



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV**

**USO DE MARCADORES MOLECULARES EM PROTEÇÃO DE  
CULTIVARES NO BRASIL**

**Juliana Martins de Oliveira**

**MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Brasília-DF**  
**Julho/2015**

Universidade de Brasília - UnB  
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAV

Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares no Brasil.

Juliana Martins de Oliveira  
Matrícula: 10/0108610

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fagioli  
Matrícula: 10/35649

Coorientadora: Msc. Daniela de Moraes Aviani

Projeto final de Estágio Supervisionado, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:

---

Professor Dr. Marcelo Fagioli  
Universidade de Brasília - UnB  
Orientador

---

Engenheiro Agrônomo Dr. Fabrício Santana Santos  
Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA  
(Examinador)

---

Engenheiro Agrônomo e Bacharel em Direito Ricardo Zanatta Machado  
Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA  
(Examinador)

## FICHA CATALOGRÁFICA

Martins de Oliveira, Juliana

Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares no Brasil / Juliana Martins de Oliveira. Brasília, 2015. 40f.

Orientador: Dr. Marcelo Fagioli

Coorientadora: Msc. Daniela de Moraes Aviani

Monografia - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Marcadores Moleculares na proteção de cultivares no Brasil. 2. Aplicabilidade e limitações do uso de marcadores moleculares.

I. Fagioli, Marcelo, orient. II. Moraes Aviani, Daniela, coorient. III. Título.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

OLIVEIRA, J.M. **Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares no Brasil**. 2015. 40f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2015.

## CESSÃO DE DIREITOS

**Nome do Autor:** Juliana Martins de Oliveira

**Título da Monografia de Conclusão de Curso:** Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares no Brasil.

**Grau:** 3° **Ano:** 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Juliana Martins de Oliveira  
Matrícula: 10/0108610  
e-mail: moliveira.juliana@gmail.com

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Nauza Martins, que é a pessoa mais forte, batalhadora, corajosa e inteligente que conheço, e me inspira todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe Nauza, meus irmãos Carol e Vinícius e toda minha família que me apoiou nas etapas dessa longa caminhada e estiveram ao meu lado dividindo conquistas e realizações.

Ao meu orientador Professor Dr. Marcelo Fagioli pela ajuda acadêmica, incentivo e conhecimentos compartilhados durante minha graduação.

A minha coorientadora Msc. Daniela Aviani, por todo apoio, dedicação, paciência, conselhos e conhecimento, sem os quais não conseguiria ter finalizado esta monografia.

Aos professores do curso de Agronomia e outros cursos pela contribuição indiscutível na minha formação profissional.

A todos do SNPC Daniela, Vera, Fabrício, Zé Antônio, Stefânia, Luiz Cláudio, Zanatta, Izabella e Carolina que estiveram comigo durante 2 anos de estágio. Obrigada pela grande contribuição no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos e companheiros de curso, Dheivid, Taís, Henrique e Isabella, que aprenderam, cresceram e sofreram comigo durante a graduação, obrigada pela ajuda nos estudos, trabalhos e provas. Desejo muito sucesso no futuro de todos.

Por fim, aos melhores amigos do mundo Caio, Bárbara, Carol, Mateus, Rivânia, Ana, Daniela, Lucas, Rafael e Thiago, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, sempre me apoiando e incentivando com muitas risadas e alegria.

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Histórico da proteção de cultivares.....	4
3.2. Lei de proteção de cultivares.....	6
3.3. Melhoramento vegetal.....	8
3.4. Teste de DHE.....	9
3.5. Procedimentos usados na proteção de cultivares.....	11
3.5.1. Exame de solicitação de proteção pelo SNPC.....	12
3.5.2. Concessão do título de proteção.....	13
3.6. Fiscalização do cumprimento da LPC.....	14
3.7. Uso de marcadores moleculares na proteção de cultivares.....	16
3.8. Tipos de marcadores moleculares.....	20
3.8.1. Marcadores microsatélites.....	20
3.8.2. Marcadores SNPs.....	21
3.8.3. Marcadores SCAR.....	22
4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
6. REFERÊNCIAS.....	36

## RESUMO

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados no âmbito da proteção de cultivares como ferramentas complementares, por exemplo, na comprovação da origem genética da cultivar, na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização. Neste contexto, o trabalho teve como objetivos discorrer sobre a aplicabilidade e limitações dos métodos de caracterização, diferenciação e identificação no âmbito da proteção de cultivares a partir dos procedimentos em uso e de informações geradas pela pesquisa científica no Brasil. Foi realizado um levantamento de artigos que descrevem aplicações e resultados obtidos pelo uso de marcadores moleculares em espécies diferentes, buscando inferir sobre a eficácia dessa tecnologia no processo de proteção. As conclusões obtidas foram que o uso de marcadores moleculares traz benefícios por ser uma tecnologia precisa, não influenciada pelo ambiente e não depende do estágio de desenvolvimento da planta. Marcadores moleculares vêm servindo de complemento à caracterização morfológica e agrônômica tradicional. Podem ser utilizados como ferramenta auxiliar para organizar os testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade das cultivares candidatas à proteção, além de diversas outras aplicações, levando a crer que, no futuro, o uso de marcadores moleculares terá ampliado consideravelmente seu papel no processo de proteção de cultivares.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, proteção de cultivares, caracterização, diferenciação, identificação.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o crescente desenvolvimento de novas tecnologias agrícolas, a substituição de cultivares tradicionais por outras, de base genética mais estreita, vem aumentando em grande escala. Essas novas cultivares apresentam maior produtividade e são portadoras de características superiores, que as tornam mais desejáveis ao produtor agrícola. Esse aumento de produtividade é essencial em vista do cenário mundial atual, que precisa de cada vez mais alimentos para suprir as necessidades da população que está em constante crescimento.

O desenvolvimento de novas cultivares é um processo caro e trabalhoso. Para amparar e incentivar as instituições de pesquisa, foi instituída a proteção de cultivares, concedendo-lhes direitos de exclusividade sobre a exploração das variedades criadas. Essa proteção foi firmada no Brasil em 1997, quando passou a vigorar a Lei de Proteção de Cultivares, que garante os direitos dos obtentores de novas variedades vegetais.

A Lei de Proteção de Cultivares criou o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) no âmbito Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que é responsável pela gestão dos aspectos administrativos e técnicos dessa matéria.

Para que uma cultivar possa ser protegida pelo SNPC, ela precisa apresentar alguns requisitos, tais como: ser produto de melhoramento genético; ser de uma espécie passível de proteção no Brasil; não ter sido comercializada no exterior há mais de quatro anos, ou há mais de 6 anos, no caso de videiras ou árvores; não ter sido comercializada no Brasil há mais de um ano; possuir denominação própria; além de ser distinta, homogênea e estável.

Para comprovar a distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de uma cultivar, são realizados testes de DHE. Esses testes são baseados em descritores, que podem ser fisiológicos, bioquímicos, moleculares, ou morfológicos, esses últimos são os mais utilizados. Para cada espécie passível de proteção no Brasil foi definido um conjunto de descritores próprios ou características que devem ser observadas nas cultivares candidatas à proteção. Assim, cada cultivar possui sua descrição específica.

Além de seu uso nos testes de DHE, os descritores morfológicos são de extrema importância para o lançamento de uma nova variedade no mercado. Eles

podem ser usados no papel de divulgação das características agronômicas de novos materiais, para que desperte o interesse do produtor em adquirir essa nova cultivar.

Embora os descritores morfológicos sejam essenciais na caracterização de uma cultivar, devido ao número crescente de variedades desenvolvidas a cada ano, e que conseqüentemente entram no processo de solicitação de proteção, torna-se difícil, em algumas situações, observar a distinguibilidade da nova variedade com base em apenas características morfológicas.

Quando os descritores morfológicos não são suficientes ou decisivos para caracterização, diferenciação e/ou identificação de uma cultivar, o uso de marcadores moleculares como uma ferramenta complementar apresenta-se como um novo método que vem mostrando resultados promissores.

## **2. OBJETIVOS**

Discorrer sobre as aplicações e limitações do uso de marcadores moleculares em métodos de caracterização, diferenciação e identificação no âmbito da proteção de cultivares.

Levantar informações geradas pela pesquisa científica no Brasil, bem como suas perspectivas, sobre o uso de marcadores moleculares em variedades vegetais com foco na proteção de cultivares.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Histórico da proteção de cultivares

Em 1883, foi realizada a Convenção de Paris para a Proteção da Propriedade Industrial, onde se reconheceu o potencial criativo do homem e sua importância no futuro das inovações tecnológicas. Essas inovações foram acompanhadas por transformações que marcaram o século XX e chegaram até a globalização da economia nas décadas mais recentes, dando espaço para a propriedade intelectual assumir um papel de grande importância (VIANA, 2011).

No contexto de uma nova ordem econômica mundial, estabelecida após um grande período de guerras e crises econômicas e sociais, foi fundada a Organização Mundial do Comércio (OMC) em 15 de abril de 1994, que congregou vários países no intuito de supervisionar e liberalizar o comércio internacional. A ata final de criação da OMC estabeleceu, no Anexo 1 C, o *Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio – Trade Related Intellectual Property Rights* (TRIPS), criado com objetivo de estimular a inovação e o desenvolvimento tecnológico (VIANA, 2011).

O acordo TRIPS incluiu as várias formas de propriedade intelectual como o direito de autor e direitos conexos; as marcas de comércio ou de fábrica; as indicações geográficas, com as denominações de origem; desenhos e modelos industriais; topografia de circuitos integrados; a informação confidencial e por fim as patentes. Na seção do acordo TRIPS que discorre sobre patentes é estabelecido, no artigo 27.3(b), que países membros da OMC podem escolher, para proteção intelectual das variedades vegetais, entre um sistema patentário, um modelo *sui generis* ou uma combinação de ambos (VIANA, 2011).

O acordo buscou abranger as formas de proteção já existentes nas legislações vigentes em alguns países pioneiros na proteção desse direito. Entre eles, os Estados Unidos que, em 1930, promulgaram uma lei conhecida como *Plant Patent Act* que estabelecia o direito de patente aos obtentores de novas variedades de plantas propagadas assexuadamente. Mas a principal referência para o modelo *sui generis* citado no TRIPS foi a União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV, sigla em francês que significa *Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales*) criada para gerir a Convenção Internacional para Proteção das

Novas Obtenções Vegetais assinada em 2 de dezembro de 1961, durante a Conferência de Paris. O tratado, revisado posteriormente por três Atos adicionais - 1972, 1978 e 1991 - tinha por finalidade harmonizar a proteção intelectual nos territórios membros. (VIANA, 2011). As adesões foram crescentes e atualmente a UPOV conta com 72 membros (UPOV, 2014)

Com sede permanente em Genebra, na Suíça, a UPOV mantém sua estrutura organizacional gerida por um Conselho dos países membros, uma Secretaria para assessoramento permanente, e comitês - Consultivo, Técnico, Administrativo e Jurídico – além de Grupos Técnicos de Trabalho que se reúnem anualmente. As atividades realizadas pela UPOV incluem a promoção de harmonização e cooperação internacional, principalmente entre seus membros, além do assessoramento a organizações e países com interesse de tornarem-se novos membros (AVIANI; MACHADO, 2011).

A UPOV tem como missão promover e fornecer um sistema efetivo de proteção de variedades vegetais, seu principal objetivo é encorajar o desenvolvimento de novas cultivares para benefício da sociedade através do reconhecimento dos direitos dos obtentores (AVIANI; MACHADO, 2011).

Através da proteção intelectual concedida pelo Estado tem-se o incentivo necessário à manutenção da atividade de melhoramento de plantas. Essa estratégia é fundamental para atrair investimentos para a pesquisa voltada para a geração de novas cultivares, sobretudo por parte da iniciativa privada. Novas variedades contribuem para aumentar a produtividade (sem necessidade de ampliação de áreas), aliam-se a outras práticas tecnológicas para otimizar as práticas de cultivo, reduzem as perdas por deficiência hídrica e ataques de pragas e incorporam características exigidas pelos consumidores. Assim, o desenvolvimento e conseqüente elevação da competitividade da agricultura passa, necessariamente, pela renovação constante das variedades plantadas pelos agricultores (TEIXEIRA, 2011).

Nesse sentido em 25 de abril de 1997, o Brasil adicionou em seu ordenamento jurídico a Lei nº 9.456, conhecida como Lei de Proteção de Cultivares (LPC), adquirindo inquestionável valor no contexto das políticas públicas relacionadas ao setor agropecuário brasileiro.

A LPC mudou de forma significativa o modelo de criação de tecnologia na área de produção de sementes que existia no país. As novas cultivares eram, via de regra,

desenvolvidas pela pesquisa pública, em especial pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). O novo modelo, por sua vez, motivou a iniciativa privada a investir no segmento, aumentando a participação na geração de novas tecnologias em sementes. Esse movimento propiciou a auto sustentabilidade do sistema de produção de sementes, inclusive da base do processo que é a pesquisa em melhoramento vegetal, que passou a ser garantida pela remuneração obtida na comercialização das novas cultivares desenvolvidas (TEIXEIRA, 2011).

### **3.2 Lei de proteção de cultivares**

A LPC é aplicada pelo SNPC, que recebe e analisa os pedidos e emite o Certificado de Proteção que assegura o direito de propriedade intelectual dos obtentores de novas combinações fitogenéticas na forma de cultivares distintas, homogêneas e estáveis. Este certificado é considerado um bem móvel e representa a única forma de proteção das espécies superiores de plantas (BRASIL, 2009).

É comum existir confusão entre proteção e registro de cultivares no Brasil. O Quadro 1 traz os principais aspectos que diferenciam os dois sistemas que, embora independentes e com finalidades distintas, são efetuados no âmbito do Ministério da Agricultura. O registro de cultivares habilita a produção e comercialização de sementes no país, já a proteção cobre as obtenções de novas cultivares produzidas pelos programas de melhoramento genético de instituições de pesquisa além de assegurar o direito de exploração comercial e uso (royalties), por um período determinado de tempo. O registro é fundamentado na legislação de sementes, Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. Enquanto para a Proteção são exigidos testes de DHE, para registrar uma cultivar deve-se realizar ensaios prévios de VCU. Cada modalidade possui diretrizes próprias com critérios mínimos estabelecidos para cada espécie ou grupos de espécies similares (AVIANI et al., 2008).

**Quadro 1.** Aspectos importantes relacionados com a proteção e o registro de cultivares no Brasil.

<b>ASPECTOS</b>	<b>PROTEÇÃO DE CULTIVARES</b>	<b>REGISTRO DE CULTIVARES</b>
Autoridade responsável	SNPC/MAPA	RNC/MAPA
Finalidade	Assegurar os direitos exclusivos na exploração comercial da cultivar protegida	Habilitar as cultivares para a produção e comércio
Base legal	Lei nº 9.456/1997 (Lei de Proteção de Cultivares) Decreto nº 2.366/1997 Decreto Legislativo nº 3.109/1999	Lei nº 10.711/2003 (Lei de Sementes e Mudas) Decreto nº 5.153/2004
Requisitos técnicos	Distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, a ser verificado por meio dos Testes de DHE	Avaliação do valor das características agronômicas de cultivares, por meio dos Testes de VCU (valor de cultivo e uso) para espécies de relevância econômica
Informação gerada	Cadastro Nacional de Cultivares Protegidas	Cadastro Nacional de Cultivares Registradas

Fonte: (AVIANI, 2011).

### **3.3 Melhoramento vegetal**

É de extrema importância que as plantas sejam adaptadas a condições ambientais e de manejo específicas, que variam de acordo com o nível tecnológico, o nível econômico, as práticas de cultivo empregadas e a região. Os agricultores necessitam de sementes ou mudas testadas e selecionadas dentro de determinada espécie (AVIANI, 2011).

De acordo com a LPC, tem-se que cultivar é a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores, por sua própria denominação, que seja estável e homogênea quanto aos descritores através de gerações sucessivas e que possa ser usada pelo complexo agroflorestal, descrita em publicação especializada disponível e acessível ao público, assim como a linhagem componente de híbridos (BRASIL, 1997).

Os descritores, ou características utilizadas para caracterizar cultivares são próprios de cada espécie e levam em conta a sua anatomia, fisiologia, comportamento entre outros aspectos que veremos adiante. Além de atributos técnicos, outras informações que norteiam os trabalhos de melhoramento vegetal, como características importantes para o mercado, podem ser incluídas como descritores. Por exemplo a espécie alface possui diversas cultivares que podem ser separadas e identificadas por sua coloração, tamanho de cabeça, formato de folhas, textura, além de sua resistência a determinadas pragas (AVIANI, 2011).

A identidade da cultivar é um aspecto relevante a ser considerado. O direito sobre uma cultivar só é passível de ser exercido pelo seu proprietário a partir do momento em que ele pode identificar essa cultivar. A efetividade da proteção somente ocorre quando a identidade é clara e mantida durante toda a vida da cultivar. Isso porque a defesa do direito do obtentor é responsabilidade dele próprio. O Estado estabeleceu a LPC reconhecendo o direito de propriedade sobre a cultivar, mas a defesa, mediante denúncias e ações judiciais são deflagradas pelo interessado, ou seja, o titular da cultivar (AVIANI, 2011).

Outro conceito importante é o de novidade, que não tem relação com a atividade inventiva, mencionada na lei de propriedade industrial. De acordo com a LPC, o atributo de novidade diz respeito ao tempo de comercialização. Para ser

considerada nova, a cultivar não pode ter sido oferecida à venda, nem comercializada no Brasil há mais de doze meses em relação à data do pedido de proteção e, quando observado o prazo de comercialização no Brasil, também não tenha sido oferecida à venda, nem comercializada em outros países, com consentimento do obtentor, há mais de seis anos para espécies de árvores e videiras e há mais de quatro anos para as demais espécies (AVIANI, 2011).

A cultivar deverá possuir uma denominação própria, para que possa ser feita sua identificação, que a acompanha durante sua existência. A denominação deve ser proposta no momento do pedido de proteção pelo requerente (AVIANI, 2011).

De acordo com a LPC considera-se o melhorista a pessoa física que obtiver cultivar e estabelecer descritores que a diferenciam das demais. O melhorista é o mentor, o detentor dos direitos morais. Obtentor é o financiador do programa de melhoramento, o detentor dos direitos patrimoniais (BRASIL, 1997). Nem sempre o obtentor e o melhorista são pessoas distintas, mas, para que exista um obtentor é necessária a existência de um melhorista. Assim, as cultivares são resultantes de um processo de melhoramento vegetal. As técnicas usadas no melhoramento de plantas vão desde as tradicionais, como seleção e cruzamento, até a engenharia genética. Para a proteção, o método utilizado não é relevante, mas sim o resultado obtido (AVIANI, 2011).

### **3.4 Teste de DHE**

Para uma cultivar ser protegida, portanto, ela deve atender aos requisitos de novidade, distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade, ter denominação própria e cumprir as formalidades legais. Os requisitos técnicos devem ser avaliados por meio dos Testes de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE). Os Testes de DHE são de extrema importância no processo de concessão de proteção, e consistem em procedimentos técnicos para comprovar que a nova cultivar se distingue claramente de qualquer outra cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida, que ela seja homogênea quando utilizada em plantio, em escala comercial, apresentando variabilidade mínima quanto aos descritores que a identificam e estável, ou seja, quando reproduzida em escala comercial, mantenha a sua homogeneidade através de gerações sucessivas (MACHADO, 2011).

Os Testes de DHE podem ser realizados no campo, em casa de vegetação, ou em laboratório, e segundo a UPOV, podem ser conduzidos pela autoridade competente a conceder os direitos de proteção; por instituições independentes, como institutos públicos de pesquisa agindo em nome daquela autoridade ou ainda, pelo obtentor (UPOV, 2002).

Para que se tenha a segurança de que os testes de novas cultivares estão sendo conduzidos de forma harmonizada por todos os países membros da UPOV, e no caso do Brasil, pelos diferentes obtentores, são estabelecidos guias práticos detalhados para a condução do exame de DHE e para a descrição que será feita da cultivar. Esse guia é denominado Diretrizes de DHE, que identifica as características a serem avaliadas, por meio da Tabela de Descritores, incluindo como observá-las (MACHADO, 2011).

O sistema de proteção de cultivares do Brasil permite que os melhoristas conduzam os testes de DHE e produzam um relatório final com os resultados, de acordo com as diretrizes da espécie avaliada. A decisão do SNPC sobre a proteção de cultivar irá basear-se em um relatório técnico fornecido pelo obtentor. Quando o SNPC julgar necessário, poderão ser solicitados exames independentes e adicionais para verificação da distinguibilidade, homogeneidade ou estabilidade (MACHADO, 2011).

Para organização dos testes de DHE, é necessário a observação de alguns fatores como número de ciclos de crescimento, delineamento experimental do ensaio, número total de plantas e número de plantas que serão avaliadas, número de repetições e parcelas, métodos e época adequada para observação de cada característica. Essas informações, que variam de acordo com a espécie a ser examinada, são encontradas nas diretrizes específicas de DHE (MACHADO, 2011).

É necessário examinar a distinguibilidade da nova cultivar em relação a todas as outras consideradas mais parecidas com ela e já conhecidas, dentro da mesma espécie (MACHADO, 2011).

Em relação ao exame de homogeneidade, tem-se que uma cultivar é considerada homogênea quando for suficientemente uniforme levando em conta atributos específicos de seu tipo de reprodução, ou seja, de acordo com o tipo de propagação, sexuada ou assexuada. Quanto à estabilidade, uma cultivar deve ser estável em suas características essenciais, permanecendo fiel à sua descrição após

repetidos ciclos de propagação. As características essenciais são todas aquelas usadas para o exame de DHE. A cultivar estável, quando reproduzida em escala comercial, mantém sua homogeneidade por meio de gerações sucessivas. A relação entre homogeneidade e estabilidade é intrínseca, considera-se que quando uma cultivar apresenta uniformidade, pode ser igualmente considerada estável (UPOV, 2002).

Após concluídas as avaliações, parte dos dados coletados são submetidos a testes estatísticos. A estatística é utilizada quando os dados do ensaio de DHE estão sujeitos a variações, que tendem a dificultar a visualização de diferenças entre as cultivares, o que poderia complicar as comparações e induzir a decisões e resultados equivocados (SANTOS; PACHECO, 2011).

### **3.5 Procedimentos usados na proteção de cultivares**

Como mencionado, para se distinguir das demais, uma cultivar deve apresentar sua própria identidade. Alguns descritores varietais que conferem identidade a cultivar são: ciclo, cor das sementes, caracteres morfológicos, reação a doenças, entre outros. Manter essas características estáveis a cada geração da cultivar é importante para sua identificação (BORÉM, 2005).

Descritor pode ser uma característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular, desde que seja herdada geneticamente. Para diferenciar uma cultivar de outra é preciso que haja uma margem mínima de diferenças entre elas, que é definida por um conjunto de descritores, estabelecido pelo SNPC. Dessa forma, cabe ao SNPC divulgar as espécies vegetais e seus respectivos descritores mínimos necessários para que aconteça a abertura do pedido de proteção (SILVA, 2005).

Cada cultivar possui caracteres passíveis de determinar a sua identidade, homogeneidade e estabilidade. Os caracteres descritivos podem ser classificados como fixos ou variáveis, de acordo com o grau de interação com o ambiente. Os fixos, também podem ser denominados qualitativos, esses dependem de um ou de poucos genes de distribuição discreta, são pouco afetados pelo ambiente e de fácil identificação, como por exemplo a cor da flor em soja. Já os caracteres variáveis, dependem da ação de vários genes, que interagem com o ambiente e manifestam-se,

fenotipicamente, com uma distribuição normal, como exemplo altura de planta (SILVA, 2005).

Entre os tipos de descritores que podem ser utilizados - bioquímicos, morfológicos e moleculares - os morfológicos são os mais usados na identificação de genótipos e cultivares, devido à sua facilidade de aplicação (JESUS, 2006).

As cultivares candidatas à proteção são avaliadas por meio da descrição de suas características anatômicas, fisiológicas ou ainda por marcadores bioquímicos. Como citado anteriormente, a LPC exige que, para ser protegida, a cultivar seja distinta, homogênea e estável. Uma cultivar distinta pode ser claramente distinguível por uma ou mais características relevantes. A homogeneidade e a estabilidade estão relacionadas à manutenção das características essenciais. Para se chegar à descrição de uma cultivar, são feitas avaliações (mensurações, contagens, visualizações etc.) e observações de características, via de regra, durante dois ciclos da cultura (SANTOS; PACHECO, 2011).

Um dos grandes desafios do trabalho de caracterização das cultivares é o grande número de descritores morfológicos necessários para diferenciá-las e a grande influência que o ambiente pode ter, podendo tornar o método pouco eficiente (JESUS, 2006).

### **3.5.1 Exame de solicitação de proteção pelo SNPC**

Depois da realização dos Testes de DHE, entra-se com o processo de pedido de proteção. Para fazer a solicitação de proteção de uma cultivar no Brasil, é necessário a apresentação de uma série de documentos ao SNPC. Devem-se preencher os formulários disponíveis na página da internet do MAPA, com dados sobre o obtentor, o histórico de obtenção e a cultivar candidata à proteção, bem como os descritores mínimos e resultados dos testes de DHE. Após o preenchimento, a impressão e a assinatura dos formulários, deve-se efetuar o pagamento da taxa de solicitação de proteção. A documentação pode ser enviada via correio, para o SNPC, ou entregue pessoalmente (BRASIL, 2010).

O pedido é recepcionado pelo SNPC e transformado em um processo. A análise do processo é iniciada pelos componentes formais, dados cadastrais e documentação obrigatória. Somente após estar minimamente instruído é que se passa a análise técnica onde se consideram os resultados dos testes de DHE obtidos

e a descrição da cultivar candidata. As características informadas são lançadas numa base de dados do SNPC, separada por espécie, que armazena as descrições de todas as outras cultivares da mesma espécie que deram entrada ou foram examinadas pelo SNPC. A diferenciação da cultivar candidata é feita por meio de comparação com as descrições já documentadas. Quando a cultivar for diferenciada de forma confiável, com uma margem segura, e, as demais exigências tiverem sido cumpridas ela é protegida. No entanto, quando uma ou mais cultivares conhecidas não puderem ser distinguidas claramente da candidata, estas deverão ser comparadas lado a lado, por meio de teste de campo ou outros exames (SANTOS; PACHECO, 2011).

### **3.5.2 Concessão do título de proteção**

Obtido o Certificado de Proteção de Cultivar, o titular é obrigado a manter, durante todo o período de proteção, amostra viva da cultivar protegida à disposição do órgão competente, sob pena de cancelamento da proteção se, caso for notificado, não a apresentar no prazo de sessenta dias (BRASIL, 1997).

A proteção da cultivar recairá sobre o material de reprodução ou de multiplicação vegetativa da planta inteira. Sendo assim, protege-se materialmente as sementes, mudas, tubérculos e qualquer parte da planta que possa ser usada para gerar novas plantas da cultivar. A proteção assegura a seu titular o direito à reprodução comercial no território brasileiro, ficando vedado a terceiros, durante o prazo de proteção, a produção com fins comerciais, o oferecimento à venda ou a comercialização, do material de propagação da cultivar, sem sua autorização (BRASIL, 1997).

A proteção da cultivar vigorará, a partir da data da concessão do Certificado Provisório de Proteção, pelo prazo de quinze anos, com exceção das videiras, árvores frutíferas, árvores florestais e árvores ornamentais, inclusive o seu porta-enxerto, para as quais a duração será de dezoito anos. Decorrido o prazo de vigência do direito de proteção, a cultivar cairá em domínio público e nenhum outro direito poderá obstar sua livre utilização (BRASIL, 1997).

### **3.6 Fiscalização do cumprimento da LPC**

Apesar de ter sido um dos fatores relevantes para o impulso da agricultura, a LPC tem sua efetividade sendo francamente minada e as sementes resultantes dos investimentos da pesquisa vêm sendo apropriadas por oportunistas, que as produzem e comercializam sem oferecer o devido reconhecimento da propriedade conferida aos melhoristas das novas cultivares (AVIANI et al., 2012).

A soja, por ter grande importância econômica é alvo desse comportamento oportunista, pois a replicação de sementes melhoradas é facilitada pela sua fisiologia reprodutiva. A planta é uma espécie autógama, e isso significa que os genes possuem alto grau de homozigose e ela reproduz sua genética com facilidade, não necessitando da aplicação de qualquer técnica para obter sementes de elevada pureza genética. Isso faz com que seja mais susceptível à pirataria e requeira elevados investimentos dos titulares de proteção para defesa dos seus direitos (AVIANI et al., 2012).

Um aspecto importante a ser avaliado em relação à LPC é a extensão de sua aplicabilidade prática. Ela somente atingirá seu propósito, qual seja, de incentivar a geração contínua de novas cultivares aperfeiçoadas, se o uso não autorizado das cultivares protegidas for passível de fiscalização. Segundo Araújo (2010), esse papel é exercido, em parte, pelo Estado, que tem autoridade para apurar transgressões e punir os infratores. Cabe ao titular do direito de proteção também observar e denunciar irregularidades às autoridades competentes.

A forma mais comum de violação dos direitos de cultivares protegidas é a multiplicação de sementes sem a autorização do titular da proteção. Geralmente os transgressores estão restritos espacialmente. São, na maioria das vezes, produtores de sementes ou agricultores que produzem em suas propriedades rurais, sementes conhecidas como “piratas”, comercializadas de maneira informal.

Estabelece a LPC em seu Artigo 37 que:

aquele que vender, oferecer à venda, reproduzir, importar, exportar, bem como embalar ou armazenar para esses fins, ou ceder a qualquer título, material de propagação de cultivar protegida, com denominação correta ou com outra, sem autorização do titular, fica obrigado a indenizá-lo, em valores a serem determinados em regulamento, além de ter o material apreendido, assim como pagará multa equivalente a vinte por cento do valor comercial do

material apreendido, incorrendo ainda, em crime de violação dos direitos do melhorista (BRASIL, 1997).

Com isso, a LPC contempla mecanismos de defesa dos direitos dos titulares da proteção, que podem ir de ações administrativas até penais. No entanto, para exercício desses direitos existem custos de transações que são os custos associados à transferência, captura e proteção de direitos (BARZEL, 1994).

Segundo Barzel (1994), a efetividade das restrições legais depende de seu cumprimento, fiscalização e monitoramento. O monitoramento dos direitos de propriedade, se efetuado pelo Estado, resulta em altos custos para a sociedade e, em se tratando de um direito privado, as ações em defesa são, em grande parte, assumidas, pelos detentores do título de propriedade intelectual (AVIANI et al., 2012).

A apropriação indevida pode ocorrer de diversas formas e a proteção também é multidimensional. O Estado através da força policial e do poder judiciário disponibiliza meios institucionais para botar em prática os direitos de propriedade. No entanto, o Estado não é o agente mais eficiente em termos de proteção (BARZEL, 1994).

Atuando de forma a complementar o arcabouço legal de observância ao direito do obtentor existente na LPC, a legislação sobre produção, comercialização e utilização de sementes e mudas constitui-se importante instrumento jurídico para a organização do setor. A Lei de Sementes e Mudas fornece à administração pública os mecanismos necessários para coibir os eventuais desvios no sistema e o uso indevido desses insumos, cujo valor não se restringe ao custo de produção total da lavoura, mas ao sucesso da atividade agrícola, posto que são sobre eles que atuam os demais insumos. A legislação de sementes e mudas permite que o Estado exerça o poder de polícia na defesa da propriedade intelectual, para que haja o desenvolvimento do agronegócio pela inovação e pela geração de cultivares modernas (LEITE; CAMPOS, 2011).

A violação dos direitos dos obtentores não pode ser vista como uma causa exclusivamente do titular do direito posto que causa prejuízo à toda a sociedade, através do desestímulo ao investimento na obtenção de novas cultivares provocado por ineficiente observância dos direitos privados. Assim, a defesa dos direitos dos obtentores depende de um trabalho colaborativo entre o setor público, aplicador das legislações relativas a sementes e cultivares, e a iniciativa privada, a quem cabe

acionar os canais competentes, sobretudo da esfera judicial para reaver prejuízos ocasionados pela apropriação das cultivares protegidas (LEITE; CAMPOS, 2011).

### **3.7 Uso de marcadores moleculares na proteção de cultivares**

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a seleção assistida por marcadores moleculares, visando uma maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Marcadores moleculares relacionados a diferentes características de importância econômica têm sido desenvolvidos, a fim de permitir a seleção indireta de características desejáveis de forma precoce em gerações segregantes. Esta estratégia é utilizada para reduzir o tempo, fontes e energia necessários não apenas para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas para esticar parâmetros usados na seleção indireta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares também podem apresentar diversas finalidades no pós-melhoramento de plantas, como para certificar a pureza genética das sementes de uma cultivar. Quando a análise visual deixar dúvidas sobre a presença de sementes de outras cultivares, marcadores podem ser usados para identificar mistura varietal, em processos de certificação de sementes, em estágios de produção comercial. Também na propriedade intelectual marcadores moleculares podem ser úteis para caracterização molecular de variedades (ALMEIDA et al., 2009; SANTOS et al, 2010; SOUSA et al., 2013). Em caso de incerteza sobre a genealogia de alguma cultivar, os marcadores podem ser úteis para identificar os parentais utilizados na obtenção de uma cultivar (BORÉM; CAIXETA, 2009). Além disso, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramentas auxiliares nas análises de processos, como na identificação de cultivares em caso de uso indevido e em atividades de fiscalização (SOUSA et al., 2013).

Os perfis genéticos (“*fingerprinting*”), que podem ser obtidos com o uso dos marcadores, não possuem caráter decisivo, mas ainda assim podem ser anexados ao pedido de proteção pelos obtentores, com a finalidade de caracterizar a cultivar. O Grupo de Trabalho e Técnicas Bioquímicas e Moleculares e Perfis Moleculares (BMT), da UPOV, vêm discutindo os vários usos das técnicas moleculares para proteção de cultivares. Para o uso em atividades de apoio em proteção de cultivares, o BMT

considera dois critérios fundamentais para a seleção de métodos e marcadores moleculares: a reprodutibilidade de dados, que é obtida quando as análises de diferentes laboratórios e equipamentos, independentemente dos operadores e das condições dos testes, apresentam variabilidade mínima entre si, e a repetibilidade de dados, que define que uma análise repetida no mesmo laboratório e nos mesmos equipamentos, em ocasiões diferentes, deverá apresentar variabilidade mínima em seus resultados (UPOV, 2010). Baseando-se nesses critérios, em 2009/2010 o SNPC promoveu, em conjunto com instituições públicas e privadas do setor de melhoramento genético de soja, uma rede de ensaios visando a harmonização de procedimentos/ metodologias e a definição de *primers* para a formação de banco de dados moleculares das cultivares protegidas de soja (SNPC, 2015).

Os marcadores moleculares, quando utilizados para fins de identificação e proteção de cultivares, seguem a premissa de realização em rede para validação da técnica molecular a ser utilizada e garantir um mínimo de reprodutibilidade dos resultados. É necessário, que antes do ensaio, seja escolhido um conjunto de cultivares que apresentem alelos de referência para a inclusão de todas as análises, para que os marcadores microssatélites possam ser avaliados em diferentes laboratórios com diferentes equipamentos (UPOV, 2011). Um único fornecedor confiável deve ser o sintetizador dos *primers* ou iniciadores, que são empregados por todos os laboratórios nas reações em cadeia polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), isso reduz a possibilidade de se obter perfis de DNA divergentes, o que pode ocorrer quando se tem iniciadores sintetizados por fontes distintas.

É importante que seja criada uma coleção de amostras de referência de DNA, para ampliar a possibilidade de uso dos marcadores moleculares em uma espécie, e que sejam armazenadas de forma a evitar sua degradação (AVIANI; SANTOS, 2011).

De acordo com a UPOV (2011), os marcadores moleculares apresentam diversas aplicações, como o uso de características moleculares que estão diretamente ligadas a características fenotípicas específicas – podem ser úteis na avaliação de características tradicionais que não podem ser facilmente observadas no campo, como por exemplo, resistência a doenças. Outra aplicação é quando se faz uma combinação de diferenças fenotípicas e distâncias moleculares para identificar dentro da coleção de referência aquelas variedades que devem ser comparados com as candidatas, a fim de melhorar a seleção de variedades claramente distintas, com base

nos princípios de que existem informações confiáveis de que as distâncias moleculares são suficientemente relacionadas às diferenças fenotípicas, de tal forma que o método seleciona variedades da coleção que são mais semelhantes às variedades candidatas e o método não cria um aumento ao risco de não selecionar uma variedade na coleção que deve ser comparada com as variedades candidatas no campo. Outra aplicação dos marcadores moleculares é a identificação de cultivares quando existe a necessidade de reforçar os direitos da propriedade intelectual. Além disso os marcadores ajudam a determinar a similaridade genética entre as variedades para uso em disputas sobre cultivares essencialmente derivadas.

No Brasil, o SNPC mantém coleções de material propagativo de cultivares protegidas das espécies propagadas por sementes, além de amostras de DNA de espécies propagadas vegetativamente como videira, morango e cana-de-açúcar. Uma vez que a LPC dispõe que, na ocasião da proteção da cultivar a amostra da cultivar protegida deve ficar à disposição do SNPC, é exigido, por meio da Instrução Normativa nº 8/1999, que as sementes das cultivares protegidas de espécies previamente definidas sejam encaminhadas ao SNPC que as armazena no Laboratório de Análise, Diferenciação e Caracterização de Cultivares (LADIC). O recolhimento de alíquotas de DNA de cultivares protegidas é regulado pela Instrução Normativa 58/2009 que dispõe sobre o local para entrega das amostras, espécies ou cultivares sujeitas à apresentação de amostras, quantidade de amostras a ser entregue por cultivar, concentração mínima do DNA por amostra, volume de amostra a ser entregue, composição da solução na qual o DNA poderá ser acondicionado e o método de extração do DNA utilizado. Atualmente o LADIC mantém sementes das cultivares protegidas de aproximadamente 20 espécies (AVIANI; SANTOS, 2011).

De acordo com o banco de dados do SNPC, estão incluídas no regime de proteção 94 espécies, sendo que 10 delas já tiveram marcadores identificados e padrões de extração de DNA e análise estabelecidos. São elas: algodão, arroz, cana-de-açúcar, eucalipto, feijão caupi, maçã, morango, soja, trigo e videira (Quadro 2). Considerando que foram protegidas 2.544 cultivares pelo SNPC até o ano de 2014, e que dessas, 1.530 foram caracterizadas molecularmente, tem-se um valor maior que 50% do total.

**Quadro 2.** Quantidade de cultivares caracterizadas molecularmente e de marcadores SSR disponíveis de acordo com cada espécie.

<b>ESPÉCIE</b>	<b>CULTIVARES</b>	<b>MARCADORES SSR</b>
Algodão	103*	15
Arroz	97	16
Cana-de-açúcar	135*	20
Eucalipto	78	25
Feijão caupi	12	20
Maçã	21	15
Morango	17	20
Soja	881*	15
Trigo	164	15
Videira	22	15
<b>Total de cultivares</b>	<b>1.530</b>	

\*Incluindo cultivares de domínio público

Fonte: SNPC, 2015.

### **3.8 Tipos de marcadores moleculares**

Entre os marcadores moleculares com capacidade de repetibilidade e reprodutibilidade estão os microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR), os *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNP) e os *Sequence-characterized Amplified Regions* (SCAR) (UPOV, 2013).

Os marcadores SSR baseiam-se na técnica da reação em cadeia da polimerase e estão sendo muito difundidos atualmente e são os mais utilizados no processo de proteção de cultivares. Oferecem vantagens como expressarem-se de modo codominante; serem facilmente avaliados; mapearem diferentes regiões do cromossomo; e terem elevado poder de detecção, de reprodutibilidade dos alelos em diferentes sistemas de detecção e nível de polimorfismo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

#### **3.8.1 Marcadores microssatélites**

Os genomas eucariotos são povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*). As diferentes repetições encontradas são divididas em repetições perfeitas, quando não apresentam interrupção; repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; repetições compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacentes; e repetições simples, quando o microssatélite é formado por apenas uma repetição. As repetições simples e compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos em diversas espécies de plantas cultivadas. Esses marcadores estão substituindo rapidamente outros tipos de marcadores, principalmente devido à sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, a pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

O alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivada de híbridos de genótipos relacionados. Essa grande variabilidade dos microssatélites e a possibilidade de

utilizá-los em qualquer população segregante, os tornam marcadores ideais para o mapeamento genético (BORÉM; CAIXETA, 2009).

### 3.8.2 Marcadores SNPs

SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) é uma classe de marcadores moleculares que se baseiam na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de uma única base no genoma. Para que a variação seja considerada SNP, ela tem que ocorrer em pelo menos 1% da população (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os SNPs passaram a ter maior importância com sequenciamento do genoma humano, mas na área vegetal também vem se desenvolvendo. É permitido evidenciar a presença de SNPs em sequenciamentos de larga escala em espécies como *Arabidopsis thaliana* (SCHMID et al., 2003), *Oryza sativa* (FELTUS et al., 2004), *Glycine max* (ZHU et al., 2003), *Cucumis melo* (MORALES et al., 2004) e *Zea mays* (BATLEY et al., 2003). A redução dos custos de sequenciamento do DNA e o desenvolvimento de outras técnicas têm acelerado a descoberta de SNP em genoma de plantas.

Segundo Weiner e Hudson (2002), os marcadores genéticos SNPs, geralmente, possuem natureza bi-alélica e são abundantes no genoma, podendo ocorrer tanto em regiões expressas quanto em não-expressas.

Os marcadores SNPs têm sido fundamentais na análise de genes e nas descobertas da base genética molecular de importantes características vegetais. Como exemplos, em arroz, cita-se a descoberta de SNPs envolvidos com a qualidade de cozimento e processamento (LARKIN; PARK, 2003; BORMANS et al., 2002) e do aroma (JIN et al., 2003).

A comparação direta de SNPs tem sido utilizada também para estudos de genéticas de populações e filogenia (JIN et al., 2003). O uso destes marcadores na identificação de variedades, na construção de mapas genéticos e físicos e nas análises funcionais também tem se desenvolvido, onde pode ser usado como grande ferramenta no processo de proteção de cultivares (BORÉM; CAIXETA, 2009).

### 3.8.3 Marcadores SCAR

SCAR – *Sequence Characterized Amplified Regions*, ou “regiões amplificadas caracterizadas por sequências” é uma categoria de marcador molecular desenvolvida por conversão de determinado marcador em outro. Esta técnica serve para converter determinada banda, que seja difícil de ser interpretada ou que tenha baixa reprodutibilidade, em um marcador altamente fidedigno (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Como proposto originalmente (PARAN; MICHELMORE, 1993), SCAR é a conversão de marcadores RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*, que são obtidos com *primers* de sequência arbitrária em marcadores de sequência específica. De acordo com sua concepção original, SCAR são sequências de DNA genômico localizados em um loco definido geneticamente, que são identificados por amplificação via PCR, utilizando um par de *primers* específicos. De acordo com Paran e Micheltmore (1993), SCAR pode conter sequências de DNA repetitivo e são usados não somente como pontos de referência física no genoma, mas também como marcadores genéticos.

O procedimento para se desenvolver marcadores SCAR consiste no isolamento e na clonagem do fragmento de interesse em um vetor, geralmente um plasmídeo. Os plasmídeos contendo os fragmentos de DNA desejados são utilizados para transformar bactérias. Entre as colônias transformadas, deve-se separar aquelas que apresentam o fragmento do DNA desejado. Em seguida, deve-se promover o crescimento das colônias selecionadas e extrair o DNA do plasmídeo, que deve apresentar alta pureza, pois esse será sequenciado. Posteriormente, pares de *primers* específicos são desenhados. Os pares de *primers* STS – *Sequence Tagged Sites* ou SCAR desenvolvidos devem passar por testes de validação, que consiste no teste dos *primers* em reações de PCR, para verificar se eles amplificam DNAs genômicos da espécie para a qual foram desenhados. A partir do momento em que forem validados, os *primers* poderão ser empregados em análises de rotina de laboratórios (BORÉM; CAIXETA, 2009).

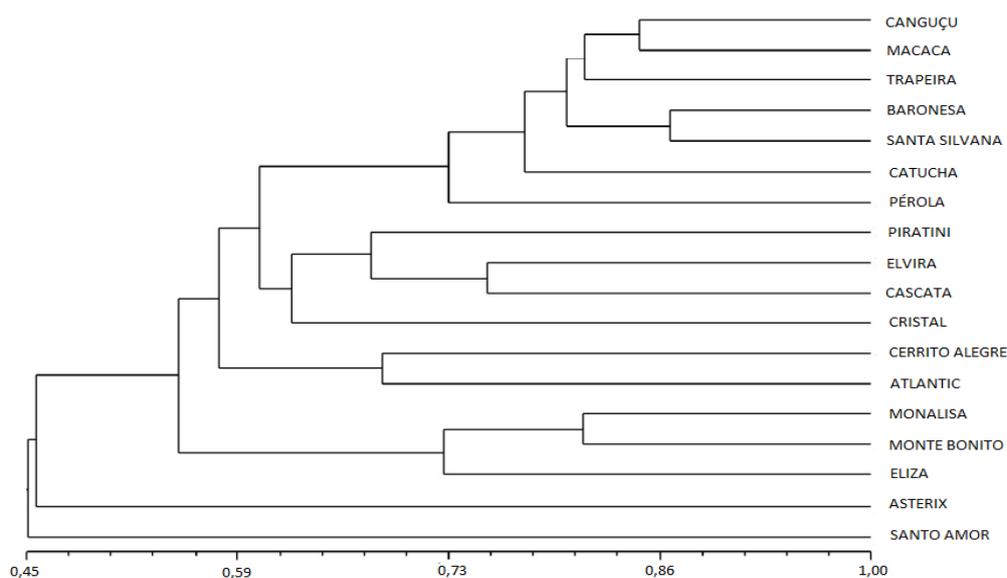
#### 4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O método utilizado para o desenvolvimento do trabalho foi o levantamento de artigos que descrevem aplicações e resultados obtidos pelo uso de marcadores moleculares em espécies diferentes, buscando inferir sobre a eficácia dessa tecnologia no processo de proteção de cultivares, sendo na caracterização, diferenciação ou identificação.

Castro et al. (2008) testaram marcadores SSR em batatas no intuito de avaliar a possibilidade de adoção de testes moleculares como informações complementares aos descritores morfológicos usados para auxiliar no registro e proteção de cultivares. Para a realização do experimento foram caracterizadas 18 cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.), entre estas, 14 de origem brasileira, desenvolvidas em programas de melhoramento genético no Sul do Brasil, três europeias e uma americana. A caracterização das variedades foi realizada com base em 12 *primers* SSR. Como resultado, foi observado que os *primers* analisados permitiram separação das 18 cultivares avaliadas, atestando a possível capacidade dos marcadores SSR em discriminar e identificar variedades de batata (SPOONER et al., 2005).

Através da análise de correlação genética foi produzido um dendrograma (Figura 1) com as distâncias moleculares entre os materiais testados.

**Figura 1.** Distâncias genéticas de 18 cultivares de batata a partir da análise de 12 marcadores SSR.



(Fonte: Castro et al., 2008).

Os autores concluíram que os dados encontrados podem apoiar a utilização de marcadores SSR como informações complementares aos descritores morfológicos no processo de proteção de cultivares. Entretanto, ressaltaram que, para que essa técnica possa ser empregada de forma que venha a contribuir com o processo de proteção de cultivares, é importante que haja padronização dos protocolos. É necessário também que as técnicas sejam calibradas com genótipos comuns para servirem de referência na padronização e possibilitarem a comparação de cultivares analisadas em laboratórios distintos. Os resultados encontrados no trabalho mostraram que os marcadores SSR têm potencial discriminatório, mesmo quando analisadas cultivares de batata com alto grau de parentesco (CASTRO et al., 2008).

Vieira et al. (2009), conduziram um trabalho com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de cultivares de soja com marcadores microssatélites utilizando a técnica de gel de agarose para leitura das distâncias genéticas. Embora tenha limitações quanto à precisão e repetibilidade, essa técnica é acessível a diversos laboratórios e de baixo custo, permitindo, por exemplo que, em casos de fiscalização por uso indevido, cultivares de soja possam ser identificadas utilizando-se poucos recursos. Partindo de 283 marcadores SSR testados em 23 cultivares, foram selecionados 53 marcadores que apresentaram polimorfismo para utilização. Posteriormente esses marcadores foram usados na caracterização de 53 cultivares oriundos de diferentes programas de melhoramento, escolhidos pela sua representatividade do genoma de soja brasileiro (Quadro 3).

**Quadro 3.** Cultivares de soja utilizadas na caracterização molecular de diferentes instituições.

<b>CULTIVARES</b>	<b>INSTITUIÇÃO</b>
CD 201, CD 202, CD 203, CD 204, CD 205, CD 206, CD 207, CD 208, CD 209, CD 210, CD 211, CD 212RR, CD 213RR, CD 214RR, CD 215, CD 216, CD 217, CD 218, CD 219RR, CD 220, CD 221, CD 222, CD 223AP, Ocepar 4	Coodetec
BR 16, BRS 133, BRS 134, BES 154, BRS 184, BRS 232, Embrapa 48, Embrapa, 59, BRS Samambaia, BRSMG 68 Vencedora, BRSMG Liderança, BRSMT pintado, BRSMT Crixás, BRSMT Uirapuru, BRSGO Jataí, MG/BR Conquista	Embrapa
Emgopa 315, Emgopa 316	Emgopa
FT Abyara, FT Cristalina	FT Sementes
Msoy 6101, Msoy 8001, Msoy 8400, Msoy 8914, Msoy 9350	Monsoy
Spring, Vmax	Syngenta
DM Nobre	Pioneer
IAS 5	Domínio Público

(Fonte: Vieira et al., 2009)

A análise de DNA pode ser utilizada no processo de fiscalização, podendo ajudar o Estado no combate a irregularidades. É também de grande benefício ao próprio obtentor, visto que, suas cultivares poderiam ser mais facilmente identificadas em situações de fraudes e uso indevido (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os resultados obtidos com os materiais testados, inclusive oriundos de distintos programas de melhoramento, podem indicar a existência de grande variabilidade genética no germoplasma brasileiro de soja (VIEIRA et al., 2009).

Foi concluído pelos autores que os marcadores selecionados para a realização do trabalho podem ser utilizados para detectar a variabilidade e a identidade genética das cultivares de soja. Inferiram ainda que as informações adquiridas poderiam ser

utilizadas para distinguir genótipos que foram considerados iguais com base nos descritores morfológicos nos processos de registro e proteção de cultivares. Além disso, poderiam ser úteis na comprovação da identidade genética de uma cultivar. No entanto, para que os dados obtidos a partir do gel de agarose sejam utilizados em processo de identificação genética de cultivares, seria necessário que fosse feita a análise comparativa das amostras a serem distinguidas no mesmo gel (VIEIRA et al., 2009).

Outra espécie que apresenta experimentos nessa área é a cana-de-açúcar. Almeida et al. (2009), escreveram sobre a caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. Com o constante aumento do desenvolvimento de novas cultivares nas últimas décadas, vem crescendo o interesse pela caracterização de cultivares, devido à necessidade de proteção e à competição do mercado (MILACH, 1999). A vantagem de se utilizar os descritores de DNA é que eles representam todo o genótipo, mantendo os resultados consistentes, evitando o problema da expressão do fenótipo (WUNSCH; HORMOZA. 2002).

O método ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) tem sido amplamente utilizado nos estudos de análise molecular por ser uma técnica simples, eficiente, apresentar alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY et al., 2002). O objetivo do trabalho foi acessar a viabilidade da técnica PCR-ISSR, no estudo do genoma de cultivares de cana-de-açúcar e detectar variações, ao nível de DNA, dentre as quatorze cultivares selecionadas para o estudo.

Foram utilizados 37 *primers* ISSR na amostra de DNA das quatorze cultivares de cana selecionadas. Do total de *primers* testados, oito forneceram produtos nítidos de amplificação e boa reprodutibilidade. A similaridade genética entre as cultivares calculada com base nos dados moleculares apresentou resultados consistentes, pois não ocorreu interferência do ambiente, o que é comum em dados fenotípicos. Esses resultados sugerem que os marcadores ISSR são promissores no acesso da diversidade genética e identificação de *fingerprinting* de DNA, demonstrando potencial para identificar marcadores cultivar-específicos em cana-de-açúcar (ALMEIDA et al., 2009).

É sabido que os descritores morfológicos apesar de serem fundamentais para a caracterização, em alguns casos, não têm grande peso na escolha de variedades por parte do agricultor quanto à cultivar que irá plantar (talvez mais quando se tratar

de uma ornamental). Os descritores fisiológicos são mais importantes pois fornecem informações, como resistência a doenças, adaptação da cultivar, ciclo e têm papel fundamental na divulgação das características agronômicas de materiais genéticos novos.

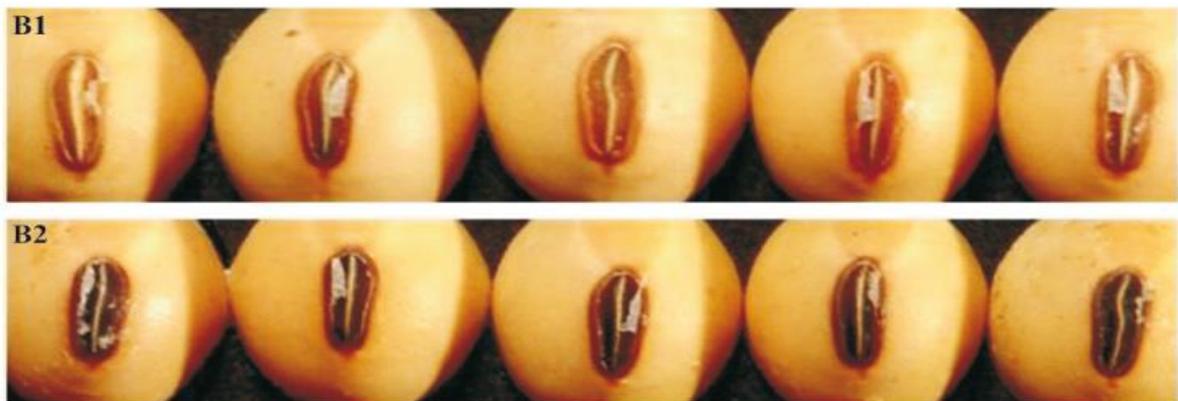
Sobre isso, segundo um exemplo apresentado por Schuster et al. (2006), as diferenças visualizadas em um descritor de semente de soja de uma dada cultivar, que normalmente indicariam mistura varietal, podem não ser genéticas, e sim consequência de influências do ambiente que deixariam algumas sementes fora do padrão da cultivar. Sem essa distinção, lotes dessas sementes correriam o risco de serem descartados, trazendo prejuízos para o produtor. Em certos casos, a análise visual não seria suficiente para afirmar se tais alterações são de causa ambiental ou se são misturas genéticas existentes na amostra. Para esclarecer questões como essa, os marcadores moleculares vêm se destacando como uma ferramenta tecnológica para o controle de qualidade das cultivares.

Marcadores microssatélites têm sido utilizados na determinação da pureza varietal em programas de melhoramento e em etapas de produção de sementes, com objetivo de garantir a qualidade genética das sementes. Rabel et al. (2010) realizaram um experimento com marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. O trabalho quis demonstrar que, com auxílio de marcadores moleculares, variações na coloração do hilo em sementes de soja, muitas vezes não constituem variação genética. Foram avaliadas sementes de soja da cultivar CD 222, que apresenta sementes com hilo preto, e de duas linhagens (CD 02RV-8444 e CD 01RV-7618), que apresentam sementes com hilo marrom. As sementes que apresentaram variação na coloração e tonalidade do hilo foram separadas visualmente em grupos. Posteriormente, o DNA de cada semente foi extraído e analisado com marcadores microssatélites em “bulks” contendo DNA de cinco sementes.

As diferenças visuais encontradas na coloração do hilo da cultivar CD 222, que foi separada em dois grupos, variaram do preto para o marrom (Figura 2), o que não implicou em diferenças genéticas na avaliação dos 16 locos microssatélites. As sementes da linhagem CD 02RV-8444 foram separadas em três grupos e todos eles apresentaram sementes com hilo de cor marrom, apenas variando na tonalidade mais intensa até a cor marrom menos intensa (Figura 3). Também não foram detectadas

diferenças genéticas. As variações observadas na cor do hilo apresentadas na cultivar CD 222 e na linhagem CD 02RV-8444 podem ser atribuídas a influências de fatores ambientais durante o processo de formação de sementes. Nas sementes da linhagem CD 01RV-7618 que deveriam possuir hilo marrom, foram divididas em quatro grupos, no grupo B1 as sementes apresentaram cor de hilo marrom com pigmentação preta e nos demais grupos a coloração variou de marrom mais forte para mais claro (Figura 4).

**Figura 2.** Análise da pureza genética em semente de soja da cultivar CD 222 com variação na cor do hilo. B1: sementes com hilo marrom claro; B2: sementes com hilo preto padrão da cultivar.



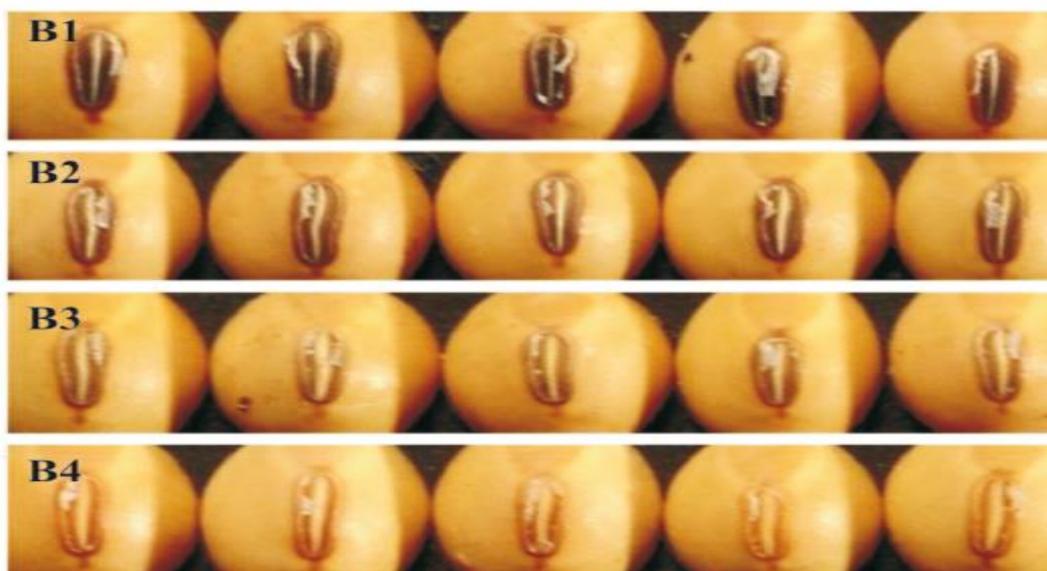
(Fonte: Rabel et al., 2010)

**Figura 3.** Análise da pureza genética em semente de soja da linhagem CD 02RV-8444 com variação na cor do hilo. B1: sementes com hilo marrom mais intenso; B2: sementes com hilo marrom intermediário; B3: sementes com hilo marrom menos intenso.



(Fonte: Rabel et al., 2010)

**Figura 4.** Análise da pureza genética em semente de soja da linhagem CD 01RV-7618 com variação na cor do hilo. B1: sementes com hilo marrom com pigmentação preta; B2: sementes com hilo marrom intenso; B3: sementes com hilo marrom intermediário; B4: sementes com hilo marrom menos intenso.



(Fonte: Rabel et al., 2010)

Os diversos autores citados neste trabalho consideram que a utilização de apenas descritores morfológicos nos testes de pureza genética de sementes de soja não é totalmente confiável, podendo levar à aprovação ou à condenação errônea de lotes de sementes. Sendo assim, a utilização de marcadores moleculares, como ferramenta auxiliar na complementação dos descritores morfológicos de sementes, é importante no caso de haver dúvidas no momento da análise.

O marcador molecular microssatélite SSR também foi utilizado para a caracterização de cultivares de cebola. Nessa espécie Santos et al. (2010) verificaram que o número de SSR disponíveis é limitado e alguns apresentam uma aplicação complexa (JAKSE et al., 2005). De acordo com esses autores, o desenvolvimento de marcadores moleculares para cebola é dificultado pois ela apresenta um genoma poliplóide, que é 36 vezes maior em comparação ao do arroz, além de apresentar alto nível de heterozigose.

A aplicação de SSR em estudos de diversidade genética ou de apoio à proteção de cultivares de cebola foi descrita por Fischer e Bachmann (2000), Jakse et al. (2005) e Mahajan et al. (2009). O objetivo do trabalho foi estabelecer padrões alélicos e estimar as distâncias genéticas baseadas em marcador SSR de 44 cultivares de cebola adaptadas às condições de cultivo brasileiras, com o intuito de gerar um banco de dados que pudesse servir de referência e apoio à proteção de cultivares e a programas de melhoramento da espécie no Brasil. As cultivares apresentaram um coeficiente de similaridade entre 40 e 86%, o que mostrou a alta variabilidade genética da coleção de germoplasma de cebola avaliada.

Os grupos formados no trabalho citado indicaram uma proximidade muito grande entre os três principais tipos agrônômicos brasileiros, isso se deve ao manejo, seleção, recombinação genética e produção de sementes em áreas geográficas quase contínuas do Sul do Brasil. As conclusões foram que os 40 alelos dos 13 locos SSR empregados são eficientes para separar todas as 44 cultivares de cebola avaliadas e essas cultivares formam sete grupos principais de similaridade, que apresentam concordância com sua procedência e seu tipo agrônômico (SANTOS et al., 2010).

Quando não for possível distinguir cultivares de cebola com um dado conjunto de marcadores já estabelecidos, Jakse et al. (2005) sugerem a utilização de marcadores adicionais para revelar diferenças genéticas.

Além de sua aplicação na caracterização da cebola, os marcadores moleculares mostraram-se úteis na caracterização do café. O tema foi abordado por Sousa et al. (2013) em trabalho que descreve a caracterização molecular de cultivares de café resistentes à ferrugem.

Pesquisas realizadas na área de melhoramento genético do cafeeiro no Brasil resultaram na obtenção de cultivares superiores, com potencial produtivo maior que as cultivares tradicionais. Atualmente estão registradas no Registro Nacional de Cultivares, ou seja, para reprodução e comercialização de mudas, 123 cultivares de *Coffea arabica*, sendo 71 resistentes ou tolerantes à ferrugem. Apesar do número de cultivares disponíveis, os genótipos apresentam fenótipos similares. Isso se deve à base genética estreita e o processo de melhoramento da espécie, tornando assim, a discriminação e identificação correta das cultivares pelos seus descritores morfológicos mais difícil. Uma alternativa para complementar os descritores morfológicos do café seria o uso de marcadores moleculares (SOUSA et al., 2013).

Foram analisadas 34 cultivares/progênes de *C. arabica* portadoras de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), dentre essas 26 cultivares, cinco progênes elite resistentes à ferrugem, além de três cultivares suscetíveis a essa doença. Os 34 genótipos de café foram selecionados para estudo devido à sua importância e por serem de difícil discriminação fenotípica. Por fim, o perfil molecular das cultivares/progênes foi estabelecido, mas concluiu-se que seria necessário o uso de outros marcadores microssatélites polimórficos para gerar perfil molecular único para cada cultivar.

Na prática constatou-se que o SNPC, desde 2009, vem aplicando a análise do DNA por marcadores microssatélites em cultivares de espécies como soja, arroz, algodão e eucalipto para o manejo de ensaios de DHE e como um dos itens de conformidade de cultivares que são candidatas à proteção (SNPC, 2015).

Os marcadores com potencial para utilização na caracterização de cultivares devem atender aos critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade e que, para que a caracterização molecular de cultivares possa ser utilizada de forma generalizada, é necessária a adoção que procedimentos padronizados de genotipagem molecular. Para a proteção de cultivares, além dos aspectos de codominância, estabilidade genética, baixa mutabilidade e robustez analíticas, é de extrema importância que o marcador molecular utilizado permita determinar com

precisão os alelos e com isso fazer comparações acuradas de resultados em diferentes momentos e entre diferentes laboratórios (SCHUSTER et al., 2006).

Apesar das perspectivas levantadas pela pesquisa, a UPOV traz como abordagem acordada por seus países membros que o uso de marcadores moleculares no contexto do teste de DHE é aceito nas seguintes: para a análise das características da cultivar, desde que satisfaçam os critérios definidos nas diretrizes e levando-se em conta a existência de uma ligação segura entre o marcador e a característica; para embasar a escolha de cultivares a serem comparadas com a cultivar candidata à proteção no ensaio de DHE combinando-se as distâncias moleculares às diferenças fenotípicas – quando essas forem suficientemente relacionadas e o método minimizar o risco de serem selecionadas cultivares muito distintas dentro da coleção de referência, ou de não serem incluídas cultivares muito parecidas comparada com as cultivares candidatas à proteção (UPOV, 2013).

As aplicações dos marcadores moleculares pelo SNPC, não por acaso, coincidem com as abordagens preconizadas pela UPOV vistas anteriormente, haja vista a cautela requerida quando se trata de direitos de terceiros. Assim, por aumentar a segurança da proteção, sempre que é possível, o SNPC lança mão da caracterização de cultivares por marcadores específicos, sobretudo por auxiliar, com rapidez, os trabalhos de identificação.

Não obstante já efetuar a guarda de amostras vivas das cultivares protegidas das espécies propagadas por semente com maior importância econômica, o SNPC pode solicitar aos obtentores, amostra viva de cultivares de outras espécies, para testes e análises, principalmente em caso de suspeitas de fraude ou uso indevido. A identificação da cultivar é essencial para caracterizar a infração cometida contra a cultivar protegida e uma das formas mais rápidas de identificação de cultivares é por meio do uso de marcadores moleculares. O uso dessa ferramenta tem sido bem-sucedido e vem, a cada dia, ganhando mais espaço sobretudo na esfera judicial, dada a sua tempestividade, precisão e eficácia. Sendo instado a emitir parecer quanto à identidade genética de cultivares envolvidas em infrações, o SNPC pode apresentar resultados de análises de similaridade genética os quais, embora guardem uma pequena margem de erro, quando somados aos dados fenotípicos que embasaram a proteção das cultivares, e pelo seu caráter excludente, conferem segurança nos julgamentos.

Algumas vantagens de utilizar-se marcadores moleculares são: melhoria na gestão de coleções de variedades, de forma a levar um menor número de variedades a serem comparadas nos testes de campo; uso de dados moleculares que não são suscetíveis ao ambiente; possibilidade de utilizar caracterizações moleculares de diferentes laboratórios quando o conjunto de marcadores e o protocolo dos laboratórios são padronizados; com o uso de uma quantidade razoável de marcadores é possível avaliar a homogeneidade de lotes de sementes ou de outros materiais testados, tendo em vista que no teste molecular a influência ambiental é anulada. As principais limitações para o uso de marcadores moleculares são: menor aplicabilidade para espécies com populações ou variedades sintéticas (obtidas a partir de polinização aberta), o custo de identificação de marcadores confiáveis e a disponibilidade de variabilidade de genótipos dentro das espécies eleitas para caracterização molecular (UPOV, 2013).

O avanço da biologia molecular tem levado ao desenvolvimento e à introdução de vários tipos de marcadores moleculares. A escolha do marcador molecular a ser utilizado depende de uma série de fatores. Para que se tenha sucesso na escolha deve-se: conhecer bem, na teoria e na prática, os vários tipos de marcadores moleculares, suas vantagens e desvantagens; verificar os marcadores que estão disponíveis para a espécie a ser estudada; conhecer profundamente a espécie, em sua base genética, seu modo de reprodução e evolução; avaliar a disponibilidade de estrutura física, recurso financeiro, recurso humano e equipamentos; e analisar o objetivo do trabalho que será realizado, para saber se o uso dos marcadores e seu custo será vantajoso ou não.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência do estímulo que a Lei de Proteção de Cultivares dá para a crescente geração de novas variedades, a demanda pela caracterização molecular de genótipos tende a aumentar no Brasil nos próximos anos. O uso de marcadores moleculares vem se destacando não só por assistir o melhoramento genético de plantas, mas também para fornecer informações sobre o nível de diversidade genética existente nas coleções, como por exemplo, em grupos de cultivares comerciais, e pela possibilidade de obter-se de forma, cada vez mais precisa, a caracterização molecular/genética de cultivares.

Os marcadores moleculares vêm, desse modo, servindo de complemento à caracterização morfológica e agrônômica tradicional. Entre os benefícios de sua utilização estão: a possibilidade de cobrir todo o genoma; de não serem influenciados pelo ambiente; de apresentarem técnicas opcionais simples e acessíveis e de não dependerem do estágio de desenvolvimento da planta e do ambiente em que ela se encontra.

Eles podem ser utilizados também como ferramenta auxiliar para organizar os testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade das cultivares candidatas à proteção. Além disso, depois da proteção ser concedida, em caso de fiscalização por uso indevido, informações duvidosas e pirataria, os marcadores podem auxiliar na identificação de cultivares, para certificar o direito do obtentor e evitar fraudes.

Apesar de sua aplicabilidade e eficiência em processos de proteção, essa técnica não é muito viável na prática fora do âmbito do SNPC. Como a quantidade de sementes produzidas no país é muito grande, principalmente de soja, a técnica de marcador não é tão rápida quanto a entrada de sementes nos laboratórios, causando um grande acúmulo e fila de espera para resultados, com isso, em rotina laboratorial, essa ferramenta se torna menos eficiente.

Dependendo do estágio de desenvolvimento das tecnologias, da importância econômica da espécie, do seu nível de domesticação e da frequência de utilização, os marcadores moleculares podem apresentar custos variáveis para utilização, vindo a apresentar limitações de uso quando se tratar de espécies de menor relevância econômica, no entanto, esses custos vêm diminuindo e tendem a cair cada vez mais no futuro, tornando essa ferramenta mais acessível.

Outra limitação da aplicação de marcadores moleculares é a dificuldade de padronização de protocolos que possam ser adotados por diferentes laboratórios, o que geraria divergência nos resultados, mas atualmente, os próprios laboratórios trabalham em rede, para evitar falhas e estabelecer limites de tolerância na variabilidade dos resultados encontrados.

Ainda não se vislumbram os marcadores como substitutos dos descritores fenotípicos no processo de proteção de cultivares. Esses continuam sendo o método mais difundido, acessível e eficaz para efeito de outorga de direitos de propriedade intelectual sobre cultivares. Todavia, os marcadores despontam como uma ferramenta adicional para complementar os dados de observações efetuadas e para auxiliar na tomada de decisão em testes adicionais que eventualmente se façam necessários.

O desenvolvimento de estudos para aplicação de marcadores moleculares está condicionado investimentos e ao empenho de pesquisadores treinados na área. Em que pesem as dificuldades enfrentadas pela pesquisa científica no setor público, levando-se em conta a importância da agricultura e do mercado de sementes, e a garantia de retorno proporcionada pela Lei de Proteção de Cultivares, nota-se o empenho do setor privado em aperfeiçoar os mecanismos de fortalecimento do direito do obtentor e de combate à pirataria. O advento da biologia molecular e, a reboque, o emprego cada vez mais facilitado e difundido das tecnologias que envolvem, por exemplo, o DNA recombinante, faz com que não haja dúvidas sobre a capacidade de avanço científico nesse ramo da ciência, levando a crer que no futuro o uso de marcadores moleculares terá ampliado consideravelmente seu papel no processo de proteção de cultivares.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, Edição Especial, p.1771-1776, 2009.

ARAÚJO, J.C. **A lei de proteção de cultivares**: análise de sua formulação e conteúdo. Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 2010. 137p.

AVIANI, D.M. Escopo do direito do titular. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.65-71.

AVIANI, D.M.; MACHADO, R.Z. União internacional para proteção das obtenções vegetais (UPOV). In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.17-22.

AVIANI, D.M.; MASCARIN, A.L.C.; JANUÁRIO, E.C.; OKAMURA, A.M. **Proteção de cultivares: medidas em defesa do direito de propriedade**. In: XV SEMINÁRIO EM ADMINISTRAÇÃO (SEMEAD), USP, 2012, São Paulo.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S.; CARVALHO, I.M.; MACHADO, V.L.S.; PACHECO, L.G.P.A. **Abordagem sobre proteção e registro de cultivares**. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS N.A.L.; RIBEIRO J.W.Q. (Eds.). Pré melhoramento, melhoramento e pós melhoramento: estratégias e desafios. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2008. p.167-183.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.155-158.

AVIANI, D.M. Requisitos para proteção. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.37-43.

BARZEL, Y. The capture of wealth by monopolists and the protection of property rights. **International Review of Law and Economics**, Washington, v.14, p.393-409, 1994.

BATLEY, J.; BARKER, G.; O'SULLIVAN, H.; EDWARDS, K.J.; EDWARDS, D. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. **Plant Physiology**, v.132, n.1, p.84-91, 2003.

BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. 2005. 969p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: DFT/UFV, 2009. 532p.

BORMANS, C.A.; RHODES, R.B.; KEPHART, D.D.; MCCLUNG, A.M.; PARK, W.D. Analysis of a single nucleotide polymorphism that controls the cooking quality of rice using a non-gel based assay. *Euphytica*, v. 128, n.2, p.26-267, 2002.

BRASIL. **Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997.** Institui a lei de proteção de cultivares. [S.l.], 1997. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/L9456.htm>>. Acesso em: 10 maio 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Curso de propriedade intelectual e inovação no agronegócio. **Introdução à propriedade intelectual e inovação no agronegócio.** 2.ed. Brasília: Mapa; Florianópolis: EaD/UFSC, 2010. 464p. (Módulo I).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Informações aos usuários dos SNPC.** 2009. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/servicos/cultivares/protecao/informacoes\\_usuarios\\_protecao/informacao\\_de\\_usuarios\\_do\\_snpc\\_outubro\\_20de\\_Outubro\\_de\\_2008.pdf](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/servicos/cultivares/protecao/informacoes_usuarios_protecao/informacao_de_usuarios_do_snpc_outubro_20de_Outubro_de_2008.pdf)>. Acesso em: 10 mai 2015.

CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S.; NOLASCO, G.; SCHÜLLER, M. **Marcadores SSR em batata: importante técnica para auxiliar no registro e proteção de cultivares.** Embrapa Clima Temperado. 2008. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31418/1/comunicado-198.pdf>>. Acesso em: 18 set 2014.

FELTUS, F.A.; WAN, J.; SCHULZE, S.R.; ESTIL, I.J.C.; JIANG, N.; PATERSON, A.H. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies indica and japonica genome alignments. *Genome Resouce*, v.14, n.9, p.18212-1819, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.

FISCHER, D.; BACHMANN, K. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus rhizirideum. *Theoretical and Applied Genetics*, v.101, n.1-2, p.153-164, 2000.

JAKSE, J.; MARTIN, W.; MCCALLUM, J.; HAVEY, M.J. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.130, n.6, p.912-917, 2005.

JESUS, O. N. **Caracterização morfológica e molecular de cultivares de bananeira.** Recife: UFRPE. 2006. 83p.

JIN, Q.; WATERS, D.; CORDEIRO, G.M.; HENRY, R.J.; REINKE, R.F. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, v.165, n.2, p.359-364, 2003.

LARKIN, P.D.; PARK, W.D. Association of waxy gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Breeding**, v.2, n.4, p.335-339, 2003.

LEITE, M.V.; CAMPOS, S.R.F. Aspectos legais da produção, comercialização, e do uso de sementes no Brasil. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.93-96.

MACHADO, R.Z. Elaboração de diretrizes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE). In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.121-142.

MAHAJAN, V.; JAKSE, J.; HAVEY, M.J.; LAWANDE, K.E. Genetic fingerprinting of onion cultivars using SSR markers. **Indian Journal of Horticulture**, v.66, n.1, p.62-68, 2009.

MILACH, S. C. K. Disponibilidade de técnicas moleculares para la caracterización varietal. In: PAGLIANO, D. (Coord.). **Calidad genética y anitaria: um instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial**. Montevideo: IICA-PROCISUR, 1999. p. 39-46.

MORALES, M.; ROIG, E.; MONFORTE, A.J.; ARUS, P.; GARCIA-MAS, J. Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.). **Genome**, v.47, n.2, p.352-360, 2004.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, n.8, p.985-993, 1993.

RABEL, M.; VIEIRA, E. S. N.; LANA, U. G. D. P.; PAIVA, E.; SEHNEM, M. A. S.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p.19-25, 2010.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17, 2002.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.1, p.49-55, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n1/a07v45n1.pdf>>. Acesso em: 18 set 2014.

SANTOS, F.S.; PACHECO, L.G.A. Testes de DHE. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.161-167.

SCHMID, K.J.; SORENSEN, T.R.; STRACKE, R.; TORJEK, O.; ALTMANN, T.; MITCHELL-OLDS, T.; WEISSHAAR, B. Large-scale identification and analysis of

genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Resource**, v. 13, n.6, p.1250-1257, 2003.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV. 2006. p.205- 220.

SILVA, H. T. **Descritores mínimos indicados para caracterizar cultivares / variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2005. 40p.

SNPC. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Banco de dados**. Brasília: MAPA, 2015.

SOUSA, T. V.; CAIXETA, E. T.; ALKIMIM, E. R.; DE OLIVEIRA, A. C. B.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Caracterização molecular de cultivares de café resistentes à ferrugem. Embrapa Café-Artigo em anais de congresso. In: **Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**, 8., 2013, Salvador. Sustentabilidade e inclusão Social. Brasília, DF: Embrapa Café, 2013. Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb\\_anais/207.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/207.pdf)>. Acesso em: 18 set 2014.

SPOONER, D.; VAN TREUREN, R.; VICENTE DE, M. C. **Molecular markers for genbank management**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126p.

TEIXEIRA, F.G.M. Instituições de pesquisa – Embrapa. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.79-81.

UPOV - Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales. Disponível em: <<http://www.upov.int>>. Acesso em: 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. **General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties of plants**, Apr. 19, 2002. Disponível em: <[http://www.upov.int/export/sites/upov/publications/en/tg\\_rom/pdf/tg\\_1\\_3.pdf](http://www.upov.int/export/sites/upov/publications/en/tg_rom/pdf/tg_1_3.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. **Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (“BMT guidelines”)**, Out. 21, 2010. Disponível em: <[http://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov\\_inf\\_17\\_1.pdf](http://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_17_1.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. **Members of the international union for the protection of new varieties of plants**, Jun. 10, 2014. Disponível em: <<http://www.upov.int/export/sites/upov/members/en/pdf/pub423.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. **Palestra proferida na União Internacional para Proteção de Novas Variedades de Plantas**. Genebra, Suíça, em 20 de março de 2013. Disponível em <[http://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/tc\\_49/tc\\_49\\_presentation\\_0.pdf](http://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/tc_49/tc_49_presentation_0.pdf)>. Acesso em 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. **Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS)**, Out. 20, 2011. Disponível em: <[http://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov\\_inf\\_18\\_1.pdf](http://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_18_1.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. **Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS)**, Out. 24, 2013. Disponível em: <[http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_15.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2015.

VIANA, A.A.N. A proteção de cultivares no contexto da ordem econômica mundial. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.11-16.

VIEIRA, E. S. N.; SCHUSTER, I.; SILVA, R. D.; OLIVEIRA, M. D. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1460-1466, 2009.

WEINER, M.P.; HUDSON, T.J. Introduction to SNPs: Discovery of markers for disease. **BioTechniques**, v.32, p.S4-S13, 2002.

WUNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Cultivar identification end genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, v. 125, n.1, p.59-67, 2002.

ZHU, Y.L.; SONG, Q.J.; HYTEN, D.L.; TASSEL, C.P.; MATUKUMALLI, L.K.; GRIMM, D.R.; HYATT, S.M.; FICKUS, E.W.; YOUNG, N.D.; CREGAN, P.B. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. **Genetics**, v.163, n.3, p.1123-1134, 2003.