a necessidade de uma genotipagem muito intensa, avaliações fenotípicas em todos os candidatos à seleção e de procedimentos estatísticos complexos, devido à informação advinda da co-segregação entre marcadores e QTL dentro de cada família na população (GODDARD; HAYES, 2007; RESENDE, 2008).

A abordagem da MAS sob desequilíbrio de ligação, por outro lado, tende a ser mais eficiente, principalmente pelo método que considera, sob o melhor preditor linear não viesado (*Best Linear Unbiased Predictor* – BLUP), o efeito aleatório do QTL com a participação de todos os candidatos à seleção na matriz de identidade por descendência (RESENDE et al., 2014a).

Para a adoção da MAS, Jiang (2015) lista os pré-requisitos necessários, como sistema apropriado de marcadores e marcadores confiáveis, rápida extração do DNA e detecção de marcadores de alto rendimento, o conhecimento da associação marcador-caráter de interesse, mapa genético, sistema rápido e eficiente de processamento dos dados e, consequentemente, os fatores econômicos envolvidos.

De forma geral, muito marcadores estão disponíveis para os diversos tipos de

culturas, porém a escolha do marcador ideal deve preconizar: a facilidade e o menor custo de aplicação; menores quantidades de material genético para análise, o que reduz a quantidade de insumos utilizados; o tipo de herança, dominância ou codominância; a repetibilidade e produtibilidade dos resultados; os níveis de polimorfismos detectados e sua ocorrência e distribuição ao longo do genoma; além de sua proximidade com o gene alvo (FALEIRO et al., 2011; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2016; JIANG, 2015).

A rapidez de extração, bem como da detecção, facilita o processo e permite a análise de mais indivíduos; e a associação marcador-caráter é uma das mais importantes considerações na escolha do marcador, uma vez que garantirá o sucesso do programa de melhoramento por meio da eficiência dos resultados (FALEIRO et al., 2011; JIANG, 2015).

O mapa genético, particularmente o de alta densidade de populações padrão, auxilia na identificação de marcadores próximos à região de interesse do genoma; e, por consequência, devido à grande quantidade de dados gerados, um processamento com metodologias e ferramentas adequadas é essencial (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2016).

As etapas de aplicação da MAS incluem basicamente a fase de mapeamento e cruzamento, com a caracterização da população e obtenção dos dados para seleção de indivíduos favoráveis (NAKAYA; ISOBE, 2012).

Jiang (2015) descreve as fases: ao menos um genitor deve possuir os alelos do marcador para a característica de interesse; obtenção da geração F_1 e detecção dos alelos marcados para eliminação de falsos híbridos; obtenção da geração F_2 segregante e análise dos indivíduos em busca do marcador. A geração F_3 pode ser utilizada para confirmação dos resultados. As gerações seguintes são utilizadas para monitoramento dos marcadores, com atenção especial para os indivíduos superiores. Além desses passos, avaliações paralelas para caracteres secundários de interesse podem ser realizadas, como qualidade e resistência a fatores bióticos e abióticos.

As situações mais favoráveis para a utilização da MAS abrangem a expressão tardia do caráter de interesse na planta, como características relacionadas à floração e frutificação; recessividade do gene alvo, assim heterozigotos podem ser facilmente detectados; condições específicas para a expressão do gene alvo, como adaptação a fatores climáticos; e o condicionamento do fenótipo ocorrer por dois ou mais genes (epistasia), como resistência a pragas e doenças (FALEIRO et al., 2011; JIANG, 2015).

As limitações da técnica, por outro lado, são a complexidade dos métodos estatísticos; aplicação dentro de família, uma vez que a associação marcador-QTL pode variar entre e dentro de populações; e variabilidade detectada principalmente em QTLs relativamente pequenos, porém de grande efeito (FALEIRO et al., 2011).

Seleção genômica

Segundo Nakaya e Isobe (2012), a GWS é uma nova abordagem da MAS que seleciona indivíduos favoráveis baseados na predição de valores genômicos (*Genomic Estimated Breeding Values* – GEBV). Resende et al. (2012b) ressaltam que a GWS é um produto do século XXI, apresentada por Meuwissen et al. (2001) e apenas viável anos depois com o desenvolvimento e redução dos custos dos marcadores tipo SNP. Essa técnica é superior à MAS por apresentar alta acurácia, ter aplicação em maior número de famílias dentro da população e não exigir prévio conhecimento das posições dos QTLs no mapa.

As duas abordagens possuem basicamente o mesmo esquema, com a fase

de treinamento e cruzamento, e determinação das relações entre fenótipos e genótipos por métodos estatísticos e obtenção de indivíduos favoráveis que por cruzamento gerarão a população a ser analisada genotipicamente (Figura 2).

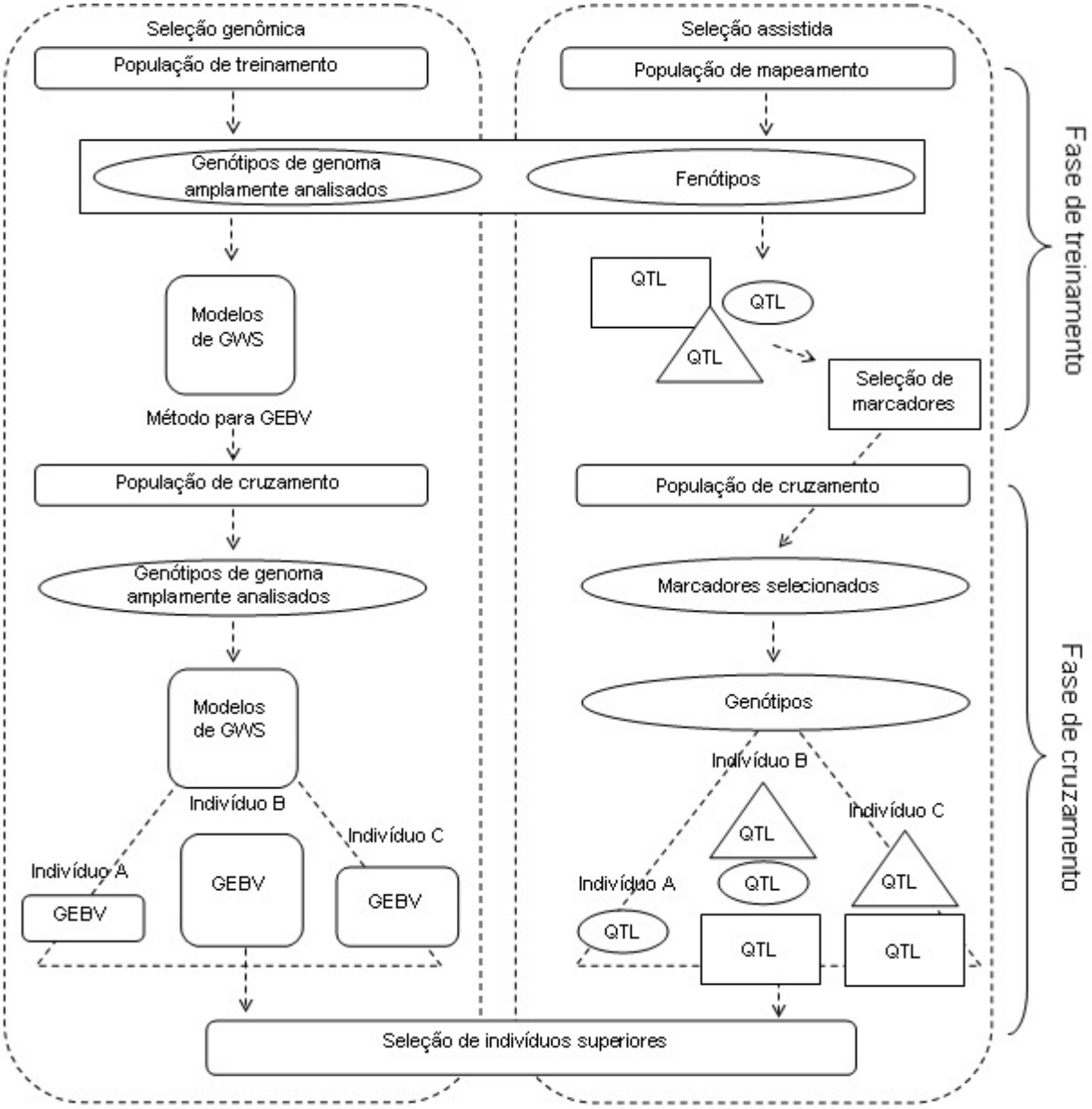

Figura 2 – Representação esquemática da seleção genômica ampla (GWS) e da seleção assistida por marcadores (MAS). Fonte: Nakaya e Isobe (2012).

As principais diferenças são: na fase de treinamento, há a identificação dos QTLs na MAS, enquanto os métodos de predição dos valores genômicos (GEBV) na GWS são definidos; na fase de cruzamentos, há necessidade dos dados genotípicos apenas para as regiões de interesse do genoma na MAS, enquanto que o sequenciamento amplo é necessário na GWS; além disso, na MAS os indivíduos superiores são selecionados com base no genótipo do marcador, enquanto na GWS, são utilizados os GEBVs (NAKAYA; ISOBE, 2012).

Dessa forma, ao contrário da MAS, que utiliza informações fenotípicas visando inferir sobre os efeitos dos genótipos dos indivíduos, a GWS utiliza

informações genotípicas para inferir sobre os valores fenotípicos futuros, ou valores genômicos (RESENDE et al., 2012b).

Na GWS, a cobertura ampla do genoma pelos marcadores garante que todos os genes de um QTL, de maior ou menor efeito, estejam em desequilíbrio de ligação com ao menos uma parte dos marcadores, que explicarão quase toda a variação genética do caráter de interesse, sendo o desequilíbrio de ligação essencial na determinação dos fenótipos e para explicar a variação genética (RESENDE, 2008).

O desenvolvimento da GWS envolve a utilização das associações do grande número de SNPs com os fenótipos, capitalizando o desequilíbrio de ligação entre marcadores e QTL. Em seguida, as predições são obtidas, de dados derivados de fenótipo e genótipo SNP, e os GEBVs serão utilizados para obtenção dos valores genômicos das gerações seguintes (RESENDE et al., 2014b).

Dessa forma, três tipos de conjunto de dados, ou populações, são necessários para a implementação da GWS (GODDARD; HAYES, 2007; RESENDE, 2008):

- conjunto de descoberta, onde um grande número de SNPs é testado em um número moderado de indivíduos já caracterizados fenotipicamente e uma equação de predição dos valores genômicos, que usa os marcadores como dados de entrada, é gerada;
- conjunto de validação, menor que o primeiro, onde os indivíduos são caracterizados fenotípica e geneticamente para os marcadores e as equações de predição são testadas para avaliar a acurácia nessa amostra independente;
- conjunto de seleção, onde os indivíduos são caracterizados geneticamente e as equações de predição estimadas no primeiro conjunto, utilizadas para calcular os GEBVs, porém considerando a acurácia do conjunto de validação.

Segundo Goddard e Hayes (2007), o método mais simples de determinar os genótipos QTL é tratar os marcadores como se fossem de fato QTLs e estimar os efeitos dos alelos marcadores, ou genótipos. O parâmetro mais importante para isso é a proporção da variância do QTL explicada pelos marcadores, que por sua vez depende do desequilíbrio de ligação entre o QTL e um marcador ou combinação de marcadores.

Esse desequilíbrio é muito variável, por ser função da distância entre locos, o que evidencia a importância dos marcadores de alta densidade. Por outro lado, uma forma alternativa aos SNPs é o uso de haplótipos, intervalos definidos por dois marcadores, com base em muitos marcadores.

Assim, de acordo com Resende (2008), marcadores do tipo microssatélites também podem ser usados na GWS, por serem codominantes, multialélicos e abundantes e possuírem alta transferibilidade entre espécies e indivíduos; além dos marcadores tipo DArT, que permitem a amostragem ampla do genoma sem a necessidade do conhecimento prévio das sequências do DNA.

Diversos métodos de análise podem ser utilizados na GWS, e segundo Resende et al. (2010), devem acomodar a arquitetura genética do caráter de acordo com o efeito e distribuição no genoma; regularizar o processo de estimação na presença de multicolinearidade e grande número de marcadores; e realizar a seleção de marcadores que afetam a característica de interesse. Dentre eles, os autores citam os métodos de regressão explícita, incluindo estimação penalizada e estimação bayesiana; regressão implícita, com métodos semi-paramétricos como redes neurais; e métodos de regressão com redução dimensional, como quadrados mínimos parciais e componentes principais.

Estudos com dados simulados mostram que progênies com maiores laços de

parentesco e menor número efetivo aumentam a acurácia da seleção; além de demonstrarem que em condições de altos desequilíbrio de ligação e herdabilidade, a densidade de marcadores tem menor influência na capacidade de predição (COUTINHO et al., 2018; VALENTE et al., 2016).

Quanto aos métodos de predição, o RR-BLUP (*Ridge Regression-Best Linear Unbiased Prediction*), de forma geral, é superior ao método bayesiano (Blasso), porém em condições de alta herdabilidade e alto desequilíbrio de ligação, o método baseado em redes neurais demonstra superioridade em relação ao RR-BLUP, indicando diferença de modelos quantos aos pressupostos associados à característica estudada (ALMEIDA et al., 2016; COUTINHO et al., 2018).

Outro ponto importante é queda da acurácia observada através das gerações, enquanto a acurácia relacionada ao desequilíbrio de ligação tende a ser constante, o que é vantajoso para a aplicação da técnica (AROJJU et al., 2018).

A acurácia dos modelos preditivos da GWS é afetada por fatores como: tamanho do conjunto de treinamento; tamanho efetivo populacional; densidade de marcadores; herdabilidade do caráter de interesse; e número de QTLs envolvidos na expressão da característica, sendo os três primeiros passíveis de controle pelo pesquisador (RESENDE JUNIOR et al. 2013; ROBERTSEN et al., 2019; VALENTE et al., 2016).

Com base na genética de populações, o tamanho efetivo da população possui grande influência no desequilíbrio de ligação, uma vez que essa amostra toda a variação genética da população, e quanto menor o tamanho efetivo e maior a divergência entre indivíduos, maior será a segregação nas gerações seguintes (RESENDE, 2008; VALENTE et al., 2016).

A herdabilidade e o número de QTLs que governam a característica de interesse têm menor impacto sobre a acurácia, uma vez que a GWS é robusta o suficiente para detectar os QTLs com grande número de alelos e, ou, genes e seus pequenos efeitos; e a quantidade de QTLs apenas é significativa se a densidade de marcadores for baixa (GRATTAPAGLIA; RESENDE et al., 2010; RESENDE et al., 2012b).

De forma geral, devido à maior acurácia desta técnica, o uso da GWS pode levar à obtenção de populações com maiores ganhos e mais produtivas, podendo ainda reduzir, ou eliminar em alguns casos, os ensaios de campo, diminuindo os custos dos programas de melhoramento e disponibilizando áreas para produção operacional, além de gerar maior conhecimento sobre o controle genético das características de interesse econômico e incentivar a ampliação e uso de métodos estatísticos cada vez mais eficientes e precisos (RESENDE JUNIOR et al., 2013).

MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS

O melhoramento de forrageiras no Brasil é uma atividade recente, intensificada apenas nas últimas décadas, e resulta, apesar do relativamente pequeno número de cultivares disponíveis comercialmente, em forragens altamente adaptadas e produtivas (JANK et al., 2014; PEREIRA et al., 2018).

Os programas de melhoramento genético de forrageiras são muito complexos, pois devem ser direcionados para a seleção de novos genótipos com o intuito de aumentar a qualidade e produtividade da forragem voltadas à melhoria da eficiência da produção animal, como carne e leite (RESENDE et al., 2008b).

Desse modo, uma equipe multidisciplinar deve estar envolvida, uma vez que a interação genótipo x ambiente está fortemente presente na expressão genética de plantas perenes, com diversas etapas de avaliação (parcelas, ensaios regionais e

performance sob pastejo) para que o lançamento e adoção da nova cultivar sejam eficientes (HAYES et al., 2013).

No Brasil, os programas de melhoramento de forrageiras são estruturados basicamente em três fases e podem variar de seis a onze anos (RESENDE et al., 2008b).

Na primeira fase, há a avaliação de elevado número de genótipos em relação a suas características agronômicas e nutricionais, em um ou vários locais. A segunda, avalia o efeito do animal sobre o pasto, por meio da rebrota, persistência e produtividade. Na terceira, com número reduzido de genótipos, é avaliado o efeito da forrageira sobre o animal, pelo ganho de peso e produção. Assim, o objetivo da fase inicial é a obtenção de novos genótipos, na segunda fase, a seleção e na fase final, recomendação para lançamento de genótipos superiores (JANK et al., 2014) (Figura 3).

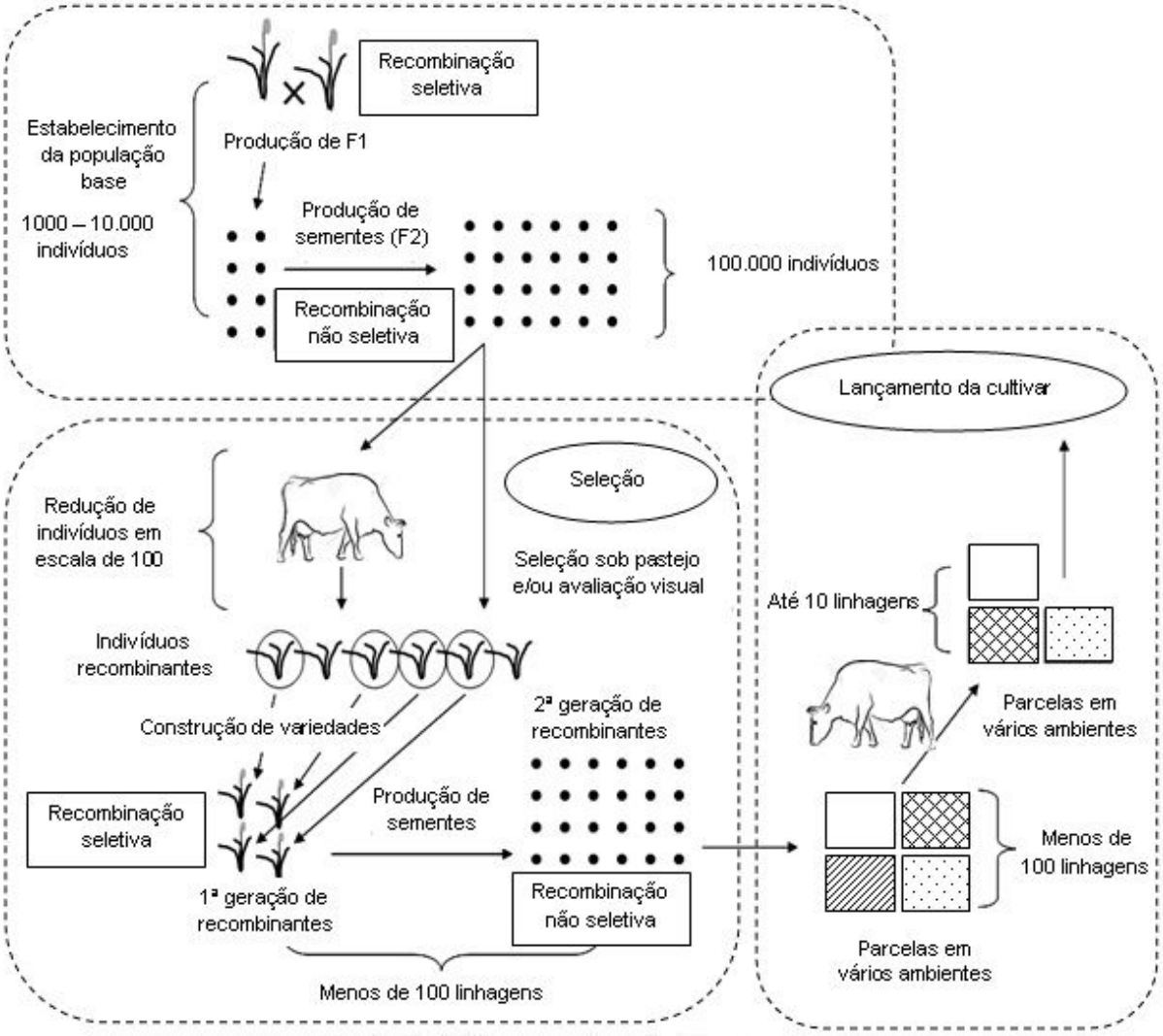

Figura 3 – Representação geral de um programa de melhoramento genético de espécie forrageira. Fonte: Hayes et al. (2013).

Os genótipos que iniciarão o programa de melhoramento genético podem ter origem de prospecção na natureza, provenientes de métodos de melhoramento ou híbridos intra ou interespecíficos, oriundos de pesquisas prévias que compõem a fase de pré-melhoramento (RESENDE et al., 2008b). Nesta fase, ocorrem os

estudos multidisciplinares, sobre cruzabilidade, modo de reprodução, biologia floral, citogenética, caracterização morfológica e molecular dos genótipos, além de atividades de apoio, como estudos sobre fertilização, resistência a pragas e doenças, tecnologia de produção de sementes, microbiologia, entre outros.

Ao longo do programa de melhoramento, o número de genótipos sob avaliação decresce, partindo de grande quantidade de materiais com alta variabilidade para um número reduzido de genótipos de grande rendimento, ou elite, para todas as características de interesse (JANK et al., 2014).

Inicialmente, a obtenção de novas cultivares nos programas de melhoramento de forrageiras no Brasil baseava-se principalmente na seleção de acessos com características superiores diretamente nos bancos de germoplasma, o que tornava a fonte de recursos genéticos finita (VALLE et al., 2009). Atualmente, a estratégia é baseada na obtenção de híbridos, que aumentam imensamente as possibilidades de geração de variabilidade, pela exploração da heterose, e seleção (JANK et al., 2014).

De forma geral, o melhoramento dos materiais iniciais é praticado pelos métodos de seleção recorrente com base no fenótipo e as avaliações experimentais, e práticas de seleção, variam de acordo com o tipo de progênie e métodos de estimação (HAYES et al., 2013; RESENDE et al., 2014c). A seleção recorrente é um processo cíclico de melhoramento que busca aumentar a frequência de alelos favoráveis e, por consequência, da expressão fenotípica do caráter de interesse, por meio da obtenção de famílias, avaliação e intercruzamento das linhas superiores.

A escolha do método de seleção deve considerar, entre outras coisas, a espécie e seu sistema reprodutivo, o germoplasma disponível, o ambiente de utilização e o tipo de cultivar a ser lançado (ANNICCHIARICO et al., 2015; HAYES et al., 2013).

As avaliações fenotípicas de progênies, meio-irmãos ou irmãos completos, podem ser realizadas em plantas espaçadas ou parcelas adensadas, o que torna as correlações variáveis, ressaltando a necessidade de métodos específicos de avaliação nas condições de competição intergenotípicas. Além disso, devem ser considerados os efeitos entre e dentro de famílias, principalmente se a herdabilidade dos caracteres de interesse for baixa, o que causa maior diferença entre os métodos de seleção (RESENDE et al. 2013; 2014c).

Outro fator é a utilização apenas da fração aditiva da variância genética pelo cruzamento durante a seleção por métodos fenotípicos, que pode influenciar os possíveis ganhos genéticos (FORSTER et al., 2014).

Os métodos de estimação devem considerar um coeficiente de determinação genético, bem como a possível heterogeneidade e não independência de variâncias residuais entre as cultivares, devido seu caráter perene, e das medidas repetidas realizadas ao longo das avaliações (RESENDE et al., 2008b).

Por outro lado, além dos métodos baseados apenas em avaliações fenotípicas, os programas de melhoramento podem ser beneficiados pelo uso da biotecnologia, que melhora a acurácia e a agilidade dos processos, por meio das pesquisas com marcadores moleculares, como identificação de híbridos, seleção assistida e aplicação da GWAS e GWS (JANK et al., 2014; HAYES et al., 2013; PEREIRA et al., 2018; RESENDE et al., 2008a).

Uso de GWAS

Segundo Annicchiarico et al. (2015), a utilidade da GWAS para as características complexas depende de como esta abordagem reflete a população avaliada e o ambiente no qual elas serão inseridas. Nesse sentido, os autores

comentam que a análise de associação pode auxiliar na identificação dos genes envolvidos na variação da característica de interesse, sua expressão e regulação, além de permitir a análise da interação genótipo x ambiente.

A aplicação da GWAS em poliploides, condição de muitas espécies forrageiras, contudo, deve considerar o desvio da herança, que pode variar entre locos e entre e dentro de indivíduos da população, aumentando a complexidade das análises; o efeito dos alelos nulos, que pode alterar as frequências alélicas e genotípicas; e a violação das suposições de cruzamento aleatório devido à apomixia.

Neste cenário, o número de trabalhos publicados com o uso da GWAS em forrageiras tem aumentado. Para as espécies de grande importância econômica, como as gramíneas e leguminosas temperadas, já existem mapas genéticos desenvolvidos e genes associados a características de interesse detectados pela GWAS.

Para *Medicago sativa* (alfafa), ainda sem a construção do mapa completo no nível diploide, Hawkins e Yu (2018) comentam o grande potencial para o desenvolvimento de programas de melhoramento para maiores ganhos em produção, uma vez que as cultivares de alfafa são populações sintéticas de ampla base genética. De fato, estudos recentes com a espécie têm identificado QTLs relacionados à qualidade nutricional e características agronômicas passíveis de seleção (BIAZZI et al, 2017; JIA et al., 2018).

Para *Trifolium repens*, Inostroza et al. (2018) relatam a aplicação de GWAS na identificação de QTLs associados à tolerância ao frio em indivíduos tetraploides, fornecendo informações sobre sua base genética e regiões genômicas candidatas para estudos adicionais de validação funcional. No entanto, a baixa extensão do desequilíbrio de ligação mostra-se um fator limitante no melhoramento da espécie (FORSTER et al., 2014).

Para *Avena sativa* (aveia), Newell et al. (2010) afirmaram que até então, pela falta de estudos genômicos com marcadores de alta densidade, a estrutura populacional da espécie não havia sido explorada, bem como a extensão de seu desequilíbrio de ligação, que se mostrou relativamente fraca. Para aplicação da GWAS, os autores sugeriram um maior adensamento de marcadores, em detrimento à abordagem DArT utilizada, e emprego de um germoplasma com maior diversidade de origens, o que possibilitaria estudos mais amplos para a espécie.

De fato, na década seguinte, estudos com utilização de SNPs em linhagens altamente diversas mostraram variação com potencial de uso voltado para melhoria do perfil nutricional e QTLs com classes distintas de tolerância ao vírus do nanismo amarelo da cevada em aveia (*barley yellow dwarf virus*) (CARLSON et al., 2019; FORESMAN et al., 2016).

Em *Brachiaria*, Worthington et al. (2016) encontraram sequências gênicas candidatas à associação com apomixia em híbridos no cromossomo 5 altamente conservadas no genoma da tribo Paniceae. Por outro lado, uma limitação para espécies menos estudadas é a falta de marcadores específicos disponíveis.

Ramstein et al. (2015) reportam que para *Phalaris* ssp. (capim-amarelo) não há mapas de ligação nem sequenciamento disponíveis, o que impede o acesso de SNPs a posições específicas do genoma. No entanto, a tecnologia de genotipagem por sequenciamento permite o acesso a polimorfismos sem o desenvolvimento prévio de marcadores, o que tornou a aplicação da GWAS possível para a cultura. Os autores identificaram nove marcadores significativos relativos à resistência a doenças, fermentação celulósica, tempo do estádio vegetativo e teores de proteína,

glucose, potássio e manganês na planta.

A detecção de QTLs por meio de mapas de associação, devido ao efeito de estrutura populacional, não é adequada para populações de cruzamento geneticamente distantes da população mapeada, embora isto dependa da característica considerada, uma vez que o fluxo genético é importante para geração de variabilidade (ANNICCHIARICO et al., 2015; RESENDE, 2008). Assim, para a utilização da GWAS, estudos prévios são cruciais na determinação das estratégias no melhoramento de forrageiras com aplicação de marcadores.

No Brasil, estão sendo desenvolvidos estudos exploratórios principalmente para os gêneros *Brachiaria* e *Panicum*, espécies de grande importância econômica por ocuparem 80% das pastagens cultivadas no país (JANK et al., 2014; PEREIRA et al., 2018).

Outras pesquisas, que envolvem diversidade e estrutura de populações, em algumas espécies forrageiras por meio de marcadores moleculares, mostram a grande variabilidade dos materiais e as necessidades de readequação de coleções e de estudos de associação para caracteres relacionados à ploidia e reprodução (GARCIA et al., 2013; PESSOA FILHO et al., 2015).

Uso de GWS

A aplicação da GWS no melhoramento de forrageiras pode ser potencializada principalmente quando as avaliações fenotípicas individuais das plantas necessitam de longos ciclos para serem realizadas, ou não são suficientes para determinar a performance sob condições de pastejo, e quando não é possível a aplicação de pressão de seleção significativa dentro de famílias (ANNICCHIARICO et al., 2015; RESENDE et al., 2014c).

Os maiores desafios para a utilização da GWS são as oportunidades restritas para sua implementação em programas em andamento, com necessidade de reestruturação e análise da relação de custos e benefícios com a possível redução dos ensaios de campo e o aumento das atividades de laboratório; e o grau limitado de desequilíbrio de ligação nas espécies forrageiras (ANNICCHIARICO et al., 2015; HAYES et al., 2013).

Dentre as estratégias de aplicação da GWS nos programas de melhoramento genético de forrageiras, Hayes et al. (2013) apontam a utilização da GWS na fase de seleção da 2ª geração de recombinantes (Figura 3). Os genitores e a 1ª geração de recombinantes podem ser genotipados com marcadores de baixa densidade, devido à recombinação restrita na geração F_1, e a F_2, segregante em relação aos genitores, pode ser mais bem investigada, incluindo ensaios de competição e considerando as herdabilidades de produção e persistência.

Com relação aos graus de desequilibro de ligação, estudos mostram que os padrões para *Lolium perenne*, por exemplo, são diferentes dos observados para culturas anuais, apresentando extensões menores no segmento do cromossomo, o que reduz a acurácia dos valores genômicos (ANICCHIARICO et al., 2015; GRINBERG et al., 2016).

A extensão dos desequilíbrios afeta a GWS quanto ao número de SNPs necessários e o número de indivíduos que devem ter seu genótipo e fenótipo caracterizados na população de treinamento. Esta característica pode ser minimizada pelo uso das informações dentro de famílias para aumentar a acurácia de predição dos valores genômicos, uma vez que a acurácia devido ao desequilíbrio de ligação se mantém constante na espécie (AROJJU et al., 2018), e, em longo prazo, pela redução do número efetivo da população pelo cruzamento com

genótipos elite (HAYES et al., 2013).

Assim, o efeito da estruturação da população influencia diretamente o número de marcadores e fenótipos utilizados, fazendo com que esses números aumentem conforme o distanciamento genético da população de treinamento e os candidatos à seleção (HICKEY et al., 2014; ROBERTSEN et al., 2019). Por outro lado, mesmo com ganhos de produtividade e persistência e redução de até quatro anos nos ciclos de seleção, a taxa de endogamia tende a aumentar a cada ciclo com uso da GWS, conforme observado por Lin et al. (2016) em estudo de simulação com a espécie.

De forma geral, o aumento do número de indivíduos para o conjunto de treinamento, maiores herdabilidades e o adensamento de marcadores aumentam os níveis de acurácia na predição dos valores genômicos (GRINBERG et al., 2016; LIN et al., 2014).

Mesmo com maiores níveis de acurácia para caracteres morfológicos, Lipka et al. (2014) concluíram que a qualidade dos recursos fenotípicos e genômicos disponíveis para *Panicum virgatum* (switchgrass) é suficiente para a aplicação da GWS para o melhoramento da produção de biomassa. Grinberg et al. (2016), utilizando GWS em *L. perene*, observaram que a herdabilidade e a acurácia para as características de qualidade foram maiores que as de produção, apontando a influência do adensamento de marcadores e da proximidade entre a população de treinamento e de seleção na melhoria da acurácia.

No Brasil, Lara et al. (2019) observaram ganhos adicionais na seleção de indivíduos tetraploides de *Panicum maximum* com relação a características agronômicas e nutricionais. Os autores concluíram que a aplicação da seleção genômica pode reduzir os custos e o tempo de experimentação, com grande potencial para programas de melhoramento de forrageiras.

Resende et al. (2014c) testaram a GWS em forrageiras a partir de dados simulados em diferentes esquemas de seleção e observaram que a técnica resultou em maiores ganhos em relação à seleção fenotípica na maioria dos cenários; além disso, maiores herdabilidades obtidas pelo método possibilitam a redução do número de marcadores e indivíduos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhoramento genético praticado pela observação de medidas fenotípicas tem evoluído, principalmente por meio das ferramentas estatísticas mais poderosas disponibilizadas por recursos computacionais cada vez mais eficientes. No entanto, as novas abordagens genômicas mostram que podem auxiliar nos métodos de melhoramento, tornando-os mais acurados e precisos. O avanço do melhoramento genético é a alternativa de maior potencial por beneficiar todos os atores envolvidos na cadeia produtiva, desde a pesquisa até o consumidor final, trazendo aumento da capacidade de retorno da cultura melhorada, favorecendo maior número de produtores e reduzindo riscos financeiros e ambientais.

A ampliação do uso dessas metodologias, por sua vez, terá grande impacto na estrutura dos programas de melhoramento genético e trará uma contribuição significativa para os sistemas de produção de forma geral.

Alguns desafios para a implementação efetiva da GWAS e GWS, no entanto, além da dificuldade com as características intrínsecas de cada espécie, envolvem o desenvolvimento de uma plataforma que contenha um sólido programa de melhoramento convencional, mesmo para aqueles programas que utilizam marcadores como suporte para tomada de decisão, e inclua a pesquisa agronômica de apoio e parcerias com indústria e mercado quando necessário.

O uso integrado das tecnologias é essencial e abre oportunidades para o desenvolvimento de novas áreas de pesquisa e aplicação para as espécies forrageiras, base para sistemas produtivos de grande importância econômica para o país.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa para o primeiro autor e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Acre – FAPAC, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.

ALMEIDA, I. F. de; CRUZ, C. D.; RESENDE, M. D. V. de. Validação e correção de fenótipos na seleção genômica ampla. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 51, n. 12, p. 1973-1982, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2016001201973&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. DOI: 10.1590/S0100-204X2016001200008

ANNICCHIARICO, P.; BARRETT, B.; BRUMMER, E. C.; JULIER, B.; MARSHALL, A. Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. **Critical reviews in Plant Sciences,** v. 34, n. 1-3, p. 327-380, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2014.898462?journalCode=bpts20>. DOI: 10.1080/07352689.2014.898462

AROJJU, S.K.; CONAGHAN, P.; BARTH, S.; MILBOURNE, D.; CASLER, M. D. et al.. Genomic prediction of crown rust resistance in *Lolium perenne*. **BMC Genetics,** v. 19, [n. 1], p. 35, 2018. Disponível em: <https://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-018-0613-z>. DOI: 10.1186/s12863-018-0613-z

BIAZZI, E.; NAZZICARI, N.; PECETTI, L.; BRUMMER, E. C.; PALMONARI, A. et al. Genome-Wide Association Mapping and Genomic Selection for Alfalfa (*Medicago sativa*) Forage Quality Traits. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, e0169234, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal. pone.0169234>. DOI: 10.1371/journal.pone.0169234

BOOPATHI, N. M.; SATHISH, S.; KAVITHA, P.; DACHINAMOORTHY, P.; RAVIKESAVAN, R. Molecular breeding for genetic improvement of cotton (*Gossypium* spp.). In: AL-KHAYARI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. (Ed.). **Advances in plant breeding strategies:** biotechnology and molecular tools. New York: Springer, 2015. p. 613-646.

BORÉM, A.; DIOLA, V.; FRITSCHE-NETO, R. Plant breeding and biotechnological advances. In: BORÉM, A.; FRITSCHE-NETO, R. (Ed.). **Biotechnology and plant breeding:** applications and approaches for developing improved cultivars. San Diego, US: Elsevier, 2014. pp. 1-17.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L. Molecular markers. In: BORÉM, A.; FRITSCHE-NETO, R. (Ed.). **Biotechnology and plant breeding:** applications and approaches for developing improved cultivars.

San Diego, US: Elsevier, 2014. pp. 19-45.

CARLSON, M. O.; MONTILLA-BASCÓN, G.; HOEKENGA, O. A.; TINKER, N. A.; POLAND, J. et al. Multivariate genome-wide association analyses reveal the genetic basis of seed fatty acid composition in oat (*Avena sativa* L.). **G3: Genes, Genomes, Genetics,** v. 9, n. 8, [p. 1-37], 2019. Disponível em: <https://www.g3journal.org/content/early/2019/07/10/g3.119.400228>. DOI: 10.1534/g3.119.400228

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia,** v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052002000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. DOI: 10.1590/S0006-87052002000200002

CASTRO, C. A. de O.; RESENDE, R. T.; BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Brief history of Eucalyptus breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural,** v. 46, n. 9, p.1585-159, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000901585>. DOI: 10.1590/0103-8478cr20150645

COUTINHO, A. E.; NEDER, D. G.; SILVA, M. C. da; ARCELINO, E. C.; BRITO, S. G. de et al. Prediction of phenotypic and genotypic values by BLUP/GWS and neural networks. **Revista Caatinga,** v. 31, n. 3, p. 532-540. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-21252018000300532&lng= en&nrm=iso>. DOI: 10.1590/1983-21252018v31n301rc.

CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa.** Viçosa, MG: UFV, 2005. 394 p.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. **Biotecnologia:** estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 730 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: UFV, 2016. p. 342-385.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2.ed. Curitiba: Biosystems, 1995. 219p.

FORESMAN, B. J.; OLIVER, R. E.; JACKSON, E. W.; CHAO, S.; ARRUDA, M. P. et al. Genome-wide association mapping of barley yellow dwarf virus tolerance in spring oat (*Avena sativa* L.). **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0155376, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal. pone.0155376>. DOI: 10.1371/journal.pone.0155376

FORSTER, J. W.; HAND, M. L.; COGAN, N. O. I.; HAYES, B. J.; SPANENBERG, G. C. et al. Resources and strategies for implementation of genomic selection in breeding of forage species. **Crop and Pasture Science,** v. 65, n. 11, p. 1238-1247, 2014. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/cp/CP1336>. DOI: 10.1071/CP13361

GARCIA, M.; VIGNA, B. B. Z; SOUSA, A. C. B.; JUNGMANN, L.; CIDADE, F. W. et al. Molecular genetic variability, population structure and mating system in tropical forages. **Tropical Grasslands,** v. 1, n. 1, p. 25-30, 2013. Disponível em: <http://www.

tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/article/view/33>. DOI: 10.17138/tgft(1)25-30

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. **Journal of Animal Breeding Genetics,** v. 124, n. 6, p. 323-330, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x>. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x

GRINBERG, N. F.; LOVATT, A.; HERGARTY, M.; LOVATT, A.; SKØT, K. P. et al. Implementation of genomic prediction in *Lolium perenne* (L.) breeding populations. **Frontiers in Plant Science,** v. 7, n. 133, [p. 1-10], 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00133>. DOI: 10.3389/fpls.2016.00133

HAWKINS, C.; Yu, L. Recent progress in alfalfa (Medicago sativa L.) genomics and genomic selection. **The Crop Journal,** v. 6, n. 6, p. 565-575, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214514118300217#! DOI: 10.1016/j.cj.2018.01.006

HAYES, B. J.; COGAN, N. O. I.; PEMBLETON, L. W.; GODDARD, M. E.; WANG, J. et al. Prospects for genomic selection in forage plant species. **Plant Breeding,** v. 132, n. 2, 133-143, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbr.12037>. DOI: 10.1111/pbr.12037

HENDERSON, C. R. Estimation of variance and covariance components. **Biometrics,** v.9, n. 2, p.226-252, 1953. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3001853>. DOI: 10.2307/3001853

HICKEY, J. M.; DREISIGACKER, S.; CROSSA, J.; HEARNE, S.; BABU, R. et al. Evaluation of genomic selection training population designs and genotyping strategies in plant breeding programs using simulation. **Crop Science,** v. 54, n. 4, p. 1476-1488, 2014. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/54/4/1476>. DOI: 10.2135/cropsci2013.03.0195

INOSTROZA, L.; BHAKTA, M.; ACUÑA, H.; VÁSQUEZ, C.; IBÁÑEZ, J. et al. Understanding the Complexity of Cold Tolerance in White Clover using Temperature Gradient Locations and a GWAS Approach. **The Plant Genome,** v. 11, n. 3, [p. 1-14], 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3835/plantgenome2017.11.0096>. DOI: 10.3835/plantgenome2017.11.

JANK, L.; BARRIOS, S. C.; VALLE, C. B. do; SIMEÃO, R. M.; ALVES, G. F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science,** v. 65, n. 11, p. 1132-1137, 2014. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/cp/cp13319>. DOI: 10.1071/CP13319

JIA, C.; ZHAO, F.; WANG, X.; HAN, J.; ZHAO, H. et al. Genomic prediction for 25 agronomic and quality traits in alfalfa (*Medicago sativa*). **Frontiers in Plant Science,** n. 9, v. 1220, [p. 1-9], 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6109793/>. DOI: 10.3389/fpls.2018.01220

JIANG, G. Molecular marker-assisted breeding: a plant breeders's review. In: ALKHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. (Ed.). **Advances in plant breeding strategies:** biotechnology and molecular tools. New York: Springer, 2015. p. 431-472.

KANG, Y. J.; LEE, T.; LEE, J.; SHIM, S.; JEONG, H. et al. Translational genomics for plant breeding with the genome sequence explosion. **Plant and Biotechnology Journal,** v. 14, n. 4, p. 1057-1069, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12449>. DOI: 10.1111/pbi.12449

KHOURY, M. J.; FEERO, W. G.; CHAMBERS, D. A.; BRODY. L. E.; AZIZ, N. et al. collaborative translational research framework for evaluating and implementing the appropriate use of human genome sequencing to improve health. **PLoS Medicine,** v. 15, n. 8, e1002650, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002650>. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002650

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics,** v. 124, n. 3, p. 743-756, 1990. Disponível em: <https://www.genetics.org/content/124/3/743>

LIMA, L. P.; AZEVEDO, C. F.; RESENDE, M. D. V. de; SILVA, F. F.; VIANA, J. M. S. et al. Triple categorical regression for genomic selection: application to cassava breeding. **Scientia Agricola,** v. 76, n. 5, p. 368-375. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162019001500368&lng=en&tlng=en>. DOI: 10.1590/1678-992x-2017-0369

LIN, Z.; COGAN, N. O. I.; PEMBLETON, L. W.; SPANGENBERG, G. C.; FORSTER, J. W. et al. Genetic gain and inbreeding from genomic selection in a simulated commercial breeding program for perennial ryegrass. **The Plant Genome,** v. 9, n. 1, [p. 1-12], 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3835/plantgenome2015.06.0046. DOI: 10.3835/plantgenome2015.06.0046

LIN, Z.; HAYES, B. J.; DAETWYLER, H. D. Genomic selection in crops, trees and forages: a review. **Crop and Pasture Science,** v. 65, n. 11, p. 1177-1191, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/CP13363>. DOI: 10.1071/CP13363

LIPKA, A. E.; LU, F.; CHERNEY, J. H.; BUCKLER, E. S.; CASLER, M. C. et al. Accelerating the switchgrass (*Panicum virgatum* L.) breeding cycle using genomic selection approaches. **PloS ONE,** v. 9, n. 11, [p. 1-7], 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112227>. DOI: 10.1371/journal.pone.0112227

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics,** v. 157, n. 4, p. 1819-1829, 2001. Disponível em: <https://www.genetics.org/content/157/4/1819>.

NAKAYA, A.; ISOBE, S. Will genomic selection be a practical method for plant breeding? **Annals of Botanny,** v. 110, n. 6, p. 1303-1316, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article/110/6/1303/110713>. DOI: 10.1093/aob/mcs109

NEWELL, M. A.; COOK, D.; TINKER, N. A.; JANNINK, J. L. Population structure and linkage disequilibrium in oat (*Avena sativa* L.): implications for genome-wide association studies. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 122, n. 3, p. 623-632, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-010-1474-7>. DOI: 10.1007/s00122-010-1474-7

PEREIRA, J. F.; AZEVEDO, A. L. S.; PESSOA-FILHO, M.; ROMANEL, E. A. da C.; PEREIRA, A. V. et al. Research priorities for next-generation breeding of tropical forages in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology,** v. 18, n. 3, p. 314-319, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332018000300314>. DOI: 10.1590/1984-70332018v18n3n46

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P; SOUZA, E. A. de; GONÇALVES, F. M. A. et al. **Genética na Agropecuária**. 5. ed., Lavras: UFLA, 2012. 565p.

RAMSTEIN, G. P.; LIPKA, A. E.; LU, F.; COSTICH, D. E.; CHERNEY, J. H. et al. Genome-wild association study based on multiple imputation with low-depth sequencing data: application to biofuel traits in reed canerygrass. **G3: Genes, Genomes, Genetics,** v. 5, n. 5, p. 891-909, 2015. Disponível em: <https://www.g3journal.org/content/5/5/891>. DOI: 10.1534/g3.115.017533

RESENDE JUNIOR, M. F. R.; ALVES, A. A.; SÁNCHES, C. F. B.; RESENDE, M. D. V. de; CRUZ, C. D. Seleção genômica ampla. In: CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; BHERING, L. L. (Ed.). **Genômica aplicada.** Viçosa, MG: UFV, 2013. 424 p.

RESENDE, M. D. V. de. **Genômica quantitativa e seleção no melhoramento de plantas perenes e animais.** Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 330 p.

RESENDE, M. D. V. de; LOPES, P. S.; SILVA, R. L. da; PIRES, I. E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira,** v. 56, n. 1, p. 63-77, 2008a. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/44392/1/6_Deon.pdf>.

RESENDE, M. D. V. de; RESENDE JUNIOR, M. F.; AGUIAR, A. M.; ABAD, J. I. M.; MISSIAGGIA, A. A. et al. **Computação da seleção genômica ampla (GWS).** Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 78 p. (Documentos, 210). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/ digital/bitstream/item/31426/1/Doc210.pdf>

RESENDE, M. D. V. de; RESENDE JUNIOR, M. F. R.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, C. D.; MISSIAGGIA, A. A. et al. Genomic selection for growth and Wood quality in *Eucaliptus*: capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees. **New Phytologist,** v. 194, n. 1, p. 116-128, 2012a. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/ 10.1111/j.1469-8137.2011.04038.x>.DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.04038.x

RESENDE, M. D. V. de; SILVA, F. F. e; AZEVEDO, C. F. A. **Estatística matemática, biométrica e computacional:** modelos mistos, multivariados, categóricos e generalizados (REML/BLUP), inferência bayesiana, regressão aleatória, seleção genômica, QTL-GWAS, estatística especial e temporal, competição, sobrevivência. Viçosa, MG: UFV, 2014a. 882 p.

RESENDE, M. D. V. de; SILVA, F. F. e; LOPES, P. S.; AZEVEDO, C. F. A. **Seleção genômica ampla (GWS) via modelos mistos (REML/BLUP), inferência bayesiana (MCMC), regressão aleatória multivariada e estatística espacial.**

Viçosa, MG: UFV, 2012b. 291 p.

RESENDE, M. D. V. de; SILVA, F. F. e; RESENDE JUNIOR, M. F. R.; AZEVEDO, C. R. Genome-wide association studies (GWAS). In: BORÉM, A.; FRITSCHE-NETO, R. (Ed.). **Biotechnology and plant breeding:** applications and approaches for developing improved cultivars. San Diego, US: Elsevier, 2014b. 257 p.

RESENDE, R. M. S.; CASLER, M. D.; RESENDE, M. D. V. de. Selection methods in forage breeding: a quantitative appraisal. **Crop Science,** v. 53, n. 5, p. 1925-1936, 2013. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/53/5/1925>. DOI: 10.2135/cropsci2013.03.0143

RESENDE, R. M. S.; CASLER, M. D.; RESENDE, M. D. V. de. Genomic selection in forage breeding: accuracy and methods. **Crop Science,** v. 54, n. 1, p.1-14, 2014c. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/54/1/143?access=0&view=pdf>. DOI: 10.2135/cropsci2013.05.0353

RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK. L. **Melhoramento de forrageiras tropicais.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008b. 293 p.

ROBERTSEN, C. D.; HJORSTSHØJ, R. L.; JANSS, L. L. Genomic selection in cereal breeding. **Agronomy,** v. 9, n. 2, [p. 1-16], 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/2/95/htm>. DOI: 10.3390/agronomy9020095

SAGURTHI, S. R.; SETTI, A.; PAWAR, S. C. Systems biology: a new frontier in science. In: BAHADUR, B.; RAJAM, M. V.; SAHIJRAM, L.; KRISHNAMURTHY, K. V. (Ed.). **Plant biology and biotechnology volume II:** plant genomics and biotechnology. Nova Deli: Springer, 2015. p. 301-314.

SIVASUBRAMANIAN, R.; MUKHI, N.; KAUR, J. *Arabidopsis thaliana*: a model for pant research. In: BAHADUR, B.;RAJAM, M. V.; SAHIJRAM, L.; KRISHNAMURTHY, K. V. (Ed.). **Plant biology and biotechnology volume II:** plant genomics and biotechnology. Nova Deli: Springer, 2015. p. 1-26.

SORKHEH, K.; MALYSHEVA-OTTO, L. V.; WIRTHENSOHN, M. G.; TARKESH-ESFAHANI, S. Linkage disequilibrium, genetic association mapping and gene localization in crop plants. **Genetics and Molecular Biology,** n. 31, v. 4, p. 805-814, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572008000500001>. DOI: 10.1590/S1415-47572008005000005

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELLO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-965.

VALENTE, M. S. F.; VIANA, J. M. S.; RESENDE, M. D. V. de; SILVA, F. F. e; LOPES, M. T. G. Seleção genômica para melhoramento vegetal com diferentes estruturas populacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 51, n. 11, p. 1857-1867, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2016001101857>. DOI: 10.1590/s0100-204x2016001100008

VIANA, A. P.; RESENDE, M. D. V. de; RIAZ, S.; WALKER, M. A. Genome selection in fruit breeding: application to table grapes. **Scientia Agricola,** v. 73, n. 2, p.142-149, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162016000200142>. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0323

VOSS-FELS, K.; SNOWDON, R. J. Understanding and utilizing crop genome diversity via high-resolution genotyping. **Plant Biotechnology Journal,** v. 14, n. 4, p. 1086-1094, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12456>. DOI: 10.1111/pbi.12456

WEI, L.; JIAN, H.; LU, K.; FILARDO, F.O.; YIN, N. O. et al. Genome-wide association analysis and differential expression analysis of resistance to Sclerotinia stem rot in *Brassica napus*. **Plant Biotechnology Journal,** v. 14, n. 6, p. 1368-1380, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12501>. DOI: 10.1111/pbi.12501

WORTHINGTON, M.; HEFFELFINGER, C.; BERNAL, D.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y. P. et al. Parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics,** v. 203, n. 3, [p. 1-20], 2016. Disponível em: <https://www.genetics.org/content/203/3/ 1117>. DOI: 10.1534/genetics.116.190314