



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS

MAPEAMENTO GENÉTICO DE MARCADORES DArT (*DIVERSITY
ARRAYS TECHNOLOGY*) EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

DANIEL GARCIA SILVA

Orientador:
Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Maio- 2012

DANIEL GARCIA SILVA

MAPEAMENTO GENÉTICO DE MARCADORES DArT (*DIVERSITY
ARRAYS TECHNOLOGY*) EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Co-orientador:

Prof. Dr. Evandro Novaes

Goiânia, GO – Brasil

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

S586m Silva, Daniel Garcia.
Mapeamento genético de marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*) em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) [manuscrito] / Daniel Garcia Silva. - 2012.
81 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho;
Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Novaes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Cana-de-açúcar – Melhoramento genético 2. *Saccharum spp.* 3. Cana-de-açúcar – Marcadores. I. Título.

CDU 633.61

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Daniel Garcia Silva		
E-mail:	dan_unemat@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	DF
		CNPJ:	00889834/0001-08
Título:	Mapeamento genético de marcadores DArT (Diversity Arrays Technology) em cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>)		
Palavras-chave:	Mapa de ligação integrado, marcadores moleculares e poliploides		
Título em outra língua:	Genetic mapping of DArT (Diversity Arrays Technology) markers in sugarcane (<i>Saccharum spp.</i>)		
Palavras-chave em outra língua:	Integrated linkage map, molecular markers and polyploid		
Área de concentração:	Genética e Melhoramento de Plantas		
Data defesa:	28/06/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-graduação em genética e melhoramento de plantas		
Orientador (a):	Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho		
E-mail:	asgcoelho@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Evandro Novaes		
E-mail:	novaes@agro.ufg.br		

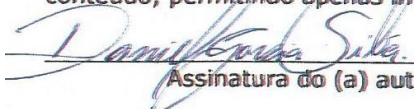
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



 Assinatura do (a) autor (a)

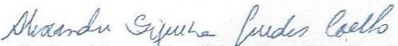
Data: 13/07/2015


¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

DANIEL GARCIA SILVA


TÍTULO: " Mapeamento Genético de Marcadores DArt (*Diversity Arrays Technology*) em Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*)"

Dissertação DEFENDIDA em 28 de Junho de 2012, e APROVADA pela Banca Examinadora constituída pelos membros:


Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho
Orientador – EA/UFG


Prof. Dr. Evandro Novaes
EA/UFG


Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov
ICB/UFG


Prof.^a Dra. Monalisa Sampaio Carneiro
UFSCar

Goiânia - Goiás
Brasil

*Aos meus pais, **João Bosco e Edna**,
pelo apoio, educação, exemplo e amor
incondicional dedicado a mim,*

*À minha querida irmã, **Paula** e meu
afilhado amado, **João Vitor**,*

*Ao meu filho, **Miguel**, sentido da
minha vida...*

DEDICO

*À minha amada esposa, **Lorena**, pelo
amor, companheirismo e paciência
nesse período tão complicado...*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Primeiramente a Deus, um porto seguro nas horas difíceis. E a minha família, por tornar tudo isso possível.

À Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA).

Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da EA-UFG: Camila, Carol, Jarênio, Keila, Milena, Ludmila, Bianca, Jocasta e à técnica Cinara, obrigado a todos pela ajuda indispensável e apoio nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandro Novaes, por ter aceitado co-orientar este trabalho, mas principalmente, por seus valiosos ensinamentos e contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da EA-UFG, pelos conhecimentos compartilhados.

À doutoranda Camila, por compartilhar seus conhecimentos envolvendo procedimentos laboratoriais e de coleta em campo.

Ao colega de mestrado e amigo Arthur, pela amizade, pela ajuda em diversas ocasiões, pela socialização do conhecimento e pelos momentos de descontração (futebol).

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL.....	14
2.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS EVOLUTIVOS DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	15
2.3 ESTRUTURA GENÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	18
2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	20
2.4.1 Melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil	23
2.5 APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR	25
2.5.1 Marcadores moleculares	26
2.5.2 Marcadores DArT	30
2.5.3 Mapeamento genético	34
2.5.4 Mapeamento genético em cana-de-açúcar	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 MATERIAL VEGETAL	42
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	42
3.3 GERAÇÃO DOS MARCADORES DArT.....	44
3.4 ANÁLISES DE SEGREGAÇÃO DOS MARCADORES DArT.....	44
3.5 CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO.....	45
3.6 ESTIMAÇÃO DO TAMANHO DO GENOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 ANÁLISES DE SEGREGAÇÃO DOS MARCADORES DArT.....	47
4.2 MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO.....	49
4.2.1 Mapa de ligação construído com dados da população de autofecundação	49
4.2.2 Mapa de ligação integrado construído com dados da população de cruzamento biparental	56
4.2.3 Mapa <i>Framework</i> integrado construído com dados da população de cruzamento biparental	63
4.3 ESTIMATIVAS DO TAMANHO DO GENOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR ..	70
5 CONCLUSÃO	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE A	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cenário proposto a partir de análises de dados moleculares para a evolução e domesticação da cana-de-açúcar (adaptado de Grivet et al., 2006). 19
- Figura 2.** Representação esquemática do genoma das variedades cultivadas, deduzido a partir das técnicas de FISH e GISH (modificado de D’Hont et al., 2005). . 22
- Figura 3.** Resumo do procedimento para geração dos marcadores DArT. A) obtenção do painel de diversidade e B) genotipagem das amostras. Fonte: Wittenberg (2007). 34
- Figura 4.** Análise das imagens e detecção de polimorfismo. A) *Array* de 96 *spots* em quadro *slides*, mostrando a diversidade de sinais de hibridização em quatro cultivares de arroz e o histograma com distribuição trimodal para os valores normalizados da razão entre a intensidade de sinais verde/vermelho. Fonte: Jaccoud et al. (2001). B) Gráficos mostrando a distribuição dos valores normalizados de cada spot para um marcador monomórfico (scPtb-383525) e um polimórfico (scPth-425947) em cana-de-açúcar. 35
- Figura 5.** A) Representação da segregação de marcadores em dose única numa progênie (F_1) e B) Esquema ilustrando os inúmeros alelos de um mesmo loco segregando. Em destaque os alelos em dose única (1:1 e 3:1) (Fonte: Albino et al., 2006). 39
- Figura 6.** Mapa de ligação correspondente ao genitor RB97327 desenvolvido a partir de dados gerados para a população originária de autofecundação. Todos os marcadores segregaram na proporção 3:1. À esquerda estão localizados os códigos referentes aos marcadores e à direita as distâncias genéticas em cM, estimadas pela função de Kosambi (continua). 51
- Figura 7.** Mapa de ligação integrado para a população originária do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454. À esquerda estão localizados os códigos referentes aos marcadores e à direita as distâncias genéticas em cM, estimadas pela função de Kosambi (continua). 59
- Figura 8.** Mapa *framework* integrado gerado a partir de uma progênie originária do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454. À esquerda estão localizados os códigos referentes aos marcadores (as letras adicionais indicam que o grupo de ligação foi dividido) e à direita as distâncias genéticas em cM, estimadas pela função de Kosambi. As extensões adicionadas aos códigos dos marcadores referem-se à sua origem (continua). 66

LISTA DE SIGLAS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

cM - centiMorgans

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira

DArT – *Diversity Arrays Technology*

EM - *Expectation Maximization*

EST - *Expressed Sequence Tag*

Fish - *Fluorescence In Situ Hybridization*

GBS - *Genotyping-by-Sequencing*

Gish - *Genomic In Situ Hybridization*

IAC - Instituto Agronômico de Campinas

QTL – *Quantitative Trait Loci*

RAD-Seq - *Restriction Site-Associated DNA Sequencing*

RAF - *Randomly Amplified Dna Fingerprint*

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RGA - *Resistance Gene Analogs*

RIDESA - Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor Sucroenergético

SAM - Seleção Assistida por Marcadores

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

SRAP - *Sequence Related Amplified Polymorphism*

SSR - *Simple Sequence Repeats*

TRAP - *Target Region Amplification Polymorphism*

RESUMO

SILVA, D. G. **Mapeamento genético de marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*) em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)** 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.¹

A cana-de-açúcar é uma importante cultura, cultivada em mais de 90 países, ocupando uma área total de aproximadamente 20 milhões de hectares. As variedades modernas (*Saccharum spp.*) são híbridos interespecíficos altamente heterozigóticos, poliploides e frequentemente aneuploides, com número cromossômico variando de 100 a 130. Tais características proporcionaram ao genoma da cana-de-açúcar o título de mais complexo entre as espécies cultivadas, o que representa um desafio para os programas de melhoramento genético da cultura. No intuito de contribuir com dados que auxiliem na compreensão dessa complexa arquitetura genômica, o presente estudo objetivou a construção dos primeiros mapas de ligação para cana-de-açúcar utilizando exclusivamente marcadores DArT, avaliados na progênie derivada do cruzamento de variedades amplamente utilizadas nos programas de melhoramento da RIDEA (RB97327 x RB72454). A população inicial de mapeamento foi composta por 186 indivíduos. O DNA genômico foi extraído de gemas axiais, seguindo o protocolo proposto por Al-Janabi et al. (1999). Após a extração, quantificação e homogeneização da concentração de DNA das amostras, o material foi enviado para a empresa DArT P/L para a geração dos marcadores DArT. Um total de 7680 locos foi analisado, dos quais 850 se apresentaram polimórficos. A análise dos padrões de segregação obtidos na progênie revelou que 47% dos indivíduos da progênie avaliada foram provenientes de autofecundação do genitor feminino RB97327. Os indivíduos identificados como provenientes de autofecundação foram analisados como uma geração distinta. As análises de ligação foram realizadas nas duas populações separadamente. O software OneMap foi utilizado para a construção dos mapas. Os critérios estabelecidos para proceder com as análises de ligação foram LOD-score $\geq 3,5$ e fração de recombinação $\leq 0,4$. No primeiro mapa, originário da população de autofecundação, dos 850 marcadores polimórficos, 392 marcadores com segregação 3:1 foram utilizados para originar 80 grupos de ligação referentes à variedade RB97327. Para a população derivada do cruzamento biparental foram construídos quatro mapas de ligação: um mapa integrado composto por 98 grupos de ligação a partir da análise de 632 marcadores (com segregações 1:1 e 3:1); um mapa framework integrado, construído a partir de uma ordenação mais refinada dos marcadores dentro de cada um dos grupos de ligação, o qual foi composto por 94 grupos de ligação; e, com o objetivo de se estimar o tamanho do genoma das variedades envolvidas neste estudo, dois mapas de ligação, um para cada genitor (RB97327 e RB72454). O comprimento total do primeiro mapa, referente à variedade RB97327, foi de 828cM. O comprimento total do mapa integrado foi de 2848 cM. Os comprimentos totais dos mapas obtidos para cada um dos genitores, gerados a partir de dados da população de cruzamento biparental, foram de 1465Cm (RB97327) e de 1976 cM (RB72454). Utilizando a metodologia de Hulbert et al. (1988), os tamanhos estimados dos genomas das variedades RB97327 e RB72454 foram 2811 cM e 3471 cM, respectivamente. Assim, pode-se afirmar que os mapas obtidos neste caso apresentaram baixa cobertura (52% e 57%), perante o tamanho estimado dos genomas. Apesar do baixo polimorfismo, os marcadores DArT se

¹ Orientador: Alexandre Siqueira Guedes Coelho (EA-UFG).
Co-orientador: Evandro Novaes (EA-UFG).

mostraram eficientes na genotipagem de progênies de cana-de-açúcar, pois, centenas de marcas polimórficas foram geradas em apenas um ensaio, com dois métodos de redução de complexidade. Estes marcadores representam uma nova ferramenta para o desenvolvimento de estudos genéticos em cana-de-açúcar, principalmente se considerado o baixo custo (R\$/marcador) envolvido na obtenção dos genótipos.

Palavras-chave: mapa de ligação integrado, marcadores moleculares e poliploides.

ABSTRACT

SILVA, D. G. **Genetic mapping of DArT (*Diversity Arrays Technology*) markers in sugarcane (*Saccharum* spp.)**. 2012. 81f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.²

Sugarcane is an important crop, cultivated in more than 90 countries, occupying an area of approximately 20 million of hectares. Modern varieties (*Saccharum* spp.) are highly heterozygous interspecific hybrids, polyploids and often aneuploids, with chromosome numbers between 100 and 130. Such characteristics explain the common opinion that the genome of sugarcane is the most complex among cultivated species, posing a challenge to breeding programs. As a contribution to the understanding of this complex genomic architecture, this study aimed to build the first linkage maps using exclusively DArT markers in sugarcane. The maps were built using a progeny derived from the cross between varieties largely used in the Brazilian breeding program of RIDEA (RB97327 x RB72454). The initial mapping population comprised 186 individuals. Total genomic DNA was extracted from axial buds, following the protocol of Al-Janabi et al. (1999). Using the DArT P/L core facility to generate DArT data, a total of 7680 markers were analyzed, of which 850 were polymorphic. The analysis of segregation patterns in the progeny revealed that 47% of the individuals in the progeny were in fact derived from selfing of the female parent RB97327. These individuals were analyzed as a distinct generation. Linkage analyses were then performed on two populations (from selfing and crossing) separately. The software OneMap was used to construct the maps. The established linkage criteria for linkage analysis were LOD-score ≥ 3.5 and recombination fraction ≤ 0.4 . In the first map, built using data from individuals originated from selfing, from 850 polymorphic markers, 392 markers (segregating in a 3:1 manner) were used to create 80 linkage groups related to the variety RB97327. For the population derived from the biparental crossing, four linkage maps were built: an integrated map composed of 98 linkage groups including 632 markers (1:1 and 3:1); an integrated framework map, using a more conservative ordering criteria for the linkage groups, which was composed of 94 linkage groups; and two other linkage maps, one for each parent (RB97327 and RB72454), built to estimate the genome size of the varieties involved in this study. The total length of the linkage map built using data from individuals derived from selfing of the variety RB97327 was 828 cM. The total length of the integrated linkage map was 2848 cM. The lengths of the maps built for each parent, using data from individuals derived from crossing, were 1465 cM (RB97327) and 1976 cM (RB72454). Using the methodology of Hulbert et al. (1988), the estimated genome sizes for these varieties were 2811 cM e 3471 cM, respectively. The maps obtained in these cases covered a low percentage of the estimated genome sizes (52% and 57%). In spite of the low polymorphism, DArT markers showed to be an efficient technique to perform genotyping of sugarcane. Hundreds of polymorphic markers were generated in only one assay, using two methods of genome complexity reduction. These markers represent a new tool for genetic studies in sugarcane, especially if the low cost (USD/marker) involved in data production is considered.

Keywords: integrated linkage map, molecular markers and polyploid.

² Adviser: Alexandre Siqueira Guedes Coelho (EA/UFG).
Co-Adviser: Evandro Novaes (EA/UFG).

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, pertencente ao gênero *Saccharum* e originária do sudeste da Ásia. Atualmente, a cana é cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais. As áreas plantadas se estendem por aproximadamente 35° de latitude ao norte e ao sul do equador (Gomes & Lima, 1964). Existem seis espécies que compõem o gênero *Saccharum*: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*. As variedades comerciais cultivadas são híbridos originados de cruzamentos interespecíficos (Figueiredo, 2008).

Cultivada no Brasil desde o período colonial, a cana-de-açúcar alcançou sua expansão no país a partir da década de 70. Desde então, o setor sucroenergético vem passando por grandes transformações, obtendo significativo desenvolvimento tanto na área agrícola como no setor industrial. Recentemente, os avanços tecnológicos no cultivo da cana-de-açúcar permitiram o aperfeiçoamento do manejo e a introdução de novas variedades, o que possibilitou à adaptação da cultura a diversas regiões do país (Goes et al., 2009).

O grande potencial do Brasil para a produção da cana-de-açúcar é devido principalmente ao extenso conhecimento a respeito da cultura, às condições climáticas favoráveis ao seu cultivo e ao desenvolvimento de pesquisas realizadas por instituições públicas e privadas visando o melhoramento genético da cana-de-açúcar. No entanto, se faz necessário um contínuo desenvolvimento do setor, para evitar quedas na produtividade como as registradas na safra de 2011. De acordo com Albino et al. (2006), a principal estratégia para a manutenção da produtividade é a obtenção de novas variedades melhoradas e adaptadas as condições de cultivo.

Atualmente, existem quatro programas de melhoramento genético que garantem os avanços tecnológicos e a expansão da cultura no Brasil. São eles: o programa da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA); do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC); do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e da CanaVialis/Monsanto (Goes et al., 2009).

O genoma da cana-de-açúcar é um dos mais complexos entre as plantas cultivadas. O alto nível de poliploidia e a ocorrência de aneuploidia representam um desafio para os programas de pesquisa em genética e melhoramento (Grivet & Arruda, 2001).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular, aliados a procedimentos estatísticos complexos, disponibilizaram novas ferramentas de análise genética para auxiliar os programas de melhoramento na obtenção de novas variedades, como por exemplo, os marcadores moleculares, que permitiram um avanço significativo no entendimento do complexo genoma da cana-de-açúcar (Heller-Uszynska et al., 2010). Inúmeras são as técnicas que podem detectar polimorfismo diretamente na estrutura do DNA. Alguns destes marcadores são baseados na ação de enzimas de restrição e na hibridização da fita de DNA, como os marcadores RFLP. Outras metodologias fundamentam-se na amplificação do DNA via PCR, como os RAPD e SSR. Existem ainda as técnicas que utilizam enzimas de restrição e subsequente amplificação dos fragmentos de DNA, como é o caso dos AFLP. Com os avanços das tecnologias de sequenciamento e da computação surgiram novas classes de marcadores, que dependem diretamente da análise de sequências do DNA, como os SNP. Outros marcadores são baseados na técnica de hibridização por microarranjo, os DArT.

A aplicação de maior impacto dos marcadores moleculares no desenvolvimento de estudos genéticos com plantas é a construção de mapas genéticos. Com o mapeamento genético, espera-se estabelecer uma associação do marcador utilizado com locos envolvidos no controle de caracteres quantitativos (QTL) de interesse econômico. Estabelecida tal associação, é possível utilizar esta informação para aumentar a eficiência da seleção precoce em programas de melhoramento (Albino et al., 2006).

No intuito de contribuir com informações a respeito da complexa estrutura genômica da cana-de-açúcar, e tendo em vista, o grande potencial dos marcadores DArT para estudos de mapeamento genético em poliploides, os objetivos deste trabalho foram: (1) construir os primeiros mapas de ligação para cana-de-açúcar utilizando exclusivamente marcadores DArT, gerados a partir da genotipagem de uma progênie derivada do cruzamento entre duas variedades amplamente utilizadas nos programas de melhoramento da RIDESA; (2) estimar o tamanho do genomas dessas variedades e (3) avaliar o potencial de utilização dos marcadores DArT no mapeamento genético da cana-de-açúcar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil está inserida dentro de um contexto histórico, cultural, social e econômico. Cultivada desde 1532, com a chegada de Martin Afonso de Sousa trazendo mudas da Ilha da Madeira, a espécie encontrou no país condições favoráveis para seu desenvolvimento e rapidamente se expandiu pelo nordeste brasileiro. No século seguinte, o Brasil se tornava o maior exportador de açúcar do mundo, mantendo este posto até o fim do século XVII. Após esse período, a cultura da cana no Brasil se manteve estagnada por vários anos. Com a crise do café na década de 20, ocorreu uma rápida expansão da área cultivada com cana-de-açúcar no país. Diante deste cenário, foi criado em 1933 o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) com a função de incentivar o consumo e regulamentar o mercado de açúcar e álcool. Na década de 70, numa tentativa de lidar com a crise do petróleo, foi criado o Programa Nacional do Alcool (PNA ou Proálcool), uma parceria do governo federal com os empresários da indústria automobilística que incentivava a produção de carros movidos a álcool (etanol). Nesse período o setor sucroenergético teve um expressivo desenvolvimento (Brandão, 1985).

O objetivo do Proálcool, de substituir o uso da gasolina pelo etanol, não foi totalmente alcançado. Porém, se for levado em consideração que atualmente cerca de 20 a 25% de etanol é adicionado à gasolina, o programa forneceu importantes contribuições para o setor. Outro resultado favorável do Proálcool foi a elevação do nível de desenvolvimento tecnológico da canavicultura brasileira, possibilitando a expansão da cana-de-açúcar para outras regiões do país. Herança que colocou o setor sucroenergético brasileiro como um dos mais modernos do mundo (Goes et al., 2009). Um exemplo dessa evolução é o grande aumento da produção de cana nas últimas décadas, passando de 57 milhões de toneladas em 1970/71, para 600 milhões de toneladas em 2009/10 (BRASIL, 2011, p. 10).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. O país atingiu a marca de 650 milhões de toneladas na safra de 2013/14, liderando a produção de açúcar com 41 milhões de toneladas. A produção de etanol foi de 27,2 bilhões de litros

(Conab, 2013). Esta condição possibilitou a utilização do etanol em grande escala, como combustível renovável e alternativo ao petróleo no país. Resultando numa grande transformação da matriz energética brasileira. Na última década, a participação do petróleo e de seus derivados diminuiu consideravelmente, passou de 45,5% em 2000 para 37,9% em 2009. Ao final deste período, cerca de 18% da energia consumida no país já provinha de derivados da cana-de-açúcar. Por este motivo, a matriz energética do Brasil está entre as mais limpas do mundo (Jank, 2010).

As plantações de cana-de-açúcar no país se concentram, principalmente, nos estados de São Paulo (4,51 milhões de hectares), Goiás (0,82 milhões de hectares) Minas Gerais (0,78 milhões de hectares), e Paraná (0,62 milhões de hectares), que totalizam 75,5% da área plantada com cana no país. Esses estados produziram juntos mais de 530 milhões de toneladas na safra de 2013/14. Do total nacional desta safra (aproximadamente 652 milhões de toneladas de cana), 52% foram destinados a produção de etanol (Conab, 2013).

O setor sucroenergético brasileiro movimentou, aproximadamente, 56 bilhões de reais por ano, entre produção de cana, açúcar, etanol e bioeletricidade, representando 2% do PIB. Responde por mais de 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos distribuídos na produção de cana-de-açúcar e na cadeia de processamento de seus subprodutos. Isso representa 6% dos empregos na agroindústria nacional (CIB, 2009). Esses dados são exemplos que revelam a potencialidade do setor no Brasil.

Espera-se que no futuro os sistemas energéticos sejam capazes de satisfazer às necessidades das gerações atuais sem comprometer as futuras, atendendo ao equilíbrio social e ecológico bem como às necessidades dos mais pobres (BNDES & CGEE, 2008). Nesse sentido, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é uma solução sustentável para substituir o uso de combustíveis fósseis. Mantendo sua produção, sem provocar grandes danos aos recursos naturais, como a biodiversidade, a fertilidade do solo e os recursos hídricos.

2.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS EVOLUTIVOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar, de maneira geral, possui desenvolvimento em forma de touceira. A parte aérea é formada por colmos, folhas e inflorescências. A parte subterrânea é constituída de rizomas e raízes. As variedades comerciais cultivadas são clones-elite, o

plântio em grande escala é realizado através de propagação vegetativa por meio da germinação de gemas axilares. As variedades cultivadas recebem a denominação taxonômica de *Saccharum* spp. (Cesnik & Miocque, 2004).

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, semiperene e própria de climas tropicais e subtropicais, pertencente à família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae*, subtribo *Saccharinae* e gênero *Saccharum*. Indivíduos deste gênero se caracterizam por serem altamente heterozigóticos, apresentarem elevados níveis de poliploidia e frequente ocorrência de aneuploidia. O gênero compreende seis espécies: duas selvagens, *S. spontaneum* e *S. robustum*, e quatro cultivadas, *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (Irvine, 1999). As cultivares modernas são obtidas a partir de hibridizações artificiais entre as espécies de *Saccharum*, com uma participação maior de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Grivet et al., 2004).

Plantas da espécie *S. spontaneum* possuem colmos curtos e muito finos, baixos índices de sacarose, alto teor de fibra, perfilhamento intenso, sistema radicular bem desenvolvido e respondem bem à ação de patógenos. Plantas de *S. officinarum* se destacam por apresentarem colmos grossos, com pouca fibra e grande quantidade de sacarose. Devido a essas características, alguns autores denominam as variedades de *S. officinarum*, de “canas nobres”. Esta espécie possui um sistema radicular reduzido e superficial, e apresenta suscetibilidade a diversas doenças (Cesnik & Miocque, 2004). Na tentativa de unir essas características de interesse agrônômico, presentes nas duas espécies, que os primeiros cruzamentos foram realizados.

Existe um consenso entre os pesquisadores de que o centro de origem do gênero *Saccharum* encontra-se no sudeste da Ásia (Polinésia, Nova Guiné e Índia). Porém, o exato país ou região é incerto. Roach & Daniels³, citado por Matsuoka et al. (2005), descrevem os possíveis centros de diversidade das espécies de *Saccharum*: *S. officinarum* e *S. robustum*, Nova Guiné; *S. sinense*, China e norte da Índia; *S. spontaneum*, desde o Japão, Indonésia e Nova Guiné até o Mediterrâneo e África; *S. barberi*, nordeste da Índia; *S. edule*, Nova Guiné e Ilhas Fiji. Esses autores afirmam ainda, que os gêneros: *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga* formam um grupo de intercruzamentos muito próximos, denominado de “complexo *Saccharum*”, que está diretamente envolvido na origem da cana-de-açúcar.

³ ROACH, B. T; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR INT. SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, São Paulo: Copersucar, 1987. p. 1-30.

Estudos com marcadores moleculares revelaram dados que contestam a hipótese de que os genomas das canas cultivadas atualmente tenham contribuições de outros gêneros (cruzamentos intergenéricos). Esses dados demonstram que as espécies de *Saccharum*, *Erianthus* e *Miscanthus* são claramente distintas entre si (Figura 1), apoiando a ideia que o gênero *Saccharum* é uma linhagem bem definida que divergiu, durante um longo período de evolução, de linhagens superiores de *Erianthus* e *Miscanthus* (Grivet et al., 2006).

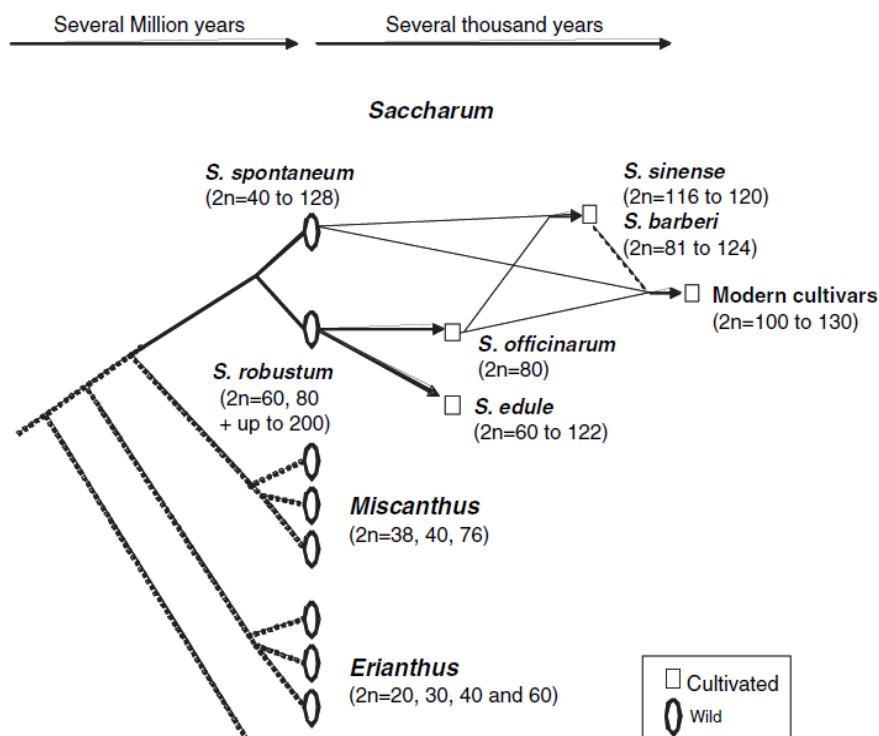


Figura 1. Cenário proposto a partir de análises de dados moleculares para a evolução e domesticação da cana-de-açúcar (adaptado de Grivet et al., 2006).

Os estudos moleculares também reforçam a teoria proposta por Brandes (1958), de que *S. officinarum* possui descendência direta com a espécie selvagem *S. robustum*. Estes estudos fornecem ainda, evidências de que as espécies *S. barberi* e *S. sinense* se originaram de cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. As canas modernas surgiram a partir de cruzamentos entre espécies selvagens do gênero *Saccharum* (Figura 1). No entanto, isso não significa que hibridizações intergenéricas sejam impossíveis. Ao contrário, cruzamentos intergenéricos estão sendo realizados nos programas de melhoramento na tentativa de obter uma maior variabilidade genética entre os clones gerados (D'Hont et al., 2008).

2.3 ESTRUTURA GENÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR

As espécies que compõem o gênero *Saccharum* são todas poliploides e apresentam uma grande diversidade de números cromossômicos. Estudos de caracterização citogenética demonstraram que as mais significativas diferenças no número de cromossomos ocorrem nas espécies selvagens. A espécie *S. spontaneum* apresenta variação de $2n=40$ a 128 cromossomos, prevalecendo os citótipos $2n=64$, 80, 96, 112 e 128. Em *S. robustum* verificou-se a ocorrência de indivíduos com número cromossômico variando de $2n=60$ a 205, no entanto os valores $2n=60$ e 80 são os mais frequentes. Nas espécies cultivadas esta variação é menor. *S. officinarum* apresenta $2n=70$ a 140 cromossomos, com maior ocorrência (cerca de 90%) de $2n=80$. A espécie *S. sinense* apresenta de $2n=111$ a 120 cromossomos; *S. barberide* $2n=81$ a 124 e *S. edule* de $2n=60$ a 80 (Grivet et al., 2004; Irvine, 1999).

Estudos a partir de hibridizações *in situ* de DNA ribossômico demonstraram que a maioria das metáfases analisadas para *S. officinarum* e *S. robustum* apresentavam número cromossômico básico de $x=10$, evidenciando que são espécies octaploides, e que *S. spontaneum* tem número básico de $x=8$, o que representa um nível de ploidia para esta espécie entre 5 e 16 (D'Hont et al., 1998).

Em poliploides, como a cana-de-açúcar, o tamanho do genoma gamético (1C) não corresponde ao tamanho do conjunto básico de cromossomos (x). Por este motivo, em poliploides é mais apropriado utilizar as denominações, tamanho do genoma não replicado de células somáticas (2C) e tamanho do genoma monoploide (D'Hont et al., 2008).

Em relação ao tamanho do genoma da cana-de-açúcar, Grivet & Arruda (2001) relataram que o conteúdo genômico não replicado de uma célula somática de *S. officinarum* compreende, aproximadamente, 7440 Mpb ($2n=80$). Como *S. officinarum* é octaploide, o tamanho do genoma monoploide é oito vezes menor, ou seja, 930 Mpb ($x=10$). Para *S. spontaneum* este valor é de 750 Mpb ($x=8$). Com os valores de 750 e 930 Mpb, o tamanho do genoma básico de *Saccharum* é cerca de duas vezes maior que o genoma de arroz (430 Mpb), similar ao genoma gamético de sorgo, que contém cerca de 760 Mpb, e significativamente menor que genoma de milho (2500Mpb).

As variedades modernas de cana-de-açúcar surgiram a partir de cruzamentos interespecíficos envolvendo *S. officinarum* e *S. spontaneum*. As progênies obtidas foram sucessivamente retrocruzadas com *S. officinarum*, na tentativa de resgatar os genes favoráveis ao aumento de sacarose presentes no parental recorrente (*S. officinarum*),

procedimento chamado de “nobilização” (Creste et al., 2008). Atualmente, as variedades comerciais são derivadas de alguns ciclos de cruzamento e seleção entre estes híbridos interespecíficos iniciais. As outras espécies do gênero *Saccharum* (exceto *S. edule*) também contribuíram para a atual configuração genômica da cana-de-açúcar (Grivet & Arruda, 2001).

O número de cromossomos das variedades cultivadas parece variar de $2n=100$ a 130, com a ocorrência frequente de aneuploidia (Butterfield et al., 2001). Ao utilizar a técnica de GISH⁴ para investigar a composição cromossômica de três híbridos resultantes de um cruzamento interespecífico, envolvendo *S. officinarum* e *S. spontaneum*, Piperidis et al. (2010) constataram que a transmissão dos cromossomos parentais para esses híbridos foi consistente com a configuração $2n + n$. Estes resultados demonstraram *S. officinarum* (parental feminino) transmitiu aos descendentes todo o conjunto de cromossomos, ou seja, $2n=80$. E que, *S. spontaneum* forneceu a metade do material genético, $n=32$ ou $n=40$. Nesses híbridos o número cromossômico variou de 117 a 120, com 67% dos cromossomos derivados de *S. officinarum* e 33% de *S. spontaneum*.

As análises de hibridização *in situ* apontaram ainda que, aproximadamente, 15 a 27% do genoma das variedades modernas são derivados de *S. spontaneum*, incluindo 10 a 23% de cromossomos vindos unicamente desta espécie selvagem e 8 a 13% de cromossomos provenientes de recombinações interespecíficas (Piperidis et al., 2010).

Em outro trabalho, visando compreender a composição cromossômica das variedades modernas de cana-de-açúcar, Cuadrado et al. (2004) utilizaram as técnicas de FISH⁵ e GISH para identificar as proporções dos cromossomos parentais em três clones (*Saccharum* spp.): My5514; B42231 e C236-51. A partir da análise do conjunto de cromossomos metafásicos desses clones, os autores concluíram que 16% dos cromossomos analisados foram herdados de *S. spontaneum* e que 5% são devidos a recombinações e/ou translocações cromossômicas entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*.

Como consequência dos diferentes números básicos de cromossomos apresentados por *S. officinarum* ($x=10$) e por *S. spontaneum* ($x=8$), duas organizações cromossômicas distintas coexistem nas variedades atuais de cana-de-açúcar (Figura 2) (D’Hont et al., 2005).

⁴ GISH - *Genomic In Situ Hybridization**

⁵ FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization**

* São técnicas que permitem distinguir segmentos cromossômicos oriundos de diferentes parentais.

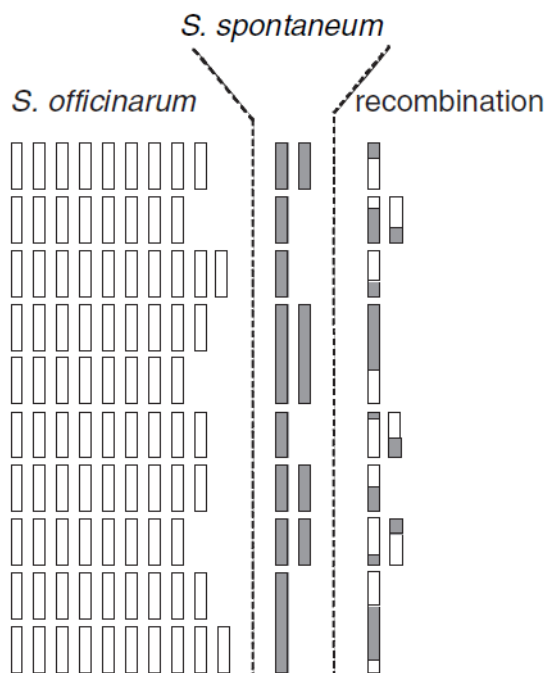


Figura 2. Representação esquemática do genoma das variedades cultivadas, deduzido a partir das técnicas de FISH e GISH (modificado de D’Hont et al., 2005).

A participação de *S. spontaneum* (10 a 20%) na composição genômica da cana-de-açúcar é menor quando comparada com *S. officinarum* (80%), no entanto, estudos têm mostrado que essa espécie é a principal responsável pela diversidade encontrada nas canas modernas (Piperidis et al., 2010).

Esses dados auxiliam na compreensão, mesmo que parcial, da complexa arquitetura apresentada pelo genoma da cana-de-açúcar. Porém, não fornecem subsídios para compreender o comportamento dos cromossomos durante o processo de pareamento meiótico. Provavelmente, isto ocorre devido ao grande número de cromossomos ($2n=100-130$); ao tamanho reduzido dos cromossomos ($1-3 \mu\text{m}$); à alta taxa de ploidia e à homologia dos cromossomos (Cuadrado et al., 2004). Dados de mapeamento sugerem que não haja um esquema de pareamento pré-estabelecido, como dissomia completa ou polissomia completa. É possível que cada cromossomo tenha afinidade específica de emparelhamento com seus homólogos (Grivet & Arruda, 2001).

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Possivelmente, o melhoramento de plantas surgiu com o início da agricultura (10 mil anos atrás). Assim, desde os primórdios, o homem busca por melhores formas de cultivo

e por plantas com maior produtividade. A domesticação e o melhoramento das espécies durante os séculos moldaram a composição genética das culturas atuais. Essa estruturação do germoplasma adquirida ao longo do tempo é a principal ferramenta utilizada pelos atuais melhoristas nos programas de melhoramento de plantas (Borém & Milach, 1999).

Em cana-de-açúcar, a busca por melhores variedades é bastante antiga. Estudos sugerem que a seleção de acessos de *S. robustum* para colmos mais grossos, maior teor de sacarose e baixa porcentagem de fibras teriam originado a *S. officinarum* (Landell & Bressiani, 2008).

Os trabalhos dirigidos ao melhoramento da cultura datam do final do século XIX. De acordo com Ming et al. (2006), os eventos históricos do melhoramento genético da cana-de-açúcar podem ser divididos em cinco momentos: (1) cruzamentos entre “canas nobres” (*S. officinarum*) para produzir cultivares “nobres”, em que progênies de cana nobres de polinização aberta foram selecionadas visando a produção de açúcar; (2) melhoramento através do processo de nobilização para a obtenção de cultivares nobilizadas; (3) cruzamentos entre as cultivares nobilizadas para produzir cultivares híbridas; (4) melhoramento das canas híbridas para a produção das cultivares atuais; e (5) cruzamentos direcionados para ampliar a base genética.

Os primeiros cruzamentos com cana-de-açúcar foram realizados em Java no ano de 1887. Na época os pesquisadores obtiveram sementes férteis do cruzamento entre duas variedades de *S. officinarum* (Glagah x Loethers), demonstrando a viabilidade do melhoramento genético da cana, por meio de cruzamentos controlados (Cesnik & Miocque, 2004).

Cultivares originadas dos cruzamentos entre canas nobres foram importantes para a produção de açúcar no início do século XX. Mas, tanto as canas nobres originais quanto as novas cultivares eram suscetíveis a doenças e pragas, fato que limitou a expansão da cultura. Surgiu assim, o interesse em desenvolver novas variedades que atendessem à demanda dos produtores. A estratégia utilizada para produzir plantas com maior adaptabilidade e resistentes a pragas e doenças foi a “nobilização”. Este processo consiste no cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, em que todos os cromossomos do genitor materno (*S. officinarum*) foram transferidos aos descendentes em F1, e posteriormente realizando o retrocruzamentos com *S. officinarum*, com o objetivo de resgatar as características de interesse da cana nobre (alto teor de sacarose, colmos espessos

e suculentos e baixo conteúdo de fibras) (Landell & Bressiani, 2008). O quadro abaixo esquematiza resumidamente o processo de nobilitação.

Quadro 1. Processo de nobilitação utilizando acessos de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Fonte: Ming et al., 2006, citado por Landell & Bressiani, 2008).

Genitor feminino	Genitor masculino	Progênie	Nº cromossômico
<i>S. officinarum</i> (2n = 80*)	<i>S. spontaneum</i> (2n = 64*)	F ₁	(80 + 32 = 112)
<i>S. officinarum</i> (2n = 80)	F ₁ (2n = 112)	RC ₁	(80 + 56 = 136)
<i>S. officinarum</i> (2n = 80)	RC ₁ (2n = 136)	RC ₂	(40 + 68 = 108)

* 90% dos acessos de *S. officinarum* apresentam número cromossômico igual a 80 e o número mais frequente de *S. spontaneum* é de 64.

As progênies F₁ e RC₁ possuem o conteúdo somático não reduzido dos parentais femininos (2n=80), acrescido do conteúdo cromossômico dos gametas do parental masculino (n=32). Dessa forma, a maioria das canas cultivadas atualmente tem o número somático variando entre 100 e 130 cromossomos. Clones com número cromossômico fora desse alcance raramente são apropriados para a produção comercial. As cultivares nobilizadas passaram a possuir as características necessárias para impulsionar a cultura da cana-de-açúcar (Ming et al., 2006).

A obtenção de cultivares híbridas a partir de canas nobilizadas, ocorrida por volta de 1930, foi importante para a produção de açúcar nas três décadas seguintes. Foram lançadas variedades como a POJ3016 e POJ3067, que juntas ocupavam mais de 85% da área plantada em Java nos anos de 1960. Nesta época surgiram outras variedades importantes, como a H32-8560 cultivada em 65% da área de plantio do Havaí em 1945 e a NCo310 que se tornou a variedade mais importante do mundo nas décadas de 50 e 60 (Landell & Bressiani, 2008).

Cultivares comerciais e genótipos híbridos, selecionados a partir de estágios avançados de seleção, têm sido os principais materiais de melhoramento para o desenvolvimento das variedades atuais, desde 1950 (Ming et al. 2006). Através de cruzamentos envolvendo esses materiais surgiram novas cultivares importantes para a expansão da cana-de-açúcar.

De acordo com Roach⁶, citado por Landell & Bressiani (2008), a base genética das canas modernas é relativamente estreita, pois estas são derivadas de não mais que 20 genótipos, todos oriundos de programas de nobilitação desenvolvidos em Java e na Índia. Sendo assim, a ampliação da base genética da cana-de-açúcar, na tentativa de aumentar a diversidade dos bancos de germoplasma, é de extrema importância para os programas de melhoramento. Neste sentido, na década de 60 iniciaram-se trabalhos de incorporação gênica, principalmente em Barbados e em Louisiana, envolvendo clones de espécies selvagens, diferentes daqueles utilizados no início dos processos de nobilitação. Atualmente outros programas estão desenvolvendo estratégias de ampliação da base genética do germoplasma de cana-de-açúcar que possibilitem uma maior probabilidade de obtenção de clones superiores na população de melhoramento.

2.4.1 Melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil

No Brasil, até 1925, eram plantadas basicamente variedades (clones) de *S. officinarum* conhecidas como Riscada, Roxa, Cristalina, Manteiga, Caiana e Preta. Com o início dos programas de melhoramento, todas as espécies de *Saccharum* (exceto *S. edule*), passaram a participar, ainda que parcialmente, dos cruzamentos que originaram os atuais híbridos cultivados (Scarpari & Beauclair, 2008). As primeiras pesquisas no país com cana-de-açúcar se concentravam principalmente em quatro núcleos: (1) Estação de Escada, em Pernambuco (1913); (2) Estação de Campos, no Rio de Janeiro (1916); (3) Estação Geral de experimentação de Barreiros, em Pernambuco (1920) e (4) Escola Superior de Agricultura de São Bento, em Tabera, Pernambuco (data incerta). Esses centros de pesquisa trouxeram valiosas contribuições à canavicultura brasileira, estabelecendo normas, difundindo tecnologias, promovendo intercâmbios e possibilitando a substituição de variedades. Contribuições que evitaram o colapso da cultura na década de 30, depois que as plantações de cana foram dizimadas pelo vírus do mosaico (Matsuoka et al., 2005).

Além das contribuições acima citadas, os centros pioneiros em estudos com cana serviram como base para o surgimento de outros programas de melhoramento no país, como: o programa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (Planalsucar – atual RIDESA), o programa de

⁶ ROACH, B, T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technology**, v.11, p.34-47, 1989.

melhoramento da Copersucar e o programa de melhoramento da usina da Barra. Recentemente, em 2003, foi criado o programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar da CanaVialis, grupo privado com foco na viabilidade econômica sustentada pela política de *royalties* (Goes et al., 2009).

Em 1990, surge a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), que assume todo o patrimônio físico e de recursos humanos do antigo Planalsucar. Após vinte anos de sua criação, a RIDESA é conhecida nacional e internacionalmente como líder no desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar. Conta com um banco de germoplasma composto por mais de 2500 genótipos e com um acervo varietal de 78 variedades liberadas com aptidões para todo o Brasil (RIDESA, 2010).

Dentre as variedades liberadas pela RIDESA, destaca-se a RB72454. Lançada nacionalmente em 1987, em poucos anos se tornou a variedade mais cultivada no Brasil. Após 21 anos, desde seu lançamento, a RB72454 ocupa expressiva área de cultivo. Foi a terceira variedade de cana-de-açúcar mais plantada em 2008 no país (RIDESA, 2010). O sucesso desta variedade comprovou a eficiência do programa de melhoramento do Planalsucar, por fornecer um genótipo com boa produtividade, adaptado a quase todos os tipos de solos, elevada resistência à ferrugem marrom e indicada para todo o país.

Segundo Landell & Bressiani (2008), os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, em geral, têm como principal objetivo fornecer novas cultivares que ampliem a produtividade de energia (açúcar, álcool e bioeletricidade). Sendo que as cultivares desenvolvidas devem atender às condições edafo-climáticas de cada região, promovendo ganhos significativos de produção.

Pode-se afirmar que estes objetivos estão sendo alcançados, pois, os programas de melhoramento têm disponibilizado variedades altamente produtivas e adaptadas a diferentes ambientes de produção, clima, época de manejo e colheita. Além de apresentarem boa capacidade de perfilhamento, diâmetro de colmos adequados, resistência aos principais patógenos e capacidade de rebrota após três ou quatro cortes. As novas variedades vêm proporcionando, matéria-prima de alta qualidade ao setor sucroenergético, fato que reflete a grande expansão da cultura no Brasil.

Para Creste et al. (2008) é notória a importância dos ganhos em produtividade das variedades atuais, status adquirido após vários anos de hibridizações, cruzamentos e gerações de seleção. A complexidade dos genomas (elevado nível de ploidia e aneuploidia) das espécies de *Saccharum*, utilizadas nas primeiras hibridizações em cana-de-açúcar,

associada a uma citogenética irregular dos híbridos interespecíficos obtidos, tornou o melhoramento dessa cultura uma atividade extremamente desafiadora. Outro fator, que dificulta de forma significativa os trabalhos para obtenção de genótipos superiores, é a base genética limitada das variedades modernas, que está alicerçada em poucos híbridos iniciais (Aitken & McNeil, 2010).

Na tentativa de contornar este quadro desafiador apresentado pela canavicultura atual, ferramentas biotecnológicas estão sendo empregadas para aprimorar a compreensão da estrutura genômica da cana e permitir a identificação de locos relacionados a características de interesse econômico. Neste sentido, o uso de marcadores moleculares apresenta a possibilidade de aperfeiçoar a prática de seleção, pois além de revelar a variabilidade genética existente diretamente no DNA, esta técnica é aplicável a qualquer estágio da planta.

2.5 APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O melhoramento genético de plantas, na sua forma convencional, é baseado na seleção fenotípica de genótipos superiores em populações segregantes oriundas de cruzamentos planejados. Essa estratégia geralmente encontra obstáculos, principalmente devido a interações genótipo–ambiente, que podem dificultar a identificação dos genótipos de interesse. Outros fatores desfavoráveis associados aos métodos de melhoramento tradicional estão relacionados com o alto custo dos procedimentos de seleção e com o longo tempo para obtenção de novas variedades (entre 12 a 15 anos no caso da cana-de-açúcar) (Creste et al., 2008).

Os avanços em genética e biologia molecular, principalmente com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático de DNA, permitiram realizar estudos com maior segurança, rapidez e eficiência sobre a composição genética das espécies a serem melhoradas, possibilitando, por exemplo, medir a variabilidade existente dentre os genótipos disponíveis aos programas de melhoramento. A utilização dos marcadores moleculares nos programas de melhoramento é um exemplo desses avanços. Segundo Creste et al. (2008) estes marcadores têm modernizado a capacidade de caracterizar a variação genética em

muitos organismos, pois são capazes de detectar a variabilidade existente a um nível de resolução muito superior aos métodos convencionais.

Em cana-de-açúcar, marcadores moleculares estão sendo utilizados em programas de melhoramento genético principalmente nos estudos, de: identificação genética (*fingerprinting* - certificação varietal); para medir a distância genética, visando à identificação dos melhores cruzamentos com base na distância genética dos genitores envolvidos; para acessar a diversidade genética de genótipos disponíveis aos programas de melhoramento; em testes de paternidade, procedimento importante para que seja possível a repetição exata do cruzamento; na construção de mapas de ligação, os quais podem ser utilizados na identificação de características de interesse agrônomo (QTLs). Ao identificar a probabilidade de uma planta expressar determinadas características agrônomicas ou industriais em suas fases iniciais, pode-se acelerar o processo de seleção de variedades (Creste et al., 2008). O mapeamento genético, além permitir a localização de genes ou regiões genômicas envolvidas no controle de características quantitativas, fornece a estrutura necessária para a obtenção de mapas físicos.

A Seleção Assistida é outra ferramenta promissora da aplicação dos marcadores moleculares nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, pois permite realizar a seleção de genótipos no estágio juvenil da população de melhoramento. O resultado dessa seleção precoce seria ganhos em tempo e custos. Porém, a utilização desta tecnologia depende de uma série de fatores associados à natureza das características de interesse e dos marcadores moleculares empregados para essa espécie; do tipo de associação entre as características e os marcadores; e da estratégia de melhoramento da cultura. Além disso, outros fatores podem influenciar na aplicação dessa técnica, tais como herdabilidade e viabilidade econômica (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Devido, a esses fatores e as características genéticas da cana-de-açúcar comercial (poliploidia, aneuploidia, híbrido interespecífico), a seleção assistida por marcadores não está sendo aplicada com eficiência satisfatória nos programas de melhoramento genético da cultura.

2.5.1 Marcadores moleculares

Marcador molecular é uma sequência de nucleotídeos localizada numa posição específica do genoma, a qual deve apresentar variabilidade suficiente entre genótipos para que seu padrão de herança possa ser analisado (Schulman, 2007). Marcadores que utilizam

o próprio genoma revelam sítios de variações neutras diretamente na sequência de DNA. Por serem neutras, ao contrário do que ocorre com os marcadores morfológicos, essas variações não se mostram no fenótipo. Os marcadores moleculares possuem ainda a vantagem de serem muito mais numerosos e não sofrem influência do ambiente (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para Xu (2010), os marcadores moleculares devem satisfazer os seguintes critérios, para que possam ser utilizados de forma satisfatória: (1) ter elevado nível de polimorfismo genético; (2) apresentar padrão de herança codominante, de modo que os heterozigotos possam ser distinguidos dos homozigotos; (3) apresentar distinção clara entre alelos, de modo que diferentes alelos possam ser facilmente identificados; (4) apresentar distribuição uniforme em todo o genoma; (5) ser de fácil detecção, de modo que todo o processo possa ser automatizado; (6) apresentar baixo custo de desenvolvimento e genotipagem; e (7) apresentar reprodutibilidade alta, de modo que os dados possam ser acumulados e compartilhados entre laboratórios.

Existem várias classes de marcadores moleculares disponíveis para análise genética aplicada ao melhoramento de plantas. Os principais são: RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Botstein et al., 1980); RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams et al., 1990); SSR – *Simple Sequence Repeats* (Jacob et al., 1991); AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Vos et al., 1995); SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (Brookes, 1999); e recentemente, um novo tipo de marcador, os DArT – *Diversity Array Technology* (Jaccoud et al., 2001), está sendo aplicado com sucesso nos trabalhos envolvendo espécies cultivadas.

Os RFLP foram os primeiros marcadores moleculares a serem descritos, permitindo detectar as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA. A técnica é baseada na ação de enzimas de restrição que clivam o DNA em locais específicos, denominados de sítios de restrição. O polimorfismo decorre da presença ou ausência desses sítios de restrição, devido à ocorrência de substituições, deleções ou inserções de pares de bases na fita de DNA durante o processo evolutivo. Os RFLP são marcadores codominantes, para os quais é possível se distinguir os indivíduos homozigóticos dos heterozigóticos (Caixeta et al., 2006).

Quando comparados com as isoenzimas, os marcadores RFLP apresentam a vantagem de cobrir potencialmente todo o genoma, aumentando assim a probabilidade de identificação de associações significativas entre estes marcadores e genes que controlam caracteres de interesse. As principais limitações da técnica de RFLP são: a baixa

possibilidade de automação da metodologia, a dificuldade de obtenção de uma biblioteca de sondas, a exigência de pessoal altamente qualificado para se trabalhar com DNA recombinante, os custos elevados, e ainda, as quantidades consideráveis de DNA exigidas para emprego da técnica (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A descoberta da reação em cadeia da Polimerase (PCR) possibilitou a visualização de fragmentos de DNA após sua síntese em grande quantidade. Com o desenvolvimento da PCR surgiram novos marcadores moleculares, como os RAPD. De acordo com Xu (2010), a técnica dos marcadores RAPD consiste em utilizar *primers* curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação. A utilização de *primers* arbitrários eliminou a necessidade de conhecimento prévio da sequência do organismo sob análise. As principais aplicações dos RAPD são: *fingerprinting*, análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais e bancos de germoplasma e construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica (Faleiro, 2007).

A base molecular dos marcadores RAPD não é simples. Evidências experimentais indicam que diferenças em apenas um par de bases (mutação pontual) são suficientes para causar a não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação, impedindo assim a amplificação do fragmento de DNA (Nguyen & Wu, 2005). Os marcadores RAPD são baseados na amplificação do DNA e não na hibridização, como nos marcadores RFLP, sendo assim a técnica de RAPD possui a vantagem de ser mais simples e rápida, pois possibilita a visualização direta dos padrões de bandas no gel de eletroforese. A principal desvantagem dos RAPD está relacionada à sua natureza dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores SSR, também são designados de microssatélites, consistem em pequenas sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em tandem. Os microssatélites são observados em grande número no genoma de eucariotos. Estudos mostram que no genoma de plantas é possível encontrar um SSR a cada 6 a 7 Kbp, sendo o dinucleotídeo (AT)_n, o elemento repetido mais comum (Xu, 2010). As regiões que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, o que permite a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Com isso, os microssatélites estão sendo amplamente utilizados em diversos estudos com plantas cultivadas (sorgo, milho, cana-de-açúcar, uva, batata, etc.). A principal aplicação dos microssatélites tem sido em estudos de mapeamento

genético. Devido à sua grande densidade de ocorrência no genoma, o uso destes marcadores permite a construção de mapas com maior resolução (Borém & Miranda, 2009).

A base genética do polimorfismo detectado pelos marcadores microssatélites decorre das variações nas sequências de DNA altamente repetitivo, ou seja, variações no número de elementos (motivos) repetidos. A principal vantagem dos marcadores microssatélites advém da alta variabilidade geralmente encontrada nestes locos. São marcadores tipicamente multialélicos, oferecendo um grande conteúdo informativo por loco. Além disso, são marcadores que apresentam padrão de herança codominante, são abundantes em eucariotos e encontram-se amplamente distribuídos no genoma destes organismos. Todas estas características favorecem a utilização destes marcadores para o desenvolvimento de mapas genéticos. A maior limitação da técnica dos microssatélites está relacionada com o trabalho de desenvolvimento dos marcadores, que requer pessoal especializado e equipamentos sofisticados, fatores que elevam os custos iniciais de utilização da técnica (Caixeta et al., 2006).

Os AFLP são outra classe de marcador molecular que possuem grande potencial de aplicabilidade no melhoramento de plantas. A técnica dos marcadores AFLP baseia-se na amplificação do DNA via PCR para detectar diferenças num conjunto de fragmentos digeridos com enzimas de restrição e selecionados utilizando *primers* específicos (Xu, 2010). Os marcadores AFLP estão sendo utilizados nos mais diversos estudos, como *fingerprinting*, para acessar a variabilidade genética, no registro de variedades, no mapeamento genético e na análise de marcadores ligados a características de interesse (Faleiro, 2007).

A origem do polimorfismo verificado com a técnica de AFLP são as mutações pontuais, inserções ou deleções que levam à perda ou ganho de um sítio de restrição, reconhecido pelas enzimas utilizadas, ou alterações na sequência de nucleotídeos nos terminais 3' dos *primers* que dirigem a PCR a partir dos adaptadores. Por serem distribuídos ao longo do genoma e por possuírem herança mendeliana, os AFLP são altamente informativos. Este fato reflete a principal característica dos marcadores AFLP, que é a capacidade de analisar, simultaneamente, várias regiões do genoma com alta reprodutibilidade. A grande limitação dos AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pois são marcadores com padrão de herança dominante. Outra desvantagem dos marcadores AFLP é a maior quantidade requerida de DNA de boa qualidade para fins de análise (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os polimorfismos de um único nucleotídeo, SNP, se baseiam na detecção de variações resultantes da substituição de uma única base no genoma. As substituições mais frequentes são do tipo transição. Para que uma variação seja considerada um SNP, sua frequência na população estudada deve ser superior a 1%. Os primeiros estudos com SNP ocorreram em seres humanos. Durante o sequenciamento do genoma humano observou-se um grande número de variações de ponto encontradas ao se comparar segmentos correspondentes do genoma (Brookes, 1999).

Os marcadores SNP são, geralmente, de natureza bialélica, são extremamente abundantes no genoma, podendo ocorrer tanto em regiões expressas quanto em regiões não-expressas. Juntamente com as inserções e deleções (indels) são a base genética de marcadores como os RFLP, RAPD e AFLP. Os SNP são marcadores que oferecem um grande número de informações por genótipo analisado. Em algumas espécies cultivadas, como o milho, ocorre um SNP a cada 70 pb (Gupta et al., 2001). Estudos com clones de cana-de-açúcar evidenciam a ocorrência de um SNP a cada 35 pb (Bundock et al., 2009). Devido a essa característica, os SNP surgem como uma ferramenta importante na obtenção de mapas genéticos de alta resolução. Outra utilização promissora dos SNP é a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) e, mais recentemente, a Seleção Genômica Ampla (Caixeta et al., 2006).

2.5.2 Marcadores DArT

A utilização dos marcadores DArT foi proposta inicialmente por Jaccoud et al. (2001). Esta técnica consiste no emprego de uma metodologia de alto rendimento, capaz de comparar milhares de fragmentos de DNA em apenas um ensaio, permitindo a observação simultânea de várias centenas de locos polimórficos espalhados pelo genoma. A técnica apresenta baixo custo de genotipagem por loco, se baseia na utilização de procedimentos rápidos e robustos, na geração automatizada de dados, não depende da utilização de géis de agarose ou poliacrilamida e requer uma quantidade mínima de DNA genômico por amostra. No entanto, o grande diferencial desta metodologia está na sua capacidade de gerar uma gama de marcadores, com ampla cobertura do genoma, sem a necessidade de obtenção de informações prévias sobre sequências de DNA ou de *primers* específicos (Jaccoud et al., 2001).

Os marcadores DArT são, por esses motivos, muito interessantes para o desenvolvimento de estudos de caracterização genética das mais variadas espécies, para as quais não há dados moleculares prévios, e em situações em que os recursos são limitados (Huttner et al., 2004). Atualmente, a tecnologia DArT é aplicada pela empresa DArT Pty/Ltd. A empresa disponibiliza o serviço de genotipagem para inúmeras espécies cultivadas, incluindo: trigo, cevada, cana-de-açúcar, banana, sorgo, entre outras e para algumas espécies de animais e fungos. Procedimentos estão sendo realizados para testar o método de redução de complexidade em outros organismos.

O método de geração dos marcadores DArT consiste basicamente em duas etapas. Na primeira etapa, cria-se um painel de diversidade (desenvolvimento do *array*) para a espécie em estudo (Figura 3A). Esta etapa consiste na geração das representações genômicas através do método de redução da complexidade do DNA. Esta redução ocorre devido à ação combinada de enzimas de restrição específicas (ex. *EcoRI*, *PstI* e *MspI*), sendo uma de corte raro e outra de corte frequente. Após a digestão do DNA genômico, adaptadores com sequências equivalentes apenas aos sítios de restrição das enzimas de corte raro são ligados aos fragmentos gerados. Utilizando *primers* específicos para cada sequência do adaptador, amplificam-se estes fragmentos via PCR, produzindo assim uma representação genômica para o DNA da espécie estudada. O passo seguinte é a clonagem destes fragmentos em um vetor e posterior amplificação dos insertos. O painel de diversidade é gerado pela impressão dos *microarrays* contendo as representações genômicas em lâminas de vidro (*slides*) (Jaccoud et al., 2001).

A segunda etapa de obtenção dos marcadores DArT consiste na genotipagem utilizando o painel de diversidade gerado na etapa anterior (Figura 3B). O passo inicial consiste na obtenção das representações genômicas para cada indivíduo a ser genotipado (DNA-alvo) e na marcação com fluorescência (ex. verde). O fragmento *polylinker* do vetor de clonagem é utilizado como sinal de referência. A marcação é feita com fluorescência de cor diferente da utilizada para marcar as representações das amostras (ex. azul). Em seguida, promove-se a hibridização do DNA-alvo com os fragmentos de referência imobilizados no *slide* (painel de diversidade). Os *slides* são então escaneados. As imagens obtidas são analisadas e manipuladas no software DArTSoft (DArT P/L) (Figura 3) (Wittenberg, 2007).

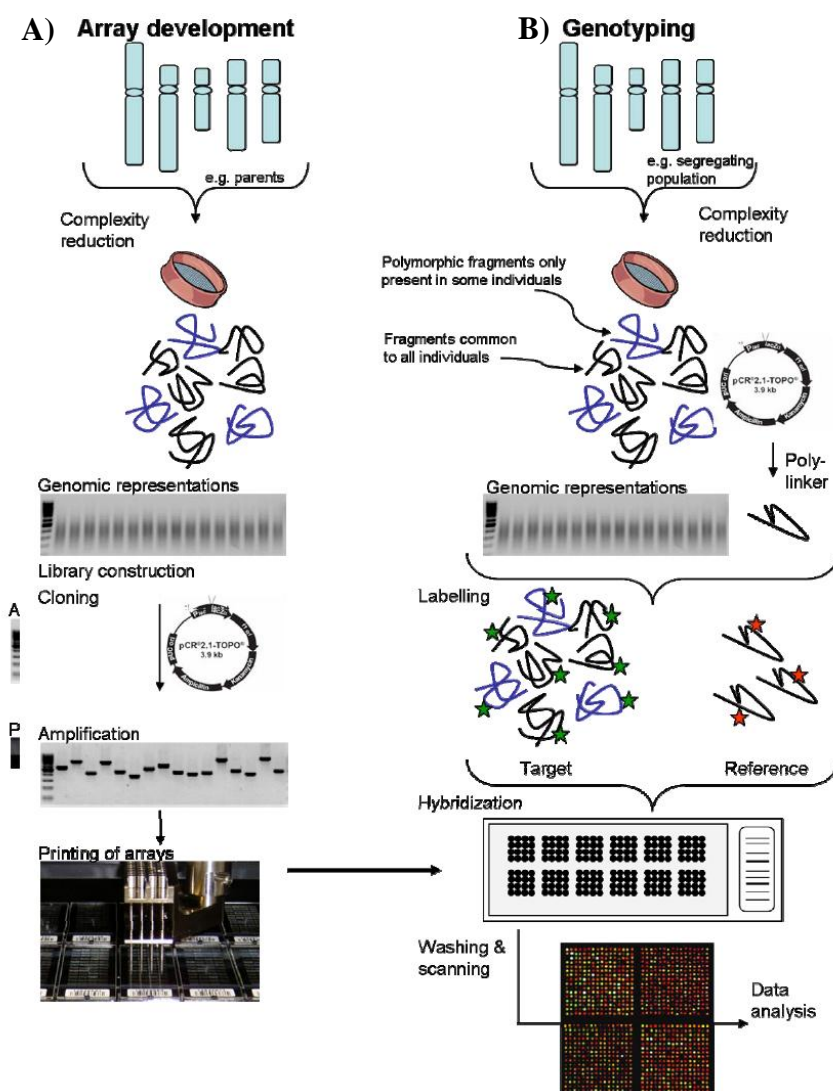


Figura 3. Resumo do procedimento para geração dos marcadores DArT. A) obtenção do painel de diversidade e B) genotipagem das amostras. Fonte: Wittenberg (2007).

O DArTSoft possui um módulo de detecção de polimorfismo, que realiza a identificação automática dos marcadores com seus respectivos parâmetros de qualidade. A avaliação, se um *spot* do *array* apresenta polimorfismo, é baseada nas razões dos valores normalizados (log) da intensidade dos sinais de hibridização em cada *spot* (Figura 4A). Se estas razões em todos os *spots* forem semelhantes, o loco será monomórfico. Mas, se for possível separar esses valores em dois ou três grupos (*clusters*), considera-se o loco como polimórfico e consequentemente, ele é classificado como um marcador (Figura 4b).

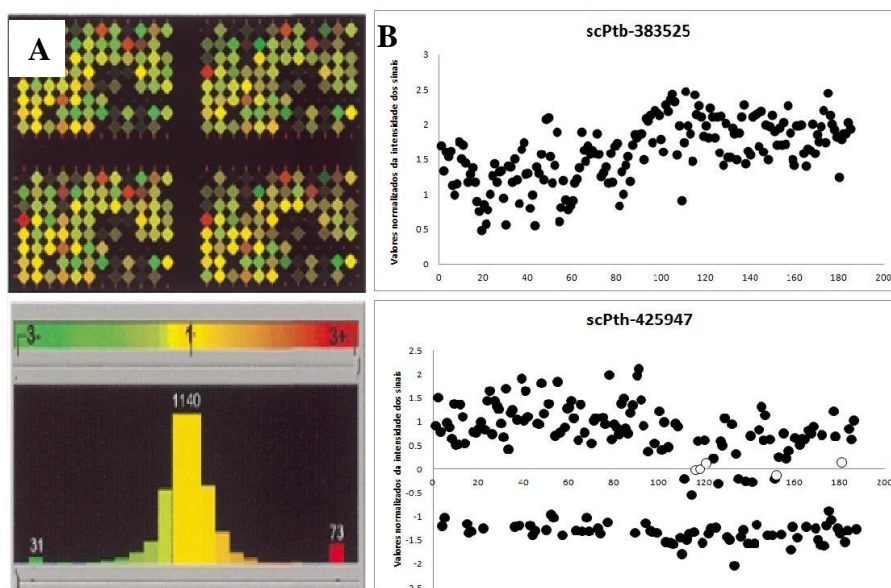


Figura 4. Análise das imagens e detecção de polimorfismo. A) Array de 96 *spots* em quadro *slides*, mostrando a diversidade de sinais de hibridização em quatro cultivares de arroz e o histograma com distribuição trimodal para os valores normalizados da razão entre a intensidade de sinais verde/vermelho. Fonte: Jaccoud et al. (2001). B) Gráficos mostrando a distribuição dos valores normalizados de cada spot para um marcador monomórfico (scPtb-383525) e um polimórfico (scPth-425947) em cana-de-açúcar.

O software classifica todos os pontos dentro dos *clusters* usando um algoritmo (FCM – Fuzzy c-means). O algoritmo define os *clusters* centrais e calcula a probabilidade de cada clone pertencer a estes *clusters* (valor de adesão) num processo iterativo. Por exemplo, um valor de adesão igual 0,9 para o *cluster* 1, significa que este clone pode ser classificado no *cluster* 1 (presença) com uma probabilidade de 90%. Assim, o DArTSoft gera uma tabela binária, baseada nos valores de adesão de cada clone aos *clusters* centrais, atribuindo o valor 0 aos clones pertencentes ao *cluster* mais baixo e o valor 1 aos clones pertencentes ao *cluster* ao mais alto.

Os marcadores DArT são bialélicos, comportam-se de maneira dominante (presença ou ausência). O método de redução da complexidade exerce influência sobre o tipo de polimorfismo detectado pelos marcadores DArT. Por exemplo, o uso de enzimas de restrição que são sensíveis à metilação do DNA (ex. *Pst*I) identificará marcadores baseados tanto na variação de sequências (SNP e indel) como no próprio polimorfismo de metilação (Kilian et al., 2005).

Os marcadores DArT, estão sendo utilizados em estudos de várias espécies de importância agronômica, por exemplo, em cevada (Wenzl et al., 2004), trigo (Akbari et al.,

2006), arroz (Xie et al., 2006), sorgo (Mace et al., 2008), cana-de-açúcar (Heller-Uszynska et al., 2010), entre outras culturas. Nestes trabalhos, os marcadores DArT foram aplicados para caracterizar coleções de germoplasma, para fins de avaliação da magnitude da diversidade genética e para a construção de mapas genéticos de média densidade.

2.5.3 Mapeamento genético

Para utilizar as informações genéticas fornecidas pelos marcadores moleculares de forma mais eficiente, é importante conhecer os locais e as posições relativas destes marcadores nos cromossomos. Através do mapeamento genético é possível realizar tal inferência. A construção de mapas de ligação utilizando marcadores moleculares baseia-se nos mesmos princípios daqueles usados na elaboração de mapas genéticos clássicos: seleção de marcadores, seleção de genótipos parentais, obtenção de uma população segregante, genotipagem dos indivíduos e construção dos mapas de ligação (Xu, 2010).

Segundo Jones et al. (1997), fazer mapeamento genético é distribuir os marcadores nos grupos de ligação, indicar as distâncias relativas entre eles e ordená-los de acordo com os valores de recombinação para cada par de marcador. Liu (1997) define mapas genéticos como modelos abstratos do arranjo linear de um grupo de genes ou marcadores, sendo esses modelos baseados na ocorrência de recombinações de cromossomos homólogos durante a meiose. Essas recombinações são ocasionadas pela ocorrência de eventos, em número ímpar, de *crossing-over* entre os sítios do cromossomo onde estão localizados os marcadores. Portanto, quanto mais próximos estiverem dois marcadores num cromossomo, menor será a possibilidade de ocorrer um evento de recombinação entre eles. Assim, estimando-se que a partir da frequência de recombinação, é possível calcular a distância genética entre os marcadores e estabelecer sua ordem relativa, que permite a construção de mapas genéticos.

Em 1913, Sturtevant definiu fração de recombinação como proporção de genótipos recombinantes, sugerindo sua utilização na estimação da distância entre dois genes. Sturtevant afirmava que, se o arranjo dos genes nos cromossomos é linear e a frequência de recombinação depende da distância física entre eles, os genes podem ser organizados numa linha reta com distâncias proporcionais à fração de recombinação entre eles (Speed & Zhao, 2007).

Os valores das frequências de recombinação não são utilizados diretamente como medida da distância genética entre marcadores, devido ao fato que essa medida não é aditiva, condição necessária para a construção de mapas genéticos. Para satisfazer essa condição de aditividade, existem funções de mapeamento que permitem a correção da distância em porcentagem de recombinação para distância de mapa calculada em centiMorgans – cM (Liu, 1997). As funções de mapeamento propostas por Haldane (1919) e Kosambi (1944) são as mais utilizadas na construção de mapas.

É importante ressaltar que as distâncias genéticas calculadas a partir das frações de recombinação têm baixa correlação com as distâncias físicas expressas em número de pares de bases. Existem regiões cromossômicas pequenas, com algumas dezenas de milhares de pares de bases, em que a probabilidade de ocorrer um evento de recombinação é alta (regiões denominadas de *hotspots* de recombinação). Ao mesmo tempo, há regiões com alguns milhões de pares de bases onde a ocorrência de recombinação é praticamente nula (*e.g.* regiões teloméricas e centrômeros) (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Com as distâncias entre os pares de marcadores estabelecidas, torna-se possível separar os grupos de ligação. Testes são feitos considerando duas marcas de cada vez, com a hipótese H_0 de que a frequência de recombinação entre ambas é igual a 0,5. Em conjunto com os testes, pode-se usar a chamada “propriedade transitiva”, a qual estabelece que se um gene A está ligado ao gene B, e o gene B está ligado ao gene C, então o gene A está ligado ao gene C, assim os grupos vão sendo estabelecidos (Bearzoti, 2000).

As rotinas computacionais implementadas nos softwares utilizados atualmente para a construção de mapas genéticos fazem uso da estatística de teste denominada de razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio*). No intuito de se facilitar a interpretação dos valores observados para esta estatística de teste, foi proposta a utilização de uma grandeza definida como *LOD-score*, ou simplesmente *LOD*, em que:

$$LOD = \log_{10} \frac{L(\hat{r})}{L(r=0,5)}$$

sendo:

$L(\hat{r})$ o valor da função de verossimilhança correspondente à estimativa de máxima verossimilhança de r ;

$L(r=0,5)$ o valor da função de verossimilhança considerando-se a fração de recombinação (r) como igual a 0,5.

Por exemplo, um valor de $LOD=2$ indica que $H_1: (r=\hat{r})$ é 100 vezes mais verossímil do que $H_0: (r = 0,5)$, enquanto que um $LOD=3$ indica que esta razão é de 1000 vezes, e assim por diante (Bearzoti, 2000).

Existem diversos aplicativos computacionais que utilizam diferentes algoritmos de estimação multiponto para as distâncias genéticas e para ordenação de marcadores, desenvolvidos especificamente para a construção de mapas genéticos, tais como MapMaker, Carthagène, GMendel, JoinMap, OutMap, OneMap, entre outros.

2.5.4 Mapeamento Genético em Cana-de-Açúcar

Em poliploides, como a cana-de-açúcar, a construção de mapas genéticos é mais complexa do que em espécies diploides, por diversas razões:(1) um grande número de genótipos distintos é esperado na população segregante,(2) existem vários modelos de formação gamética e pareamento aleatório de múltiplos cromossomos homólogos, (3) as frequências de gametas diferentes não podem ser identificadas com segurança, devido à segregação de alelos com diferentes dosagens, e (4) a constituição genômica de muitos poliploides não é totalmente conhecida (Wu et al.,1992; Alwala & Kimbeng, 2010).

Para superar essas limitações, Wu et al. (1992) propuseram um método para o mapeamento em poliploides que utiliza apenas marcadores em dose única (MDU). Grivet & Arruda (2001) afirmam que, quando a poliploidia é alta e o pareamento é polissômico ou irregular, os alelos que estão presentes numa única cópia são muito mais informativos do que outros marcadores com dosagens diferentes. Por este método, a genotipagem dos indivíduos é sempre baseada na presença ou ausência de marcas, desprezando-se o caráter codominante dos marcadores utilizados, mesmo quando este supostamente for o caso, como ocorre com os marcadores SSR (Albino et al., 2006).

Os marcadores em dose única podem ser detectados de duas maneiras, aqueles que segregam na proporção 1:1, quando a marca está presente em um genitor e ausente em outro (Aaaaaa... x aaaaaa..., ou vice-versa, aaaaaa... x Aaaaaa...), e os marcadores que segregam segundo uma proporção de 3:1, quando o alelo que dá origem à banda está presente em ambos os genitores (Aaaaaa... x Aaaaaa...) (Figura 5).

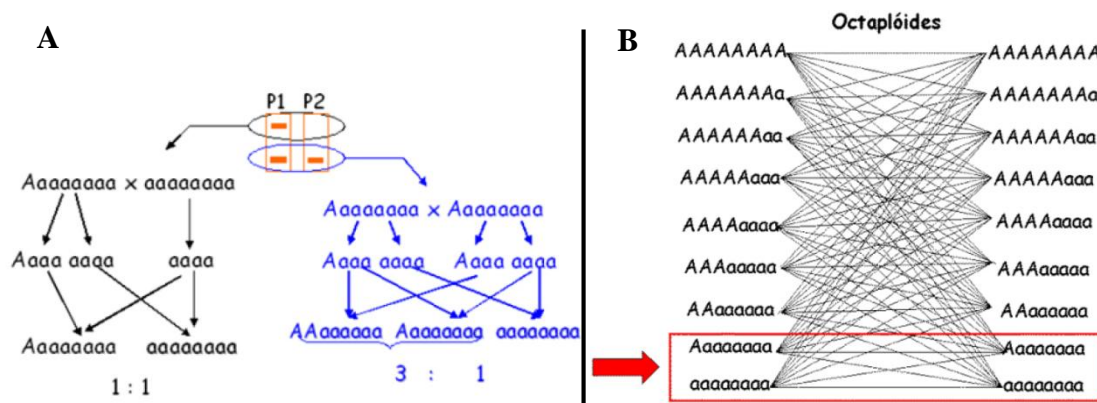


Figura 5. A) Representação da segregação de marcadores em dose única numa progênie (F_1) e B) Esquema ilustrando as diversas combinações possíveis de dosagem alélica em indivíduos octaploides. Em destaque, as combinações de dose única (1:1 e 3:1) (Fonte: Albino et al., 2006).

As variedades modernas de cana-de-açúcar, assim como as espécies selvagens de *Saccharum* são altamente heterozigóticas, não havendo linhas puras melhoradas devido às dificuldades práticas para a realização de autofecundações controladas. As populações de mapeamento são geralmente progênies de primeira geração (F_1). Neste sentido, Grattapaglia & Sederoff (1994) propuseram uma estratégia para a construção de mapas em populações F_1 , denominada de *pseudo-testcross*. Esta abordagem consiste na realização de análises de ligação para cada genitor separadamente, de modo que são construídos mapas individuais.

Utilizando o método de estimação de máxima verossimilhança, Wu et al. (2002) desenvolveram um algoritmo baseado no algoritmo EM (*Expectation Maximization*) para estimar simultaneamente a fração de recombinação e as fases de ligação entre os marcadores. Por este algoritmo, marcadores com diferentes padrões de segregação podem ser analisados num único mapa integrado. Em cana-de-açúcar pode-se utilizar tal procedimento para mapear marcadores com segregação 1:1 e 3:1, e obter um mapa integrado para a espécie.

A adoção dessas estratégias de mapeamento (Wu et al., 1992; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Wu et al., 2002) permitiu a construção de diversos mapas para cana-de-açúcar. Estes mapas foram construídos utilizando dados de populações originárias de cruzamentos interespecíficos envolvendo espécies do gênero *Saccharum* e também de cruzamentos entre variedades comerciais.

Os primeiros mapas estabelecidos para cana-de-açúcar foram propostos por Al-Janabi et al. (1993) e Da Silva et al. (1993), que utilizaram progênies derivadas de um mesmo cruzamento entre um clone de *S. spontaneum* (SES 208 / $2n=64$) e seu duplo-haploide (ADP

85-0068). No primeiro mapa, a partir da seleção de 127 *primers*, foi possível detectar 2160 locos de RAPD numa população de mapeamento composta por 88 indivíduos. Dos 2160 locos visualizados, 279 apresentaram-se polimórficos, e destes, 208 (74,6%) segregaram na proporção 1:1 e foram usados para gerar um mapa com 42 grupos de ligação (Al-Janabi et al., 1993). Para a construção do segundo mapa, um total de 116 sondas de RFLP foi utilizado para genotipar uma progênie de 44 indivíduos, em que foram detectados 295 locos polimórficos, dos quais 216 foram fragmentos de restrição em dose única (*SDRF – Single-Dose Restriction Fragments*) e quando mapeados resultaram em um mapa com 44 grupos de ligação (Da Silva et al., 1993).

Em 1995, Da Silva e colaboradores (incluindo-se Al-Janabi) construíram um mapa genético combinando marcadores RFLP e RAPD para o clone SES 208 (*S. spontaneum*). Neste estudo, foram obtidos 64 grupos de ligação gerados a partir do mapeamento de 527 marcadores, incluindo 208 RAPD/SD (Al-Janabi et al., 1993), 234 SDRF (Da Silva et al., 1993), além de, 41 locos *double-dose* de RFLP (82 marcadores DD) e 1 *triple-dose* (3 marcadores TD). Os 64 grupos de ligação foram organizados em oito grupos de homologia, isto foi possível devido à incorporação dos marcadores DD no mapa gerado com marcadores em dose única (SD). Estes dados demonstraram evidências que o clone SES 208 possui segregação polissômica e comporta-se como um auto-octaploide. Outros mapas foram construídos para *S. spontaneum* (Ming et al., 1998; Ming et al., 2002).

Através de cruzamentos interespecíficos, mapas genéticos foram construídos para a espécie cultivada *S. officinarum* e para as espécies selvagens *S. robustum* e *S. spontaneum*. Guimarães et al. (1999) utilizaram uma progênie derivada do cruzamento entre *S. officinarum* ('LA Purple') e *S. robustum* ('Mol 5829') pra construir mapas genéticos. Trezentos e quarenta e um marcadores *single-dose* (SDM) foram mapeados no genoma de 'LA purple' resultando em 74 grupos de ligação. Para 'Mol 5829', 301 SDM formaram 65 grupos de ligação. Para outro cruzamento interespecífico, envolvendo as espécies *S. officinarum* (variedade 'La Sriped') e *S. spontaneum* (clone SES 147B), foram construídos mapas para os genitores a partir de uma população de mapeamento composta por 100 indivíduos. Neste trabalho, foram utilizados marcadores do tipo AFLP, SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) e TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), em conjunto, resultaram na formação de 49 grupos de ligação para a variedade 'La Sriped' (*S. officinarum*) e em 45 grupos para o clone SES 147B (*S. spontaneum*) (Awala et al., 2008).

O primeiro estudo de mapeamento para variedades modernas foi desenvolvido por Grivet et al. (1996), em que 128 sondas de RFLP e uma isoenzima foram usadas para gerar um montante de 630 marcadores segregantes a partir da genotipagem de uma progênie de 77 indivíduos, derivada de autofecundação da variedade elite “R570”. Deste total de 630 marcadores, 408 foram alocados em 96 grupos de ligação, os quais foram reunidos em 10 grupos de homologia. Neste trabalho também se investigou a origem dos marcadores, através da comparação de padrões de RFLP entre a variedade R570 e clones das espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. barberi*. Foi possível analisar a origem de 146 marcas, sendo 80 (54,8%) destas originárias de *S. officinarum* e 66 (45,2%) de *S. spontaneum*, não aparecendo bandas específicas para *S. barberi*. Diante disso e da premissa que 80% do genoma das variedades modernas são provenientes de *S. officinarum*, pode-se concluir que a resolução do mapa é consideravelmente mais alta na porção do genoma derivada de *S. spontaneum*. Dados que corroboram com a ideia de que esta espécie é a principal responsável pela diversidade genética encontrada nas canas modernas (Piperidis et al., 2010).

Uma nova progênie, de 295 indivíduos, resultante da autofecundação da variedade R570 foi analisada através de 37 *primers* de AFLP, gerando 1185 marcas polimórficas. Destas, 939 (marcas 3:1) foram utilizadas na construção de um mapa genético com 120 grupos de ligação, com comprimento cumulativo de 5849 cM (Hoarau et al., 2001). Incorporando marcadores RGA (genes análogos de resistência) e SSR a este mapa, Rossi et al. (2003) obtiveram um novo mapa com 128 grupos de ligação e 8 grupos de homologia.

O cruzamento entre o clone IJ76-514 (*S. officinarum*) e a variedade comercial australiana ‘Q165’ originou uma progênie composta por 227 genótipos, que foi utilizada para a construção de mapas de ligação para cada genitor (Aitken et al., 2005).

Para a variedade ‘Q165’, as análises de mapeamento foram realizadas a partir de marcadores AFLP, RAF (*Randomly Amplified DNA Fingerprint*) e SSR. Foram detectados 1365 marcadores polimórficos, dos quais 967 (71%) foram classificados como *single-dose*. Deste total, 910 foram distribuídos em 116 grupos de ligação, com comprimento de mapa acumulado em 9058,3 cM. Posteriormente foram adicionados a este mapa, 123 marcas *double-dose*, 36 marcas *simplex* biparental (3:1) e 5 marcas *single-dose* que tinham sido descartadas inicialmente pelo teste de distorção, totalizando 1074 marcadores mapeados em 136 grupos de ligação. Com a análise, principalmente, dos SSR foi possível distribuir 127 dos 136 grupos de ligação em oito grupos de homologia (Aitken et al., 2005). Num trabalho

recente com marcadores DArT, Heller-Uszynska et al. (2010) incorporaram grande quantidade de marcas ao mapa de ligação gerado para a variedade 'Q165'.

Na construção do mapa de ligação para o clone IJ76-514 de *S. officinarum* (parental feminino), 595 marcas polimórficas, herdadas a partir de IJ76-514, foram reveladas através da utilização de 40 pares de *primers* de AFLP e 72 de SSR. Das 595 marcas obtidas, apenas 240 foram classificadas como *single-dose* e, por sua vez, distribuídas em 47 grupos de ligação. Assim como no mapa construído para a variedade 'Q165', neste mapa também foram acrescentados marcadores *double-dose* e *simplex* biparental. Com isso, um conjunto 534 marcadores foi mapeado para formar 123 grupos de ligação, dos quais 105 foram agrupados em dez grupos de homologia (Aitken et al., 2007).

O emprego de novas metodologias nos estudos de mapeamento tem aperfeiçoado o desenvolvimento de mapas genéticos em cana-de-açúcar. Abordagens, como a proposta por Wu et al. (2002) que utiliza um algoritmo (*EM*) para estimar simultaneamente a fração de recombinação e a fase de ligação entre locos, permitiram a construção de um único mapa integrado para uma população derivada do cruzamento entre duas variedades pré-comerciais brasileiras (SP80-180 x SP80-4966). A avaliação de três tipos de marcadores (RFLP, SSR e AFLP) resultou num total de 1118 marcas *single-dose*, oriundas da genotipagem de 100 indivíduos, os quais foram selecionados aleatoriamente numa progênie de 498 genótipos. Após as análises de mapeamento foram obtidos 131 grupos de ligação, representando um comprimento total de 2602 cM (Garcia et al., 2006). Os procedimentos de mapeamento foram executados no *software* OneMap (Margarido et al., 2007), desenvolvido com o intuito de facilitar as análises de ligação em espécies em que as gerações de mapeamento não são derivadas do cruzamento entre linhas puras, através da utilização do algoritmo *EM*.

Com o objetivo de construir um mapa refinado e mais saturado para cana-de-açúcar, Oliveira et al. (2007) incorporaram ao mapa gerado por Garcia et al. (2006), marcadores RFLP e SSR desenvolvidos a partir de sequências expressas (EST). Estes autores obtiveram um mapa com 192 grupos de ligação, dos quais 120 foram distribuídos em 14 grupos de homologia.

Os estudos de mapeamento genético não somente permitiram uma melhor compreensão da organização do genoma da cana-de-açúcar e de sua arquitetura genética, mas também facilitaram a detecção e identificação de locos que contribuem para a variação de características quantitativas (QTL). Os trabalhos voltados ao mapeamento de QTL têm

identificado genes importantes, relacionados, por exemplo, à resistência à ferrugem e à cor do caule (Raboin et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

A população de mapeamento utilizada neste trabalho foi composta por 186 genótipos selecionados aleatoriamente a partir de uma progênie F₁ constituída de 786 indivíduos, provenientes do cruzamento entre uma variedade amplamente utilizada em cruzamentos realizados pela RIDESA, a RB72454 (genitor masculino – doador de pólen) e entre um genótipo não lançado no mercado, a RB97327 (genitor feminino). O cruzamento foi realizado na Estação de Floração e Cruzamento da RIDESA, localizada na região da Serra do Ouro em Murici-AL.

A variedade RB72454 apresenta bom desenvolvimento, com colmos de bom diâmetro, boa altura e peso elevado, palmito médio, baixa exigência em fertilidade do solo, alto teor de sacarose, alta produtividade e excelente sanidade. Tem origem no cruzamento envolvendo o genitor CP53-76. O genótipo RB97327, genitor feminino, foi obtido tendo como um dos genitores a variedade H641881, que apresenta boa produtividade, alto teor de fibra e brix, além de elevada pureza.

As sementes produzidas foram encaminhadas à Universidade Federal de Goiás. Após a obtenção das plântulas em casa-de-vegetação, estas foram transferidas individualmente para garrafas plásticas (*pets*) de 2L, permanecendo nestes recipientes por nove meses, para então serem transplantadas para uma área da Usina Centroálcool, localizada no município de Inhumas - GO (16°15'27"S, 49°33'07"W). Todo o processamento do material vegetal foi executado no Laboratório de Genética e Genômica de Plantas do Setor de Melhoramento de Plantas da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a extração do DNA genômico total foram coletadas gemas laterais dos colmos dos indivíduos selecionados. A retirada das gemas ocorreu com o auxílio de

espátulas, as quais foram desinfetadas em álcool 70% após cada coleta. O material foi transferido ainda no campo para microtubos de 2 mL contendo 300 µL de tampão de homogeneização (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 2,2 M NaCl; CTAB 2% e sulfito de sódio 0,06%), na tentativa de minimizar o efeito da oxidação do tecido vegetal.

O DNA genômico total foi isolado de acordo com o protocolo específico para cana-de-açúcar proposto por Al-Janabi et al. (1999) com adaptações para tubos de 1,5 mL. Inicialmente, foram depositadas de 3 a 4 *beads* nos microtubos contendo o material vegetal imerso no tampão de homogeneização. Antes da maceração do tecido foram adicionados 450 µL de mix (150 µL de N-lauril-sarcosina 5%; 150 µL de PVP 10%; 150 µL de CTAB 20%) pré-aquecido em banho-maria. O aquecimento do mix facilita a homogeneização e a pipetagem da mistura. As amostras foram maceradas utilizando o equipamento *Tissuelyser* (Qiagen) por 2 minutos em velocidade máxima. Os microtubos foram mantidos em banho-maria por 1 hora a 65 °C, com homogeneização por inversão a cada 10 minutos. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e foram adicionados 750 µL de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1), com homogeneização por inversão por 10 minutos, ininterruptamente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para microtubos de 1,5 mL, recém preparados, contendo 500 µL de isopropanol e 80 µL de solução NaCl 6M. Os microtubos foram agitados por inversão durante 5 minutos e incubados a -20°C por 40 minutos. Realizou-se a centrifugação da mistura por 10 minutos a 10000 rpm à temperatura ambiente, descartando-se a fase aquosa. Os *pellets* obtidos foram lavados duas vezes com álcool etílico 70% (500µL), secos à temperatura ambiente e ressuspensos em 60 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA, 1 mM, pH 8,0) contendo RNase (50 µg/mL). Para finalizar o processo de extração do DNA genômico total, os microtubos foram incubados a 37°C por duas horas e armazenados a -20 °C.

A qualidade do DNA genômico total foi verificada inicialmente em gel de agarose 1%, corado em solução de brometo de etídio e visualizado em foto-documentador sob luz UV.

Em seguida, foi realizada a quantificação do DNA em espectrofotômetro *Qubit* (*Invitrogen*®). Após a quantificação, as soluções contendo DNA de cada um dos 186 indivíduos da progênie e dos dois genitores foram diluídas a uma concentração de 60 ng/µL, com volume final igual a 20 µL, e distribuídas em duas placas de 96 poços, reservando dois poços em cada placa (G12 e H12) para controle da empresa de genotipagem. As placas foram

lacradas e armazenadas a menos -20°C até a data de envio para a empresa responsável pela genotipagem do material.

3.3 GERAÇÃO DOS MARCADORES DArT

A tecnologia dos marcadores DArT foi proposta por Jaccoud et al. (2001) e atualmente é aplicada em rotina pela empresa prestadora de serviços *Diversity Arrays Technology Pty Ltd* (DArT P/L), localizada na cidade de Canberra na Austrália. Após o preparo das amostras, o material foi acondicionado em recipiente adequado e enviado à DArT P/L para que fosse realizada a genotipagem dos 188 indivíduos.

3.4 ANÁLISES DE SEGREGAÇÃO DOS MARCADORES DArT

Testes preliminares às análises de segregação foram realizados para verificar a possível ocorrência de autofecundação e de indivíduos contaminantes entre os genótipos analisados. Tais testes apontaram a existência de duas populações distintas: uma população resultante de autofecundação do genitor feminino RB97327, composta por 81 (43,5%) indivíduos; e outra originária do cruzamento biparental entre RB97327 e RB72454 genitor masculino, formada por 91 (49%) indivíduos. Verificou-se ainda a presença de 14 (7,5%) indivíduos contaminantes ou com excesso de observações perdidas, que foram descartados. Assim, as análises de mapeamento genético foram realizadas separadamente para as duas populações.

A dosagem dos marcadores foi estimada pela análise dos padrões de segregação (presença x ausência) dos marcadores DArT, por comparação com as proporções esperadas para marcadores de dose única, 1:1 (*Aaaaaaaa... x aaaaaaaa...*, ou vice-versa) e 3:1 (*Aaaaaaaa... x Aaaaaaaa...*), em que a presença do alelo positivo corresponde a “A” e a ausência é representada por “a” (Wu et al., 1992). As proporções observadas de segregação foram submetidas ao teste de aderência de Qui-Quadrado (χ^2), sob a hipótese H_0 de que não há distorção das segregações mendelianas. Para fins de correção do erro tipo I para as comparações múltiplas, foi utilizado o critério de correção FDR (*False Discovery Rate*) igual a 0,01. Marcas com distorções significativas de segregação foram eliminadas da análise.

3.5 CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO

Para realizar a construção dos mapas de ligação utilizou-se o pacote OneMap (Margarido et al., 2007) do programa estatístico R (*R Development Core Team*, 2011). As análises realizadas no OneMap são baseadas em abordagens de estimação multiponto com modelos markovianos ocultos (*hidden Markov models*). A análise de ligação entre marcadores, tomados dois a dois, para fins de estimação das frações de recombinação é realizada via algoritmo EM (*Expectation Maximization*). A principal característica do aplicativo consiste na estimação simultânea da fração de recombinação e das fases de ligação entre os marcadores, conforme a metodologia proposta por Wu et al. (2002). Assim, esta metodologia permite a análise de diversos tipos de marcadores contendo vários padrões de segregação.

Diante da existência de duas populações de mapeamento entre os genótipos analisados, optou-se pela construção de cinco mapas de ligação no presente trabalho. Um mapa corresponde ao genitor feminino RB97327, utilizando os dados gerados pela população de autofecundação, em que foi alocado no mapa o maior número possível de marcadores, tendo como critério, a escolha da melhor ordem fornecida pelos mecanismos de ordenação. Os outros quatro mapas foram obtidos a partir dos dados gerados na população resultante do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454: um mapa integrado contendo todas as marcas ligadas, utilizando a melhor ordem sugerida pelo software; um *framework* deste mapa integrado, em que a escolha da melhor ordem foi feita utilizando-se como critério um valor de $\Delta\text{LOD} = 2$ entre a primeira e a segunda melhores ordens sugeridas pelo software; um terceiro mapa para o genitor RB97327 e um quarto mapa, para o genitor RB72454. Estes dois últimos mapas foram construídos visando exclusivamente à estimação do tamanho dos genomas das duas variedades envolvidas no cruzamento.

Os critérios utilizados para a construção dos mapas de ligação foram: $\text{LOD} \geq 3,5$ e fração de recombinação $\leq 0,4$ para a população resultante de autofecundação do genitor RB97327. E, $\text{LOD} \geq 5,0$ e fração de recombinação $\leq 0,4$ para os mapas referentes à população obtida por cruzamento biparental (RB97327 X RB72454). Os valores das frações de recombinação entre as marcas foram convertidos em centiMorgans (cM) utilizando a função de mapeamento proposta por Kosambi (1944).

No software OneMap, as funções que executam o teste de dois pontos e aloca os marcadores em grupos de ligação, são “*rf.2pts*” e “*group*”, respectivamente. A ordenação

dos marcadores foi obtida utilizando as funções “*compare*” para grupos com até seis marcas e “*order.seq*” para grupos com sete ou mais marcadores. A função *compare* compara todas as ordens possíveis de marcadores numa sequência e a função *order.seq* automatiza a construção do mapa através das funções *compare* e *try.seq*, respectivamente.

O software oferece a opção de visualização da matriz de frações de recombinação e de valores de *LOD* (*heatmaps*) ao término da ordenação, através do comando “*draw.try*”. Esta opção permite identificar possíveis ligações espúrias, auxiliando assim, na obtenção da melhor ordem. A ordem final foi verificada pela permuta de ordem de marcadores adjacentes através da função “*ripple.seq*”.

Para a representação gráfica dos grupos de ligação utilizou-se o software MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

3.6 ESTIMAÇÃO DO TAMANHO DO GENOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR

O tamanho dos genomas dos genitores (RB97327 e RB72454) da população de mapeamento foi estimado de acordo com a metodologia proposta por Hulbert et al. (1988). Esta metodologia consiste na estimação do número total de cM do genoma de um indivíduo a partir dos dados de mapeamento.

Segundo Hulbert et al. (1988), o tamanho do genoma (G) de um indivíduo, expresso em cM, pode ser estimado por:

$$\hat{G} = \frac{n(n-1)}{2} \cdot \frac{2X}{K}$$

n é o número de marcadores utilizados na construção do mapa; X é a distância correspondente ao valor de *LOD* estabelecido como limite (T), e K é o número de pares de marcadores com valores de *LOD* igual ou superior a T . Os valores de X e K são obtidos pela análise dos dados da matriz de frações de recombinação e de valores de *LOD* para pares de marcadores.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DE SEGREGAÇÃO DOS MARCADORES DARt

Foram utilizados dois métodos de redução da complexidade (duas enzimas de restrição – scPth/scPtb) para a geração dos marcadores DARt em cana-de-açúcar. A partir desse procedimento, 7680 locos foram obtidos através da genotipagem dos 186 indivíduos. Para a população resultante de autofecundação, dos 7680 locos genotipados, apenas 470 (6,2%) se mostraram polimórficos. Dentre os quais, 392 (83,4%) não apresentaram distorção de segregação para a hipótese de dose única para marcas biparentais (3:1, *ao x ao*) perante o teste de χ^2 ($\alpha=5\%$).

Dos 850 marcadores (11,1% do total) que segregam na população proveniente do cruzamento biparental, 632 (74,3%) não apresentaram distorção segundo o teste de χ^2 para a hipótese de dose única. Dessas, 183 (29%) segregaram a partir do genitor RB97327 (*ao x oo*), 287 (45,4%) no genitor RB72454 (*oo x ao*) e 162 (25,6%) com presença em ambos os genitores (*ao x ao*). Os resultados da análise de distorção de segregação, para as duas populações de mapeamento, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos nas análises de segregação dos marcadores DARt para as duas populações de mapeamento.

	População 1 Autofecundação	População 2 Cruzamento biparental
Total de locos genotipados	7680	7680
marcadores polimórficos	470 (6,2%)	850 (11,1%)
marcadores em dose única (MDU)	392 (83,4%)	632 (74,3%)
segregação 1:1	-	470 (74,4%)*
segregação 3:1	392 (100,0%)	162 (25,6%)
marcadores com outros tipos de segregação	78 (16,6%)	218 (25,7%)
Total de marcadores submetidos à análise de ligação	392	632

* marcas com segregação 1:1 referente ao somatório de ambos os genitores (RB97327 x RB72454)

Tais resultados se assemelham aos obtidos por Heller-Uszinska et al. (2010), que desenvolveram marcadores DARt para a cultura da cana-de-açúcar a partir do cruzamento Q165 x IJ76-514, uma variedade Australiana e um clone de *S. officinarum*, respectivamente.

Neste trabalho os pesquisadores utilizaram uma progênie de 94 indivíduos para genotipar 6144 locos. Destes, apenas 241 (3,9%) apresentaram polimorfismo, com 204 (84,65%) sem distorção de segregação. O número de marcadores segregando na razão 1:1 foi de 149 (73,04%) e com razão 3:1 igual 55 (26,96%).

Quando a poliploidia é alta e o pareamento é polissômico ou irregular, como ocorre em cana-de-açúcar, marcadores que estão presentes em cópia única são mais informativos para a construção de mapas genéticos do que aqueles que segregam em diferentes dosagens (Grivet & Arruda, 2001). Wu et al. (1992) afirmam que uma população de mapeamento composta por 75 indivíduos é suficiente para identificar marcadores em dose única com alto nível de confiança, independentemente do nível de ploidia apresentado. Os marcadores em dose única reportados no presente trabalho foram identificados em progênies contendo 81 e 91 indivíduos, correspondendo a 83,4% e 74,3%, respectivamente, do total de marcadores polimórficos. Levando em consideração o tamanho do genoma da cana-de-açúcar e o fato de que o número de indivíduos estabelece o nível máximo de resolução que um mapa pode alcançar com um número ilimitado de marcadores (Coelho, 2000), a construção de mapas genéticos com cobertura satisfatória do genoma dessa espécie requer populações de mapeamento contendo algumas centenas de indivíduos e milhares de marcadores polimórficos.

Os números de marcadores em dose única, com segregação 1:1, obtidos para a população de cruzamento biparental (74,4% do total de marcadores em dose única) foram próximos aos relatados por outros autores em estudos de mapeamento genético em cana-de-açúcar, como por exemplo: 74,6%, descrito por Al-Janabi et al. (1993); 71%, por Aitken et al. (2005); e 78%, por Alwala et al. (2008). Deste modo, pode-se inferir que em análises de ligação em populações de primeira geração (F_1) resultante de cruzamentos simples, em média, 75% dos marcadores em dose única em cana-de-açúcar correspondem a locos com segregação 1:1.

A taxa de polimorfismo (6,2% e 11,1%) dos marcadores DArT em cana-de-açúcar foi consideravelmente baixa quando comparada com valores observados para outras classes de marcadores, como AFLP e SSR (Garcia et al., 2006; Palhares 2010; Aitken et al., 2005). Ao utilizar marcadores AFLP para construir um mapa de ligação para a variedade R570, Hoarau et al. (2001) obtiveram um total de 4611 locos gerados usando combinações de 37 *primers*, desses 26% (1180) foram polimórficos. Possivelmente, o baixo índice de polimorfismo apresentado pelos marcadores DArT está relacionado ao número de métodos

de redução de complexidade do genoma, pois isto determina a eficiência na identificação do polimorfismo (Heller-Uszinska et al., 2010). Assim, a utilização de um maior número de enzimas de restrição no desenvolvimento dos DArT seria necessário para alcançar um número satisfatório de locos polimórficos.

4.2 MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO

Os mapas genéticos apresentados a seguir são os primeiros desenvolvidos exclusivamente com marcadores DArT em cana-de-açúcar. Inicialmente, foi construído um mapa de ligação a partir da análise de uma progênie derivada de autofecundação da variedade RB97327, e quatro mapas utilizando uma progênie gerada do cruzamento biparental entre as variedades RB97327 e RB72454. Os mapas referentes aos dois genitores foram construídos apenas para se estimar o tamanho do genoma dessas variedades.

Para realizar a construção dos mapas de ligação, as duas populações de mapeamento foram analisadas separadamente. Os marcadores utilizados no mapeamento foram decodificados de acordo com a origem do polimorfismo e o tipo de segregação, seguindo a metodologia proposta por Wu et al. (2002) e adotada no *software* OneMap.

4.2.1 Mapa de ligação construído com dados da população de autofecundação

Na construção do mapa correspondente ao genitor RB97327, as 392 marcas geradas a partir da análise genética da população originária de autofecundação foram classificadas como de segregação 3:1. A partir dessas informações foi confeccionado o arquivo de entrada do software OneMap: uma matriz contendo as informações de genotipagem dos 81 indivíduos para cada marcador.

Dos 392 marcadores considerados inicialmente, 337 (86%) apresentaram algum tipo de ligação com $LOD \geq 3,5$ e fração de recombinação $\leq 0,4$, formando 85 grupos de ligação (GL). Os 55 (14%) marcadores restantes não se ligaram com nenhuma outra marca. Cinco grupos de ligação foram formados por dois marcadores, ligados a uma distância de 0 cM, originados de uma mesma sonda do *array*, com diferentes métodos de redução de complexidade. Estes marcadores, de fato, correspondem à mesma região genômica e foram descartados por não oferecerem nenhum tipo de informação adicional (Apêndice A).

O mapa final, construído para o genitor RB97327 a partir de dados provenientes da população de autofecundação, apresentou 307 marcadores distribuídos em 80 GL (Figura 6). Destes, 37 (46,25%) foram compostos por dois marcadores, 29 (36,25%) grupos apresentaram de três a cinco marcadores e 14 (17,5%) grupos foram constituídos por seis até 13 marcadores.

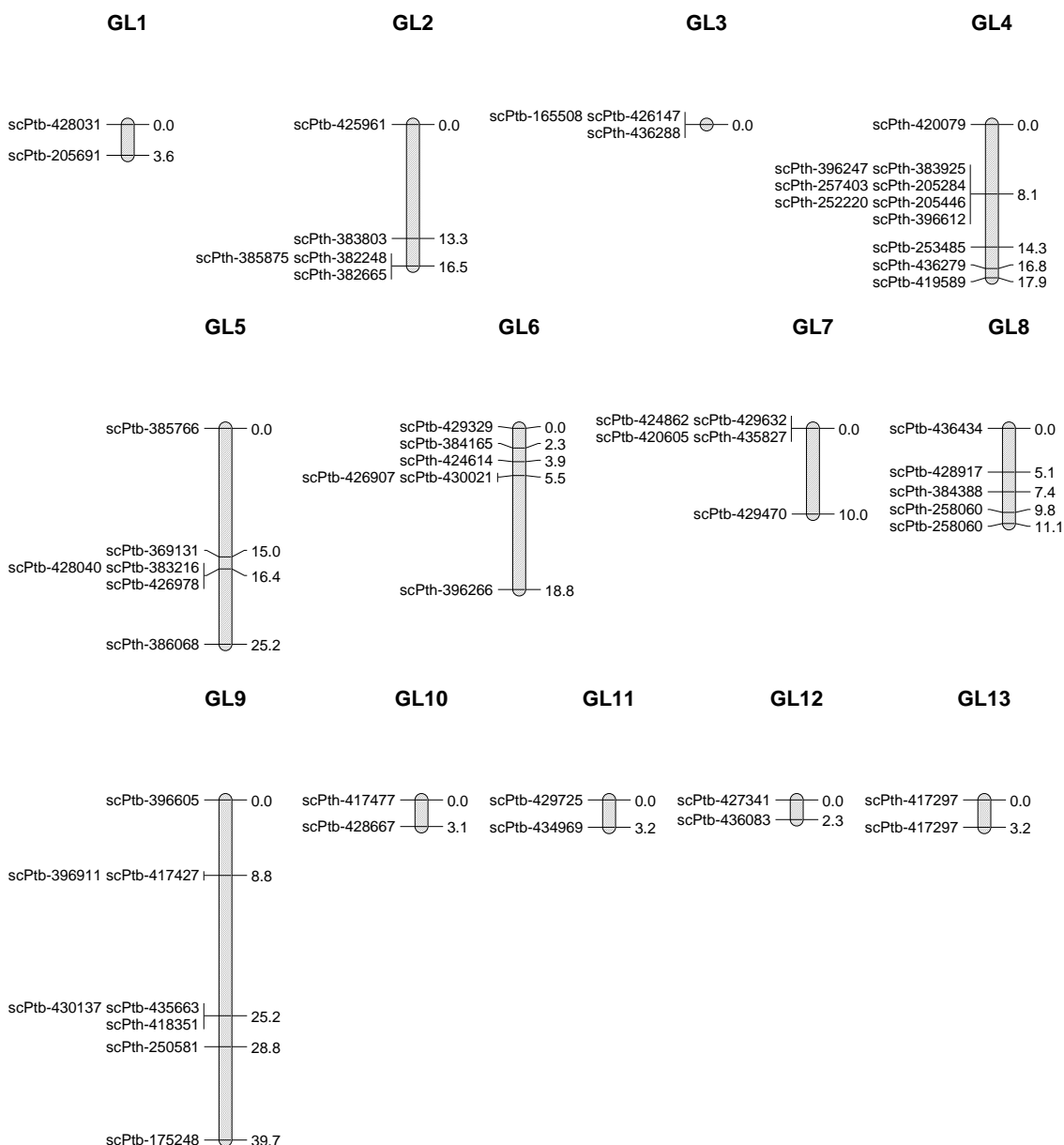


Figura 6. Mapa de ligação correspondente ao genitor RB97327 desenvolvido a partir de dados gerados para a população originária de autofecundação. Todos os marcadores segregaram na proporção 3:1. À esquerda estão localizados os códigos referentes aos marcadores e à direita as distâncias genéticas em cM, estimadas pela função de Kosambi (continua).

Figura 6. (continuação)

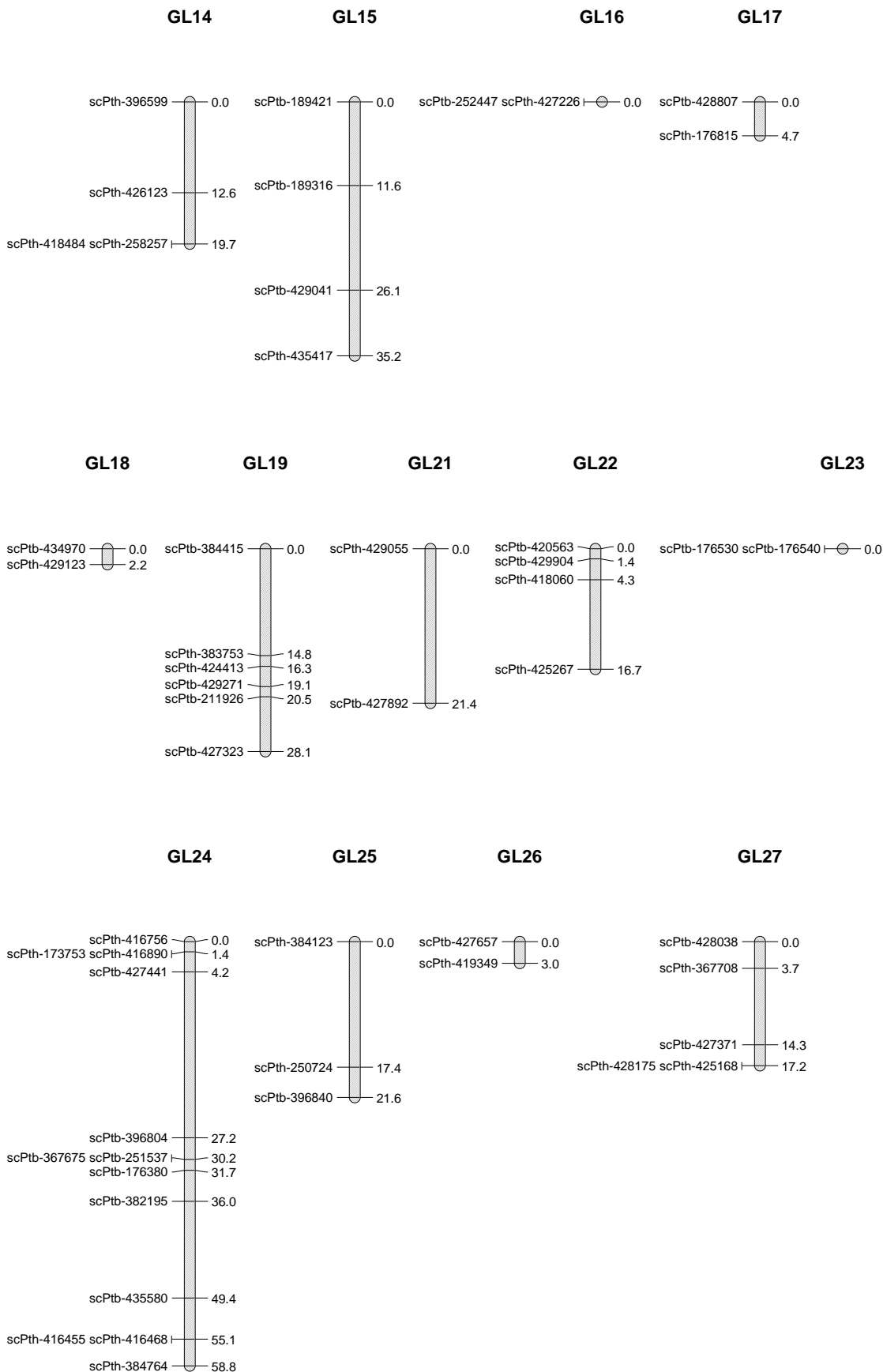


Figura 6. (continuação)

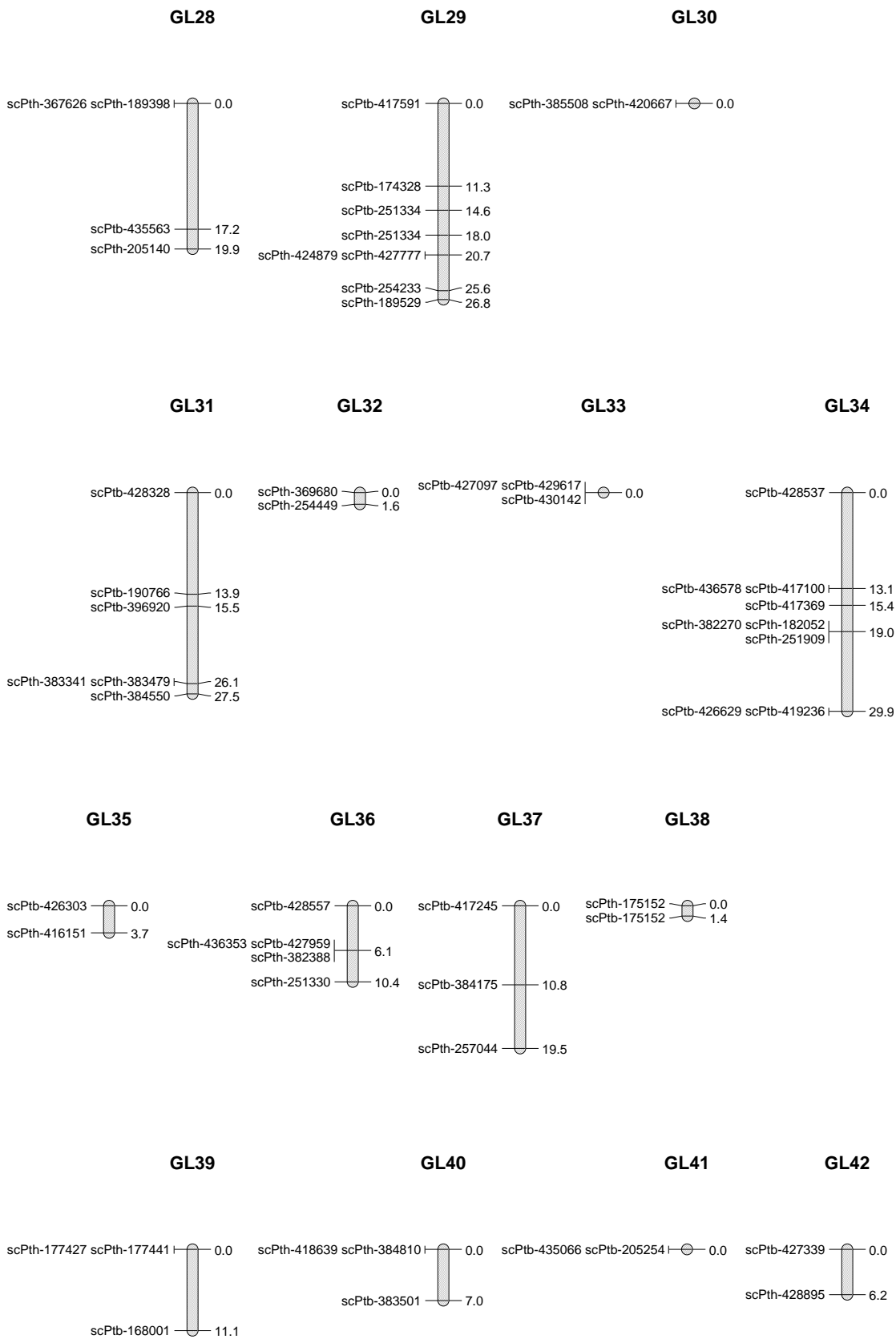


Figura 6. (continuação)

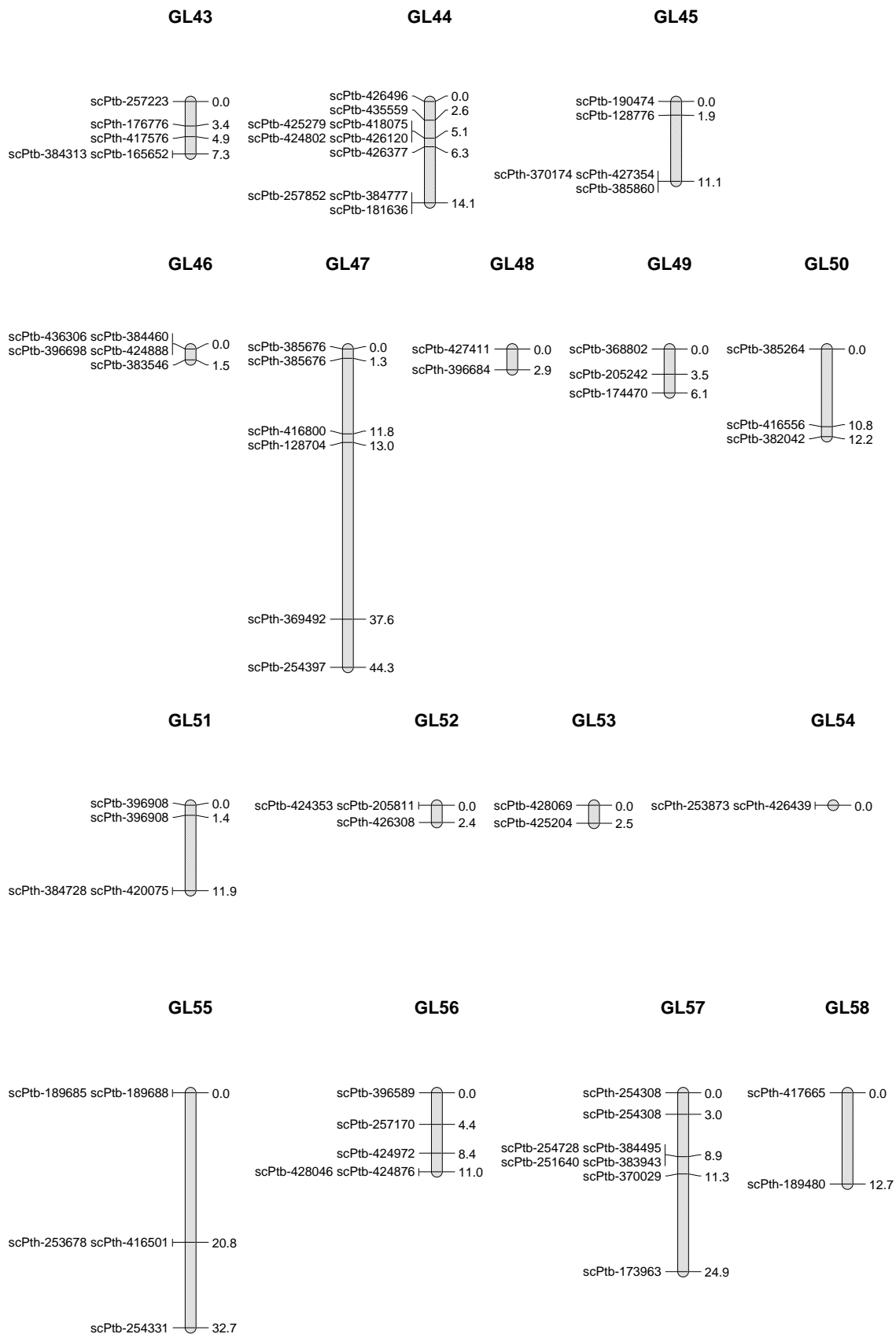


Figura 6. (continuação)

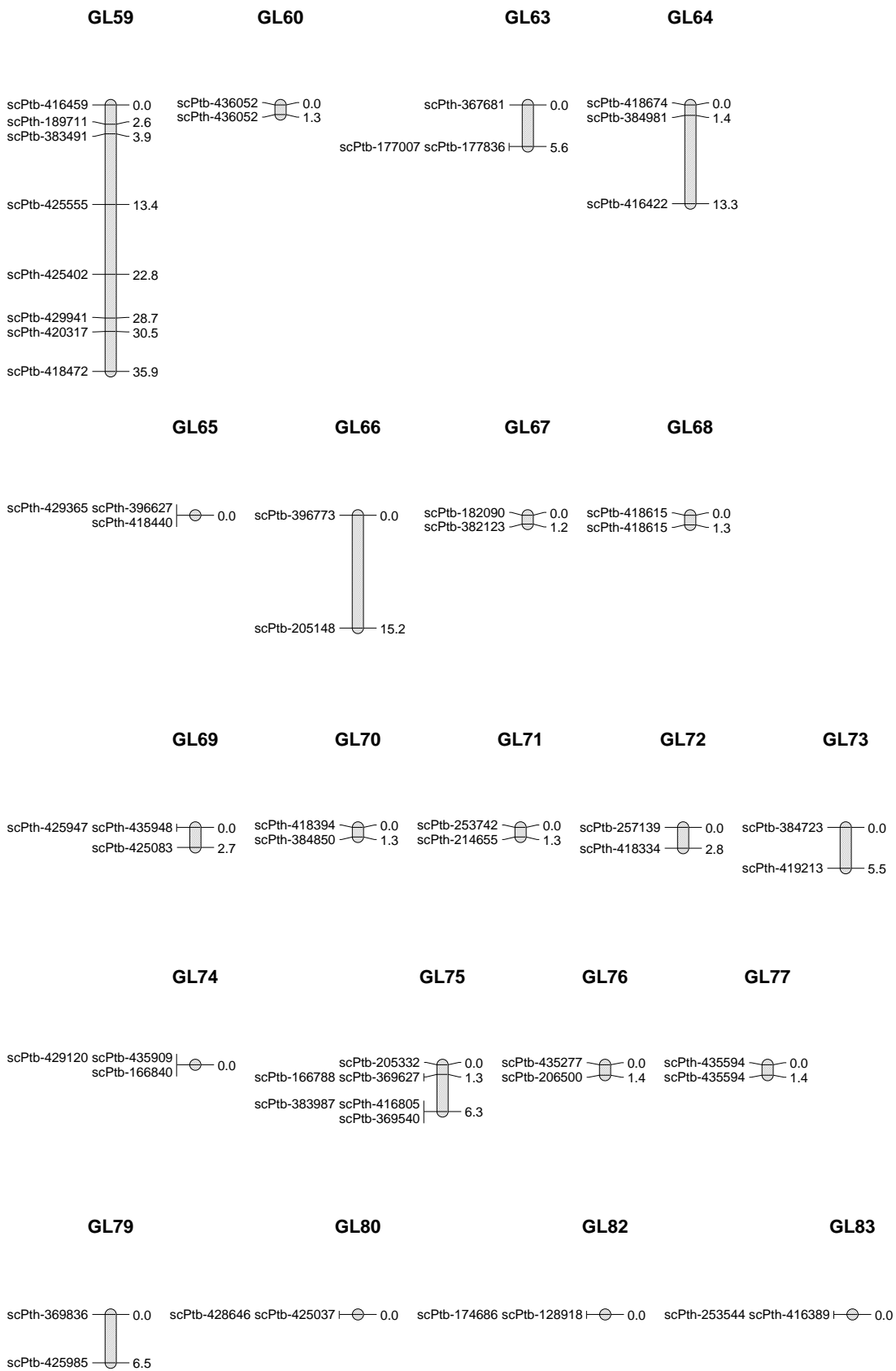
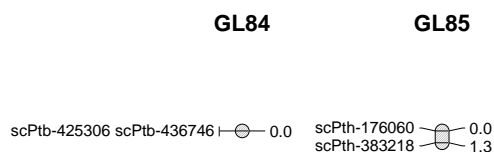


Figura 6. (continuação)

O comprimento total do mapa de ligação foi de 849,97cM. O tamanho dos grupos de ligação variou de 0 cM (11 grupos) a 58,8 cM (grupo GL24), com média de 10cM. A densidade de marcadores foi de 1 marcador/3,61cM, com distribuição aleatória nos grupos de ligação. O maior intervalo observado entre os marcadores foi de 24,6cM (grupo GL47).

A taxa de marcadores não ligados (14%) foi similar à encontrada no mapeamento das espécies *S. spontaneum*, 15,4% (Al-Janabi et al., 1993), 13% (Da Silva et al., 1993) e *S. officinarum*, 17% (Guimarães et al., 1999). Esses valores podem ser considerados baixos, perante aos observados em trabalhos envolvendo cruzamentos de variedades comerciais, os quais geralmente apresentam taxas entre 20 a 60% (Grivet et al., 1996; Garcia et al., 2006). No entanto, valores significativamente inferiores, como 5% de marcadores não ligados, foram observados no mapeamento de marcadores AFLP, SSR e RAF para a variedade Q165 (Aitken et al., 2005) e AFLP para a variedade R570 (Hoarau et al., 2001).

Elevadas taxas de marcadores não ligados possivelmente estão relacionadas com altos valores críticos de LOD adotados e com o tipo de material utilizado para gerar a população de mapeamento. Cruzamentos entre variedades comerciais originárias de híbridos interespecíficos resultam em progênies com sistema genético bastante complexo, apresentando aneuploidias e problemas de pareamento de cromossomos durante a meiose (Garcia et al., 2006).

Em relação ao número de grupos de ligação, não foi encontrada similaridade com os mapas desenvolvidos para variedades modernas. No entanto, vale ressaltar que a maioria dos estudos de mapeamento genético utilizam populações que não são derivadas de autofecundação, mas provenientes de cruzamentos interespecíficos ou envolvendo variedades modernas.

O tamanho total do mapa gerado foi inferior à média encontrada para alguns dos mapas disponíveis para cana-de-açúcar, provavelmente em razão do pequeno número de marcadores utilizados nas análises de ligação, com grande quantidade de grupos de ligação de tamanho reduzido, comprimento entre 0 e 10 cM.

Estudos de mapeamento em progênies derivadas de autofecundação foram realizados para a variedade comercial R570. Grivet et al. (1996) obtiveram 96 GL com um comprimento total de 2008 cM, a partir da análise ligação de 408 marcadores RFLP. Hourau et al. (2001) mapearam 887 marcadores AFLP para formar 120 GL com tamanho acumulado de 5849 cM. Andru et al. (2011) utilizaram marcadores AFLP, SSR e TRAP para genotipar uma progênie derivada de autofecundação da variedade 'LCP 85-384', em que foram mapeados 784 marcadores para formar 108 GL, que somados alcançaram um total de 5387 cM. Estes dados corroboram com a premissa de que o número de marcadores tem efeito direto no número de GL e conseqüentemente na cobertura do mapa. De acordo com Coelho (2000), tanto o grau de cobertura do genoma quanto à densidade do mapa a ser construído são influenciados pelo número de marcadores utilizados.

Os resultados apresentados a respeito da composição dos grupos de ligação foram condizentes com grande parte dos mapas construídos para cana-de-açúcar, os quais apresentam um elevado número de grupos de ligação compostos por dois marcadores e com tamanho reduzido, a maioria menor que 10 cM (Al-Janabi et al., 1993; Grivet et al., 1996; Guimarães et al., 1999; Aitken et al., 2005; Garcia et al., 2006; Aitken et al., 2007; Alwala et al., 2008). Tal fato, possivelmente, está relacionado com o tamanho físico dos cromossomos apresentados pelas espécies do gênero *Saccharum* e pelas variedades modernas, os quais são bastante reduzidos (D'Hont et al., 1998; Piperidis et al., 2010). Como já salientado, outros fatores também influenciam no tamanho dos grupos de ligação, como o número de marcadores mapeados e os valores críticos de LOD e de fração de recombinação. Em cana-de-açúcar tem sido utilizado o valor crítico de LOD igual ou superior a 3 e fração de recombinação entre 0,25 e 0,45 (Da Silva et al., 1993; Al-Janabi et al., 1993; Grivet et al., 1996; Aitken et al., 2005; Andru et al., 2011). A utilização de valores críticos de LOD altos pode resultar na fragmentação dos grupos de ligação, que de outro modo permaneceriam conectados entre si formando grupos maiores.

4.2.2 Mapa de ligação integrado construído com dados da população de cruzamento biparental

Para a construção do mapa integrado, referente à população gerada a partir do cruzamento entre RB97327 x RB72454, os 632 marcadores disponíveis para as análises de mapeamento foram distribuídos do seguinte modo: 183 (29%) segregando 1:1, com alelo

para a presença no genitor 1 (*ao x oo*); 287 (45,4%) segregando 1:1, com alelo para presença no genitor 2 (*oox ao*) e 162 (25,6%) segregando 3:1, com alelos para presença em ambos os genitores (*ao x ao*).

Dos 632 marcadores, 526 (83,2%) foram agrupados para formar 122 grupos de ligação (GL) com valor crítico de LOD =5 e fração de recombinação $\leq 0,4$. O número de marcadores não ligados foi igual a 106 (16,8%). A seleção da melhor ordem dos marcadores nos respectivos grupos de ligação foi realizada tendo como critério de escolha, a ordem mais verossímil e que oferecesse o maior número de marcas dentre alternativas fornecidas pelos mecanismos de ordenação. Dezesesseis grupos formados por dois marcadores originados pelos dois mecanismos de redução de complexidade, mas relacionados a uma mesma sonda, ligados a 0 cM de distância, foram descartados do mapa por não representarem informações adicionais relevantes (Apêndice A). Assim, o mapa final de ligação integrado (Figura 7) foi composto por 106 GL, sendo 28 (26,4%) grupos constituídos por dois marcadores, 27 (25,4%) grupos por três marcadores, 33 (31,2%) grupos por quatro a seis marcadores e 18 (17%) grupos por sete a 23 marcadores.

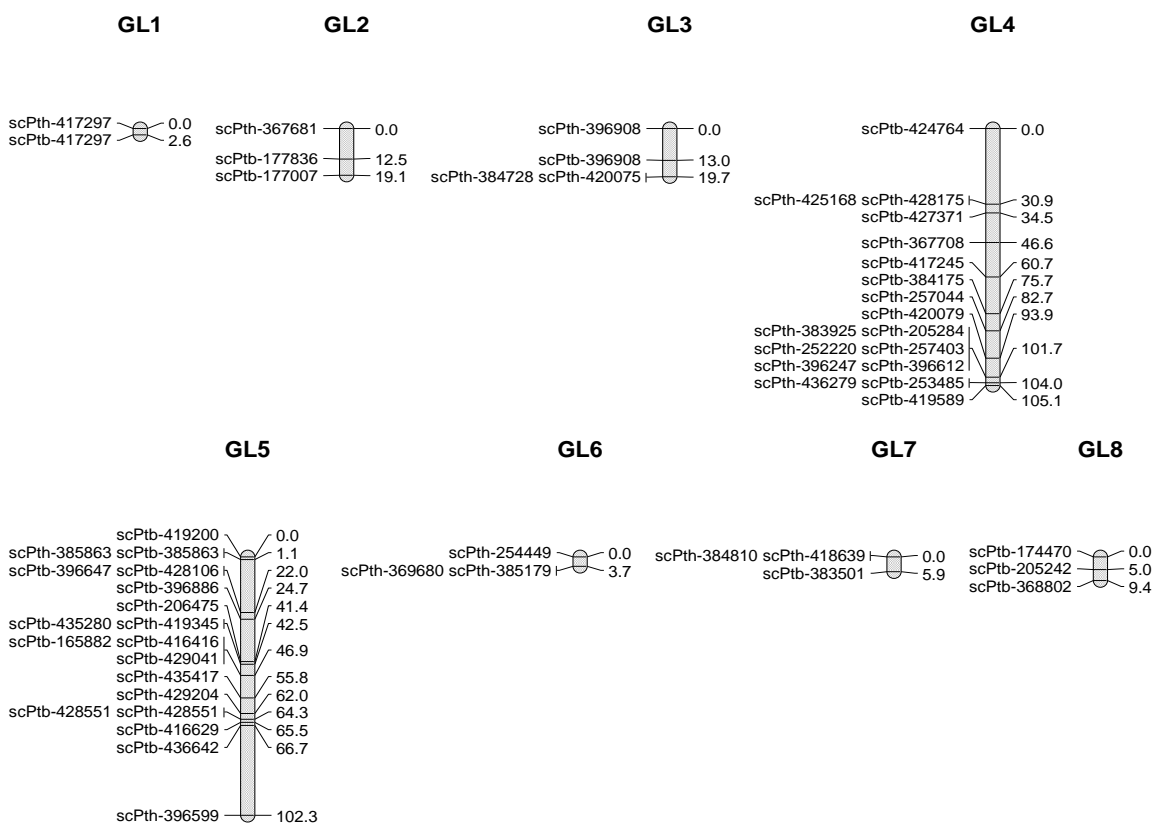


Figura 7. Mapa de ligação integrado para a população originária do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454. À esquerda estão localizados os códigos referentes aos marcadores e à direita as distâncias genéticas em cM, estimadas pela função de Kosambi (continua).

Figura 7. (continuação)

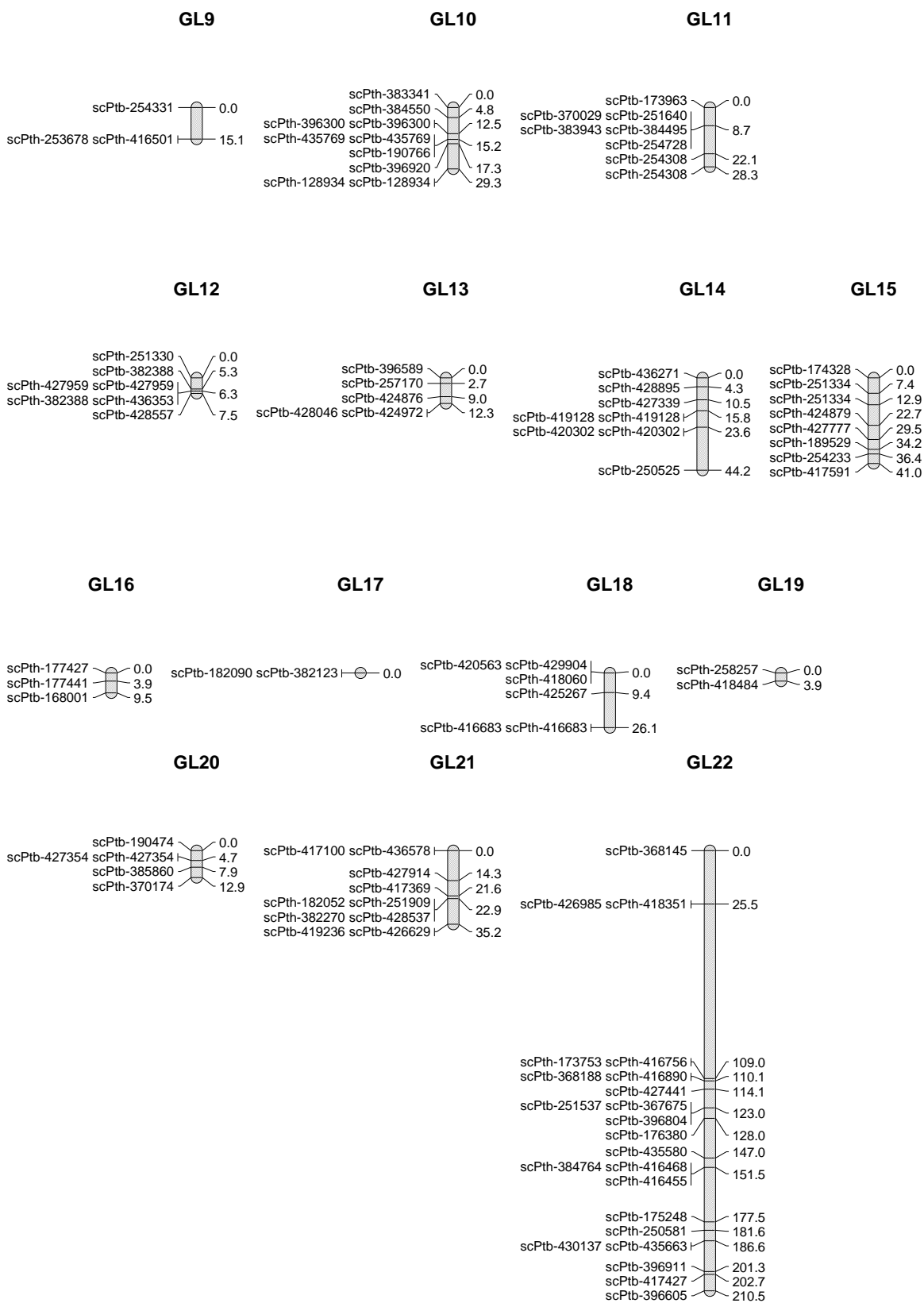


Figura 7. (continuação)

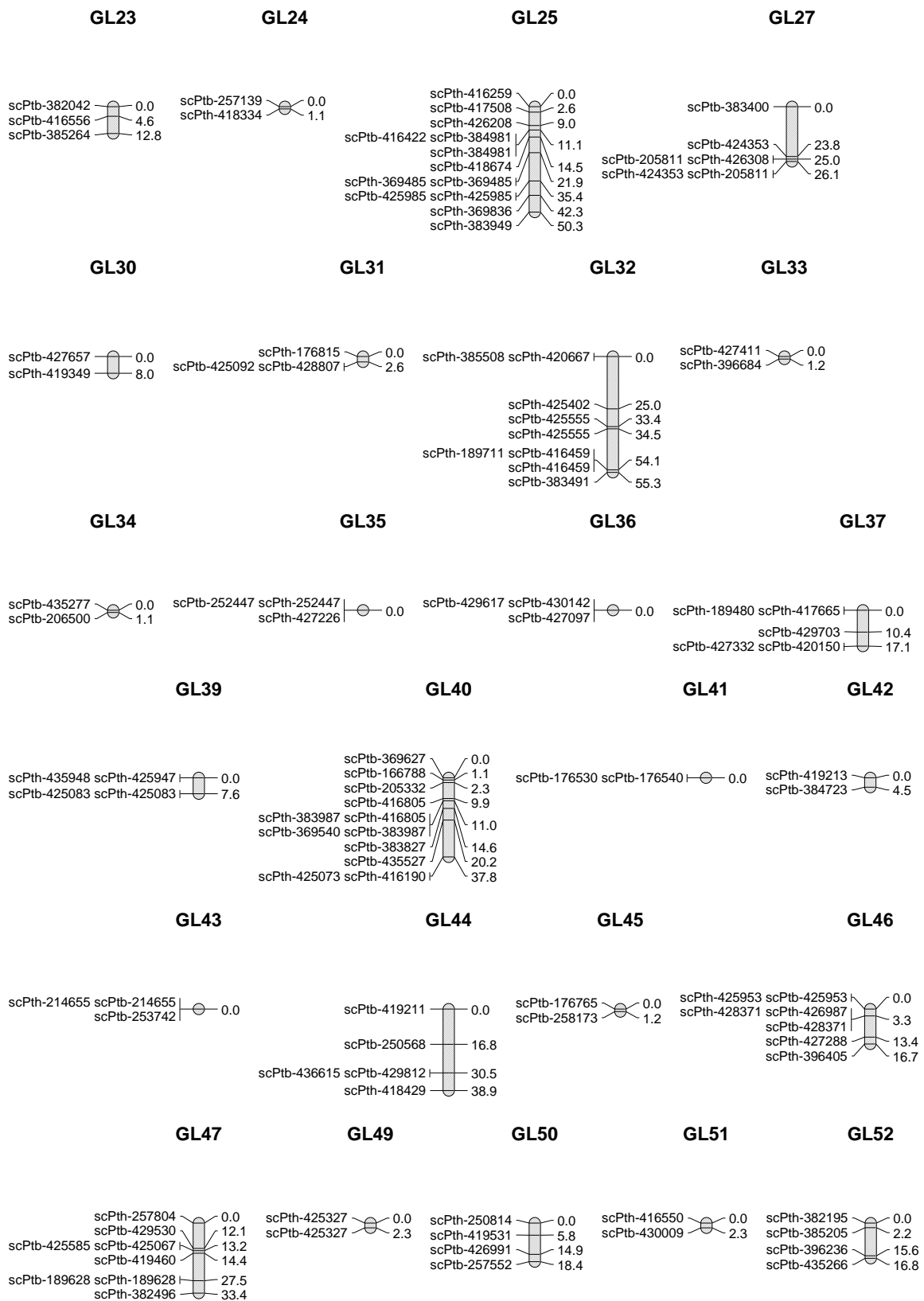


Figura 7. (continuação)

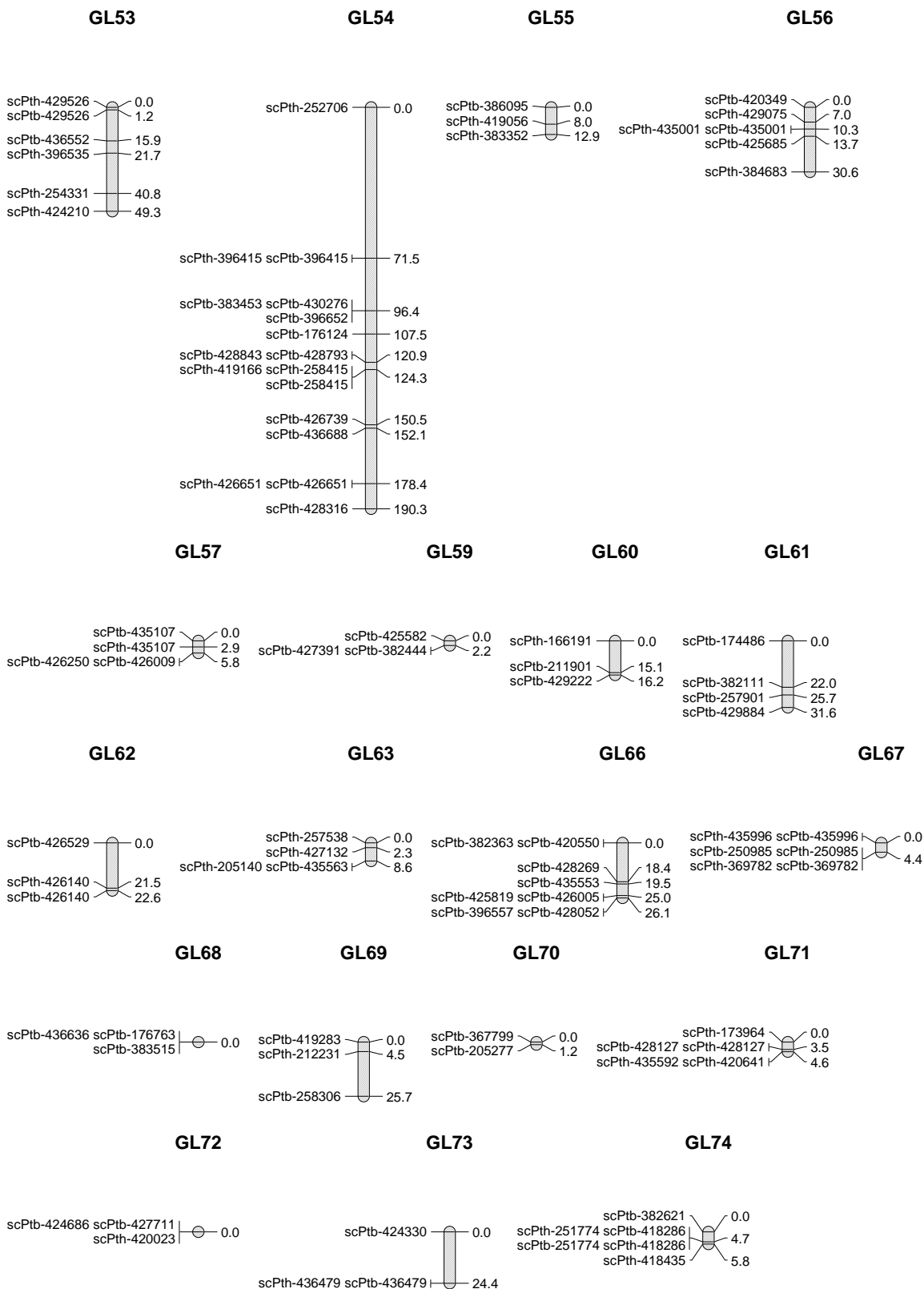


Figura 7. (continuação)

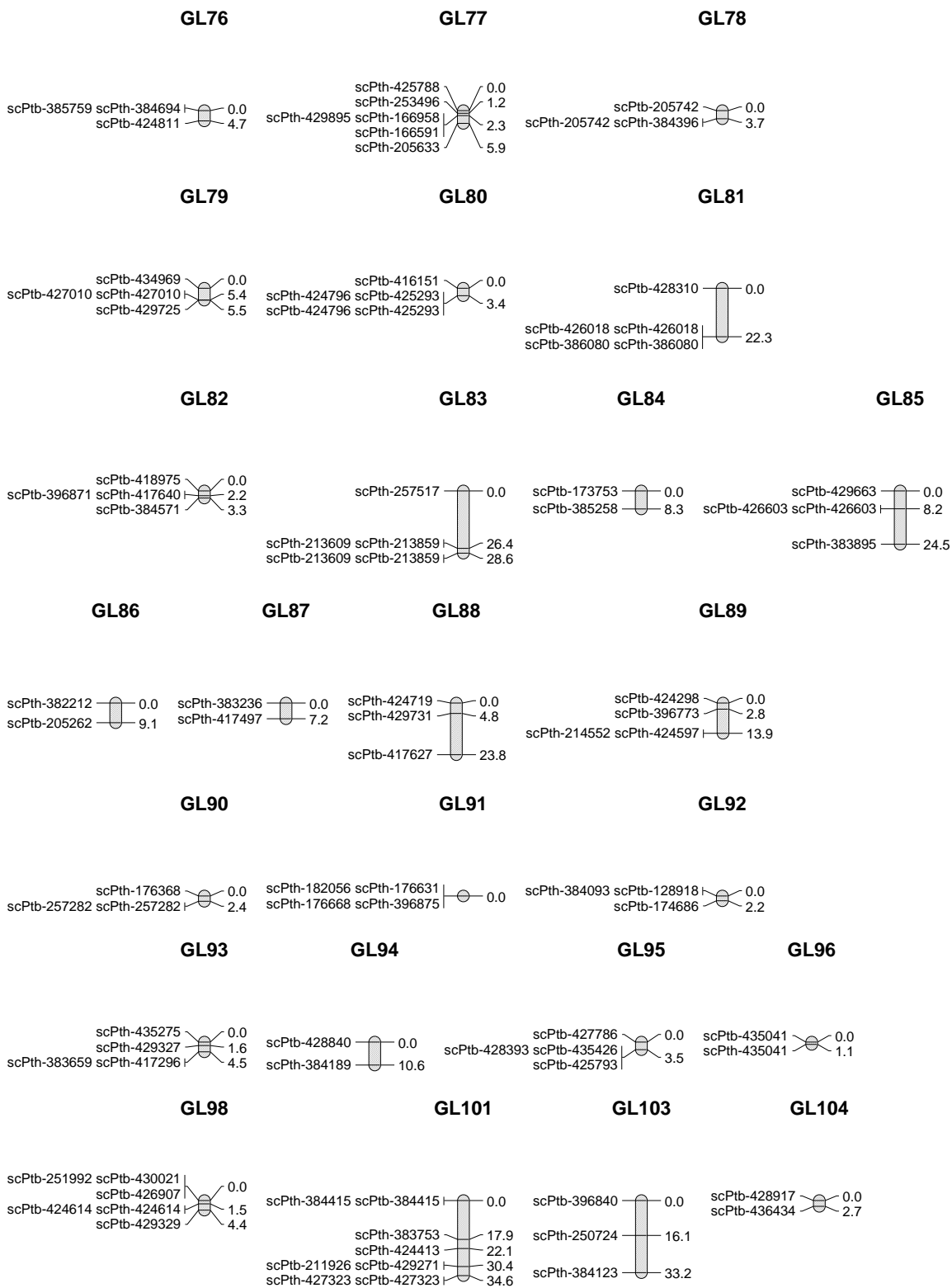
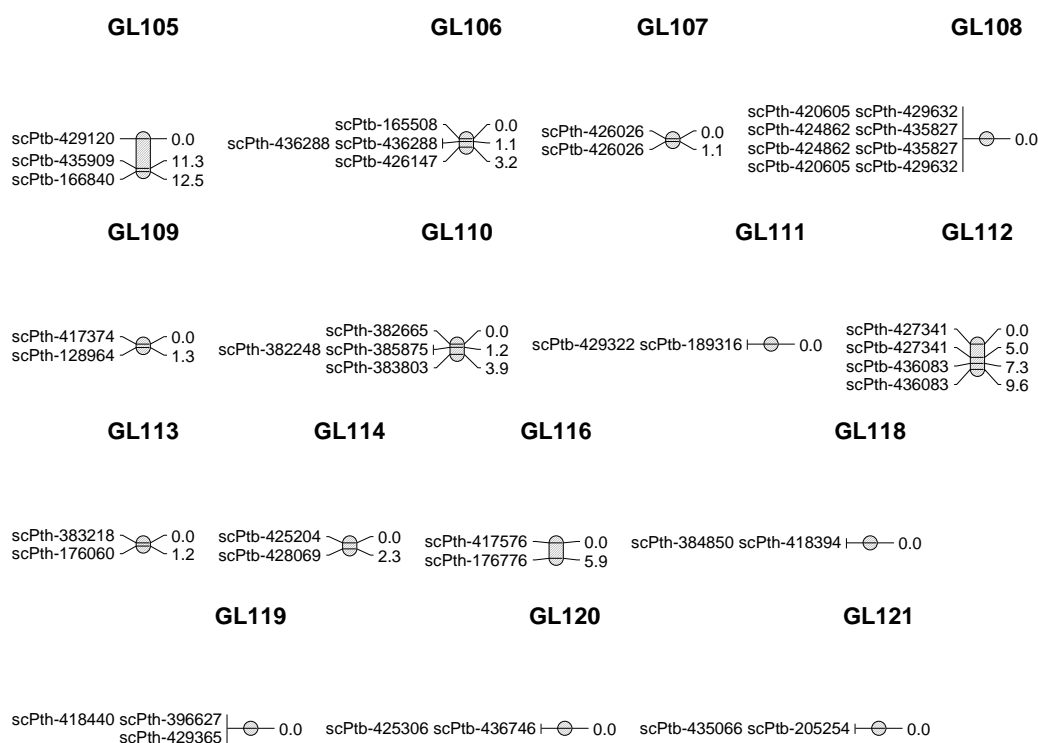


Figura 7. (continuação)

Os 106 grupos de ligação, do mapa integrado para a população proveniente do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454, totalizaram um comprimento de 1865,3 cM. O tamanho dos grupos variou de 0 cM (14 grupos) a 210,5 cM (grupo GL22), com média de 17,6 cM por grupo de ligação. O número médio de marcadores nos grupos foi de 4,36, com o máximo de 23 marcas alocadas no grupo GL22. A densidade de marcadores no mapa foi de 1 marcador/4,03 cM, sendo que o maior intervalo observado entre dois marcadores foi de 83,5cM (grupo GL22).

O número de grupos de ligação (106 GL) compreendidos neste mapa se manteve dentro do esperado para a quantidade de cromossomos existentes nas variedades de cana-de-açúcar, que apresentam de 100 a 130 cromossomos (Butterfield et al. 2001). Em geral, estudos referentes à construção de mapas de ligação para variedades comerciais obtiveram número de grupos de ligação próximos ao esperado para cana-de-açúcar, sendo encontrado uma variação de 86 GL para a variedade R570 (Raboin et al., 2006) a 136 GL para a variedade Q165 (Aitken et al., 2005).

O tamanho acumulado de mapa apresentado neste trabalho (1865,3 cM), mesmo que se aproxime de outros valores, como os encontrado por Grivet et al. (1996) de 2008 cM

é considerado baixo quando comparado com mapas mais saturados, como é o caso do mapa construído para a variedade Q165, que traz um comprimento de 9058 cM, com densidade 1 marcador/9,9 cM (Aitken et al., 2005).

4.2.3 Mapa *Framework* integrado construído com dados da população de cruzamento biparental

A construção de um mapa *framework* para cana-de-açúcar, utilizando marcadores em dose única, foi realizada a partir da análise do mesmo conjunto de marcadores DArT (632 marcas) segregantes na população de mapeamento (91 indivíduos) originária do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454, utilizado para construir o mapa integrado.

Para o agrupamento dos marcadores nos grupos de ligação utilizou-se os critérios de $LOD \geq 5,0$ e fração de recombinação máxima de 0,4. As análises de ordenação das marcas foram mais refinadas que aquelas utilizadas na obtenção dos mapas anteriores. Para grupos de ligação com até seis marcadores utilizou-se a função “*compare*” do software OneMap, com a escolha da melhor ordem quando esta fosse, no mínimo, 100 vezes mais verossímil do que a segunda melhor ordem ($\Delta LOD=2$). Em grupos de ligação formados por sete ou mais marcas, a ordenação foi executada pela função “*order.seq*” do software, que inicia-se com a criação de um “*framework*” para um subconjunto de marcadores informativos, e então através da função “*try.seq*” adiciona-se as marcas restantes ao mapa perante um critério de $\Delta LOD=2$. A ordem final dos marcadores foi avaliada pelo comando “*ripple.seq*”. Com objetivo de obter uma melhor ordenação, marcadores que apresentavam ligações espúrias, foram removidos dos respectivos grupos de ligação. Em alguns casos, esta remoção resultou na subdivisão dos grupos (GL5, GL22 e GL25), os quais foram identificados com a adição de uma letra ao número do grupo original. Trinta e um grupos de ligação foram retirados do *framework* por apresentar todos os marcadores ligados a 0 cM.

Ao final das análises de ligação, o *framework* (Figura 8) foi composto por 262 marcadores distribuídos em 94 grupos de ligação. O tamanho dos GL variou de 1,1 a 115,3 cM, com um comprimento total acumulado de 1559,7 cM. A densidade de marcadores foi de 1 marcador/5,95 cM. O número total de marcadores por GL variou de 2 a 11 (GL22b). O maior intervalo entre dois marcadores adjacentes foi de 31,3 cM (GL4), valor que está dentro

do limite estabelecido pela função de Kosambi para uma fração de recombinação máxima de 0,4.

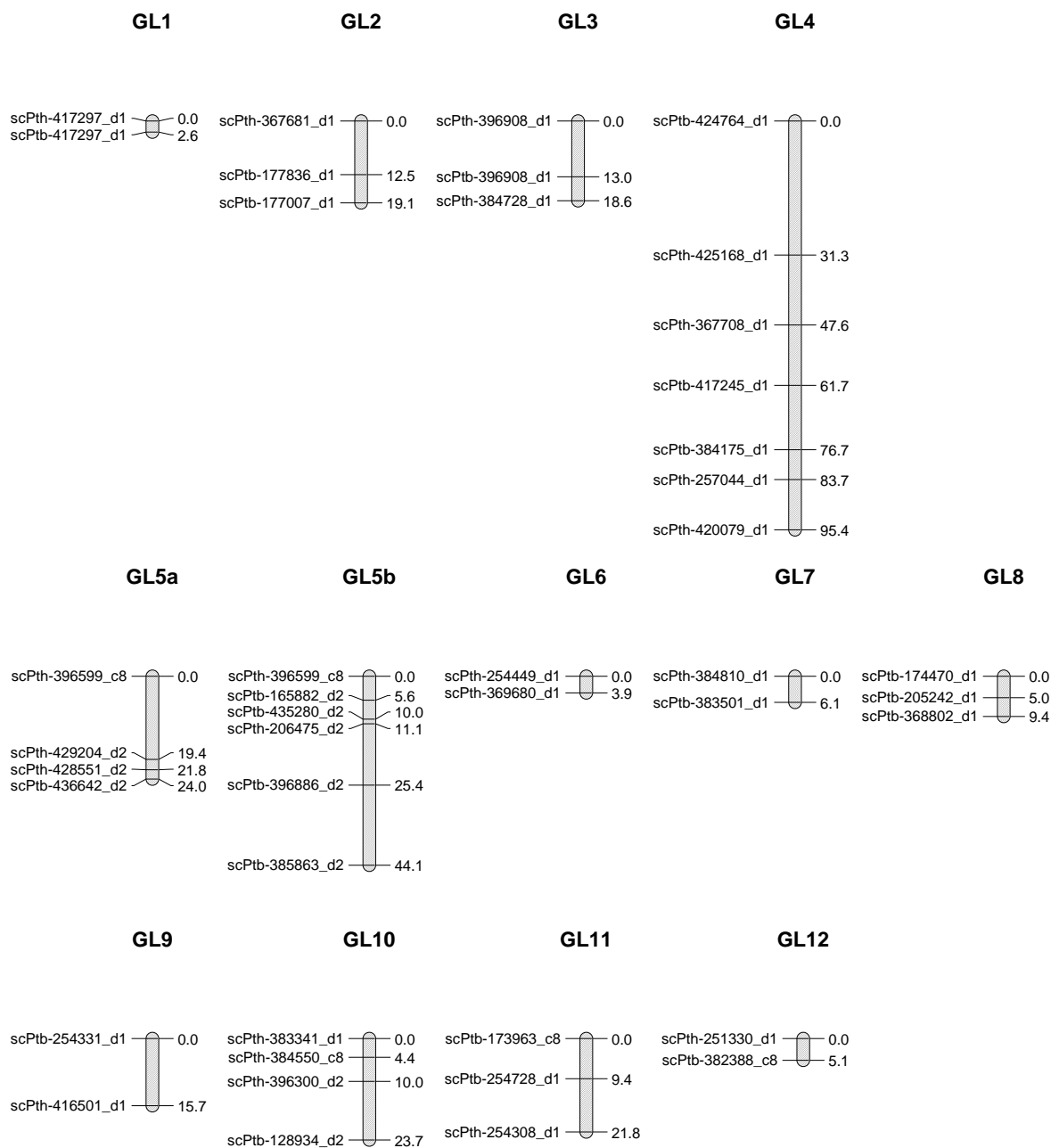


Figura 8. Mapa *framework* integrado gerado a partir de uma progênie originária do cruzamento biparental entre RB97327 x RB72454. À esquerda estão localizados os códigos referentes aos marcadores (as letras adicionais indicam que o grupo de ligação foi dividido) e à direita as distâncias genéticas em cM, estimadas pela função de Kosambi. As extensões adicionadas aos códigos dos marcadores referem-se à sua origem (continua).

Figura 8. (continuação)

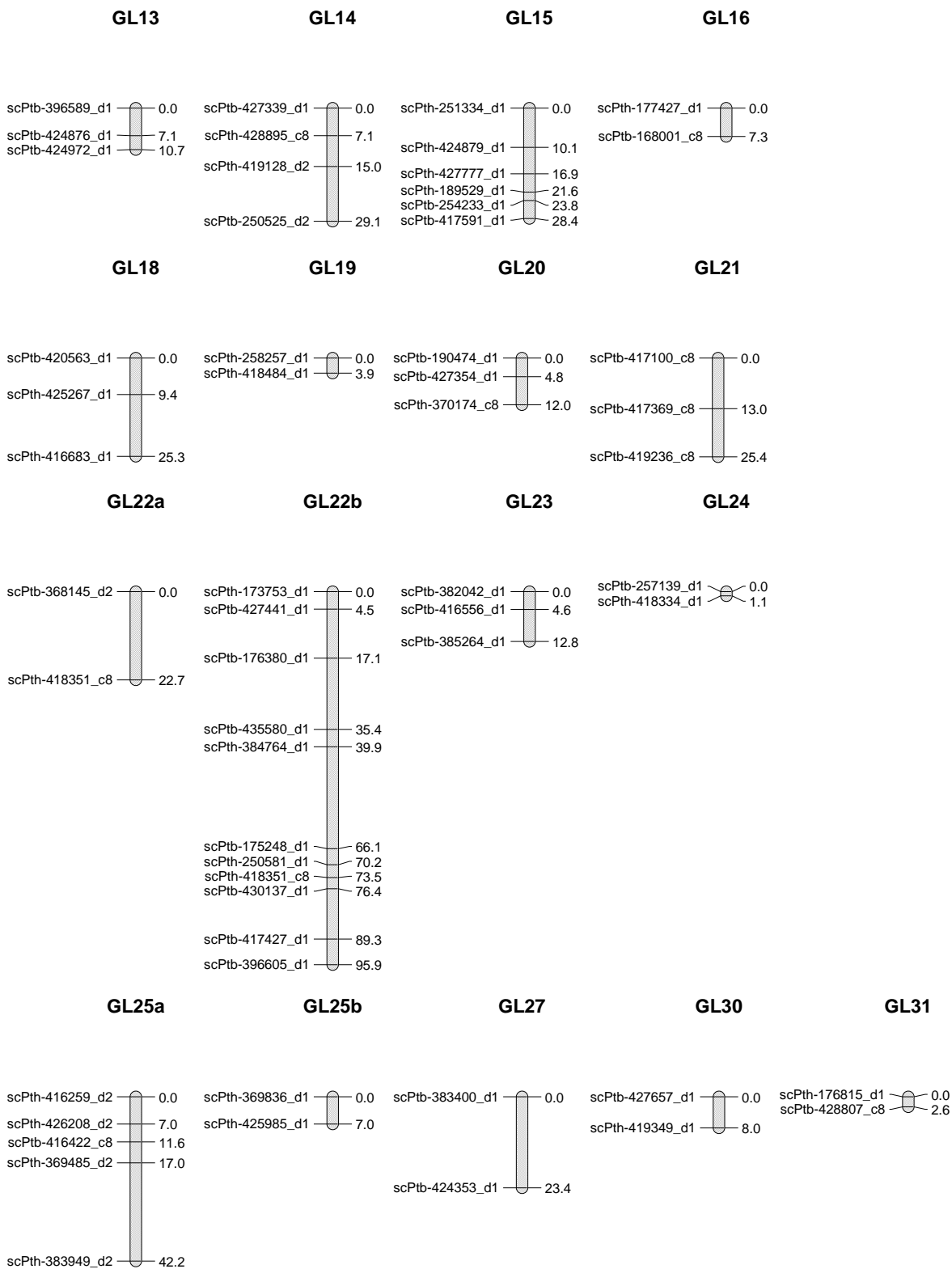


Figura 8. (continuação)

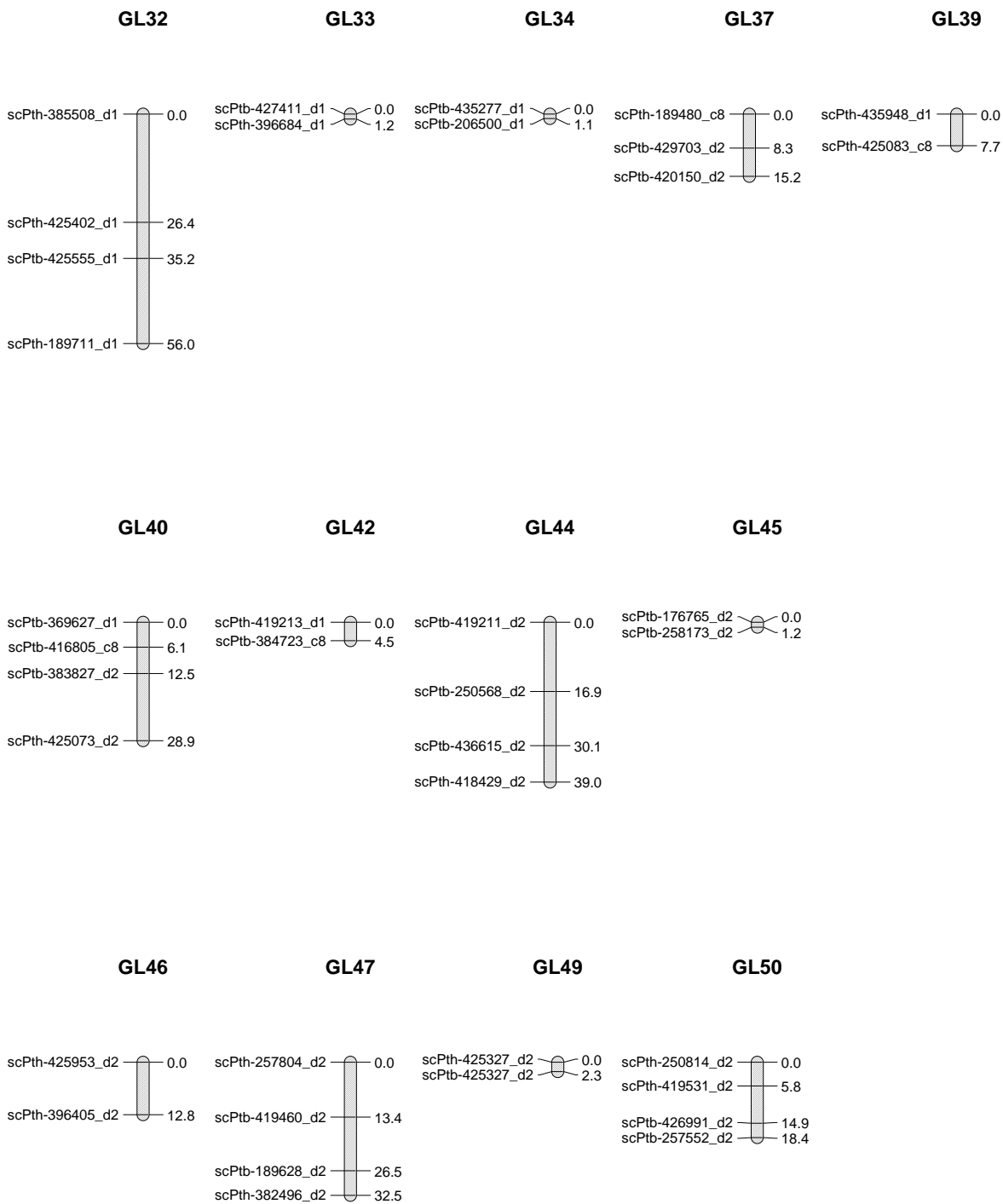


Figura 8. (continuação)

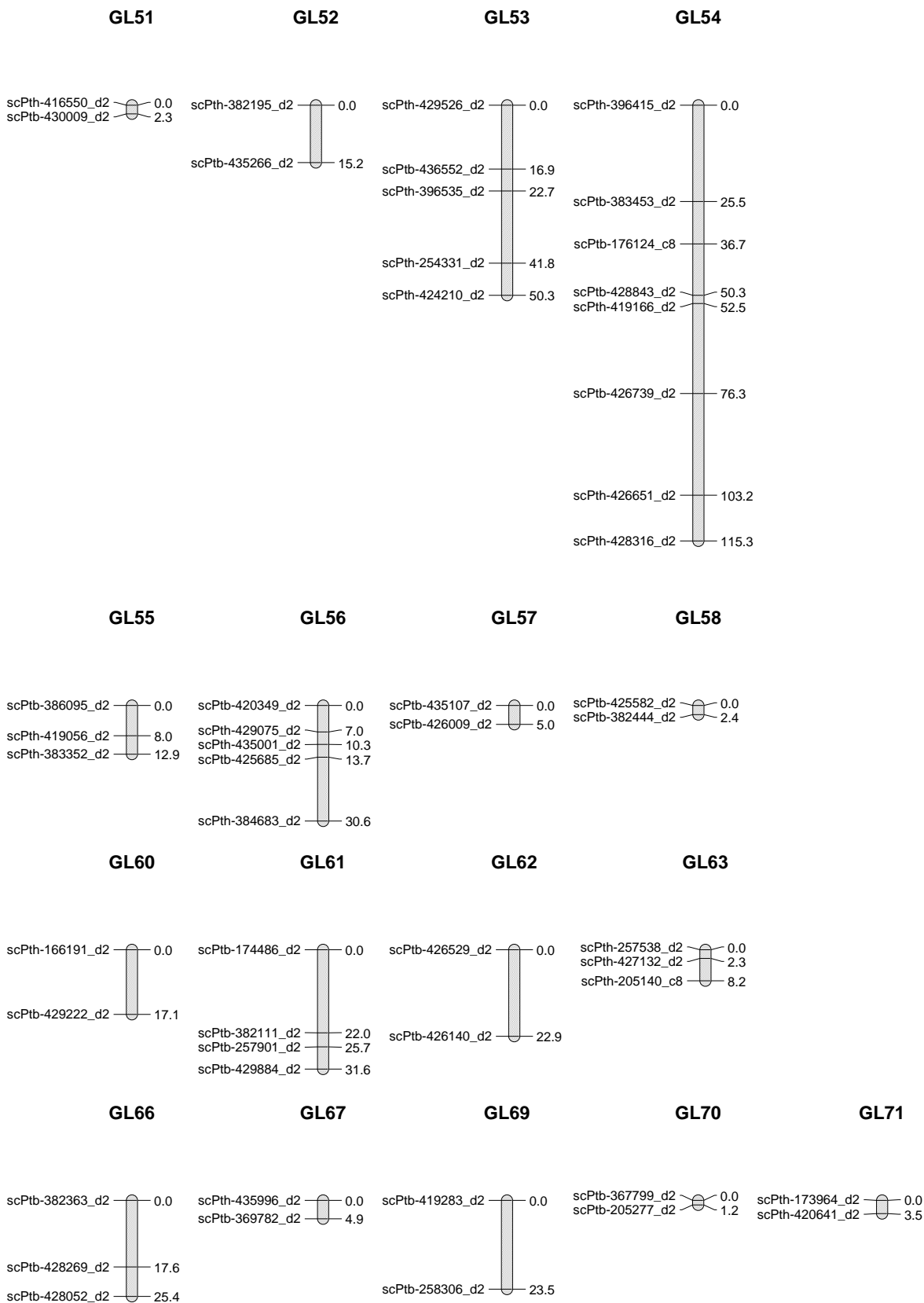


Figura 8. (continuação)

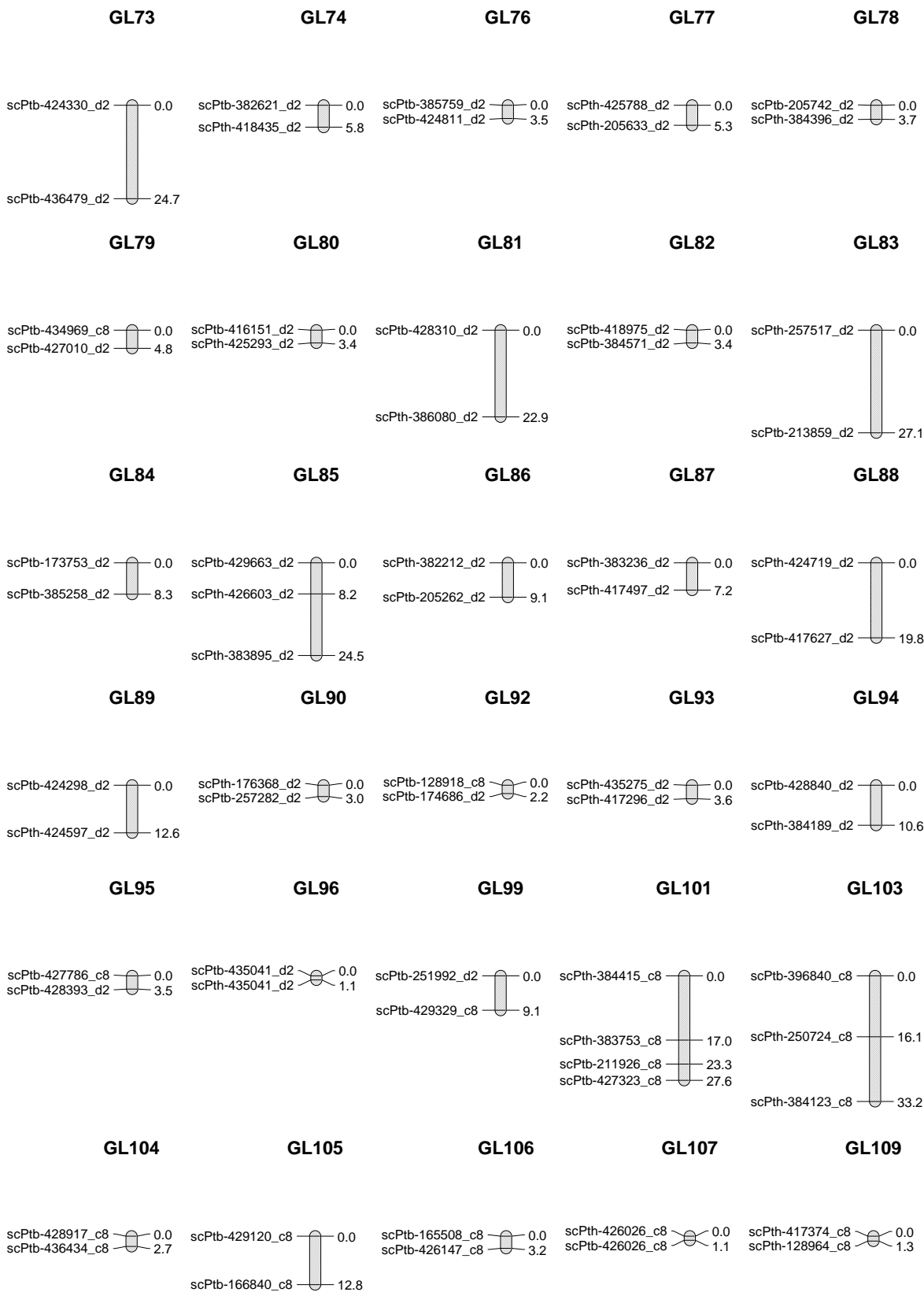
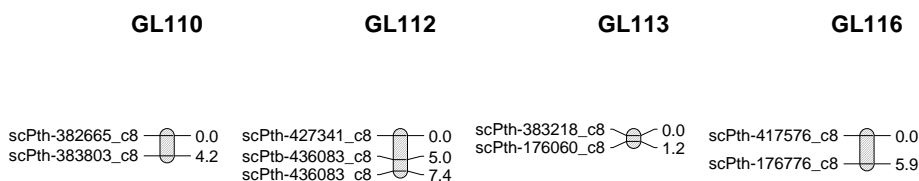


Figura 8. (continuação)

Um total de três grupos de ligação (GL10, GL14 e GL40) apresentou marcas com configurações (*ao x oo*) e (*oo x ao*) separadas por marcas com configuração (*ao x ao*). Tal integração não pôde ser observada no trabalho realizado por Garcia et al. (2006), no qual um mapa de ligação integrado foi construído a partir de uma população de mapeamento resultante do cruzamento entre duas variedades pré-comerciais (SP80-180 x SP80-4966). Ao utilizar uma população derivada deste mesmo cruzamento, Oliveira et al. (2007) detectaram essa integração em apenas um grupo de ligação. Já, Palhares (2010) verificou a presença desse evento em 10 dos 91 GL formados a partir da genotipagem de 188 indivíduos originários do cruzamento entre IAC66-6 x TUC71-7. Essas diferenças nos resultados obtidos ocorrem, provavelmente, devido aos procedimentos aplicados no decorrer das análises de mapeamento, como valores elevados de LOD, que ocasionariam a ruptura desses grupos contendo este tipo de integração.

O mapa framework obtido para a população de mapeamento originária do cruzamento biparental (RB97327 X RB72454) não pode ser considerado saturado, devido ao baixo número de marcadores mapeados; tamanho reduzido de vários grupos de ligação e ao número baixo de indivíduos genotipados. Outras classes de marcadores (AFLP, SSR, SNP/DArT-Seq, SNP/GBS) estão sendo incorporadas a este mapa por pesquisadores do programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar da UFG. Essas marcas serão posicionadas neste mapa framework com o objetivo de se obter um mapa com elevado nível de saturação, em busca de um mapa genético referência para a cana. De posse dessas informações será possível realizar estudos mais apurados sobre a organização do genoma da cana-de-açúcar, estudos de sintenia com outras espécies de gramíneas como sorgo, milho, arroz e trigo, além de possibilitar a localização no genoma de regiões que contribuem para a variação de características fenotípicas de interesse econômico.

Estudos de mapeamento genético em progênies derivadas de clones elite segregantes para caracteres de importância econômica, como resistências a doenças,

tolerância ao estresse hídrico e teor de açúcar, podem ser úteis para implantar as estratégias de seleção assistida por marcadores (em seu sentido mais amplo) nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar. A seleção assistida por marcadores moleculares pode ser aplicada para acelerar o progresso genético, devido ao aumento na eficiência de seleção e redução no intervalo de gerações. A integração das informações genéticas com os métodos tradicionais de melhoramento pode ser a solução para superar obstáculos relacionados principalmente ao alto custo dos procedimentos de seleção e ao longo tempo para a obtenção de novas variedades.

O uso de marcadores DArT como tecnologia de genotipagem está bem estabelecido para diversas espécies cultivadas. Podem ser aplicados, por exemplo, no melhoramento molecular através da Seleção Genômica Ampla, em testes de identidade genética, nas análises de diversidade, na sistemática molecular de populações naturais, e obviamente, na construção de mapas genéticos. Em cana-de-açúcar, o emprego de marcadores DArT foi descrito em um artigo de Heller-Uszynska et al. (2010), cujo objetivo principal foi avaliar o efeito de diversos métodos de redução da complexidade para o genoma da cana na utilização de marcadores DArT. Até o momento, não há registros de mapas genéticos em cana-de-açúcar construídos exclusivamente com marcadores DArT. Sendo assim, o presente trabalho é pioneiro na utilização de tais marcadores para a genotipagem de uma população derivada do cruzamento entre duas variedades comerciais brasileiras, resultando na obtenção de um mapa de ligação integrado para a cultura.

4.3 ESTIMATIVAS DO TAMANHO DO GENOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Para estimar o tamanho do genoma das variedades (RB97327 e RB72454) envolvidas neste estudo, foram construídos mapas de ligação separadamente para cada genitor. O comprimento total do mapa referente ao genitor feminino RB97327 foi de 1464,8 cM e para o genitor masculino RB72454 foi de 1976,4 cM.

Três estimativas do tamanho do genoma foram calculadas para intervalos com fração de recombinação de 0,15, 0,25 e 0,35. A distância genética (X) referente a tais valores foi estabelecida pela função de Kosambi. Para cada intervalo foi estabelecido um valor de LOD limite (T). Para o genitor RB97327 os números de pares de marcadores informativos (K) iguais ou superiores a T foram de 317 (0,15), 492 (0,25) e 1329 (0,35). E, para o genitor RB72454 estes valores de K foram de 431 (0,15), 668 (0,25) e 1822 (0,35).

O tamanho médio dos genomas estimado para os genitores RB97327 e RB72454 foram 2811 cM e 3471 cM, respectivamente. Assim, o mapa genético de ligação (1464,8 cM) para o genitor RB97327 teve uma cobertura de 52% de seu genoma. E, para o genitor RB72454 a cobertura do genoma foi de 57% (1976,4/3471). Como esperado com base nos resultados obtidos anteriormente, estes valores evidenciam que os mapas construídos neste estudo para as variedades em questão não estão saturados. Fato que também pode ser observado em outros trabalhos que estimaram o tamanho do genoma em cana-de-açúcar. Para a espécie *S. spontaneum* as estimativas para o tamanho do genoma variaram de 2107 a 3300 cM, com uma cobertura máxima de 64,6% (Al-Janabi et al., 1993; Da Silva et al., 1993; Da Silva et al., 1995; Alwala et al., 2008). Para *S. officinarum*, Alwala et al. (2008) estimaram o tamanho do genoma em 2448 cM e construíram um mapa com uma cobertura de 69%. Tais resultados ilustram bem a dificuldade de se obter mapas saturados para cana-de-açúcar.

A baixa cobertura dos mapas obtidos no presente trabalho e na literatura pode estar relacionada ao número ainda reduzido de marcadores utilizados nas análises de mapeamento. Heller-Uszynska et al. (2010) afirmam que para se alcançar uma cobertura adequada de um genoma tão grande como é o das variedades modernas de cana-de-açúcar (aproximadamente, 17000 cM) seria necessário um conjunto de 5000 a 7000 marcadores. Diante disso, plataformas de genotipagem que associam baixos custos e alto rendimento para gerarem milhares de marcadores moleculares espalhados por todo o genoma, devem ser aplicadas aos estudos de mapeamento e melhoramento da cana-de-açúcar. Neste sentido, a tecnologia de geração dos marcadores DArT tem grande potencial de utilização, por agregar essas características em procedimentos rápidos e com alta acurácia. Dado o grande número de locos monomórficos encontrados, se faz necessário rever os métodos de redução da complexidade do genoma, etapa fundamental na geração de polimorfismo.

Em relação à estudos futuros, antevê-se a utilização de estratégias mais modernas de genotipagem de alto desempenho, como a genotipagem baseada em sequenciamento (Restriction site-associated DNA sequencing – RAD-Seq, Genotyping-by-sequencing- GBS e DArT-Seq). O uso destas estratégias deverá possibilitar a genotipagem de dezenas de milhares de locos, necessários para o alcance definitivo do objetivo de se estabelecer um mapa genético saturado para a cana-de-açúcar.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos foi possível constatar a eficiência dos marcadores DArT na genotipagem de progênies de cana-de-açúcar, gerando centenas de marcas polimórficas em apenas um ensaio, com dois métodos de redução da complexidade. Estes marcadores se apresentam com uma opção promissora para estudos genéticos em cana, haja vista, o baixo custo (R\$/marcador) envolvido na obtenção dos genótipos.

Conclui-se ainda, que é imprescindível a realização de testes prévios para se verificar a ocorrência de autofecundação entre os genótipos das progênies utilizadas para mapeamento genético de cana-de-açúcar. A ocorrência destes fenômenos deve ser melhor investigada em populações utilizadas no melhoramento genético da cultura.

Os mapas de ligação construídos para os genitores (RB97327 e RB72454) apresentaram baixa cobertura perante o tamanho estimado do genoma destas variedades. A adição de mais marcadores, no framework obtido, é necessária para que níveis de saturação adequados sejam alcançados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n.1, p. 789-801, fev. 2005.
- AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. Construction of genetic linkage map for *Saccharum officinarum* incorporating both simplex and duplex markers to increase genome coverage. Ottawa, **Genome**, v. 50, p. 742–756, ago. 2007.
- AITKEN, K. S.; McNEIL, M. Diversity Analysis In: HENRY, R.; KOLE, C. (Ed.). **Genetics, Genomics and Breeding**. New York: Science Publishers, 2010. p. 19-42.
- AKBARI, M.; WENZL, P.; CAIG, V.; CARLING, J.; XIA, L.; YANG, S.; USZYNSKI, G.; MOHLER, V.; LEHMENSIEK, A.; KUCHEL, H.; HAYDEN, M. J.; HOWES, NEIL.; SHARP, P.; VAUGHAN, P.; RATHMELL, B.; HUTTNER, E.; KILIAN, A Diversity arrays technology (DART) for high- throughput profiling of the hexaploid wheat genome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, p. 1409-1420, out. 2006.
- ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar: uso de marcadores moleculares no mapeamento genético visando o melhoramento da cana-de-açúcar. **Biociências & Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 82-91, jun. 2006.
- AL-JANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. Na Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide and Polyphenol-Free Sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 17, p. 1-8, 1999.
- AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R. J.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. ‘SES208’. **Genetics**, Bethesda, v. 134, p. 1249-1260, ago. 1993.
- ALWALA, S.; KIMBENG, C. A. Molecular Genetic Linkage Mapping in *Saccharum*: Strategies, Resources and Achievements. In: HENRY, R.; KOLE, C. (Ed.). **Genetics, Genomics and Breeding**. New York: Science Publishers, 2010. p. 69-96.
- ALWALA, S.; KIMBENG, C.A.; VEREMIS, J. C.; GRAVOIS, K. A. Linkage mapping and genome analysis in *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 164, p. 37-51, jan. 2008.
- ANDRU, S.; PAN, Y. B.; THONGTHAWEE, S.; BURNER, D. M.; KIMBENG, C. A. Genetic analysis of the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar ‘LCP 85-384’. I. Linkage

mapping using AFLP, SSR, and TRAP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 123, p. 77-93, abr. 2011.

BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO (BNDES); CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, 2008. 316 p.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Org.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**: 2ª Jornada em Genética e Melhoramento de Plantas realizada na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia: Funape, 2000. p. 63-224.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, dez. 1997.

BORÉM, A.; MILACH, S. C. K. Melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, Brasília, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/melhora.pdf>>. Acessado em: 23 jun. 2010.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 529 p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRANDÃO, A. **Cana-de-açúcar**: álcool e açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil. Brasília: Horizonte, 1985. 269 p.

BRANDES, E. W. Origin, classification and characteristics. In: ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. (Ed.). **Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)**. Washington: USDA Agriculture Handbook, 1958. v. 122, p. 1-35.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico da agroenergia 2010**. Brasília, DF, 2011. 223 p.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, Sweden, v. 234, p. 177-186, maio 1999.

BUNDOCK, P. C.; ELIOTT, F. G.; ABLETT G.; BENSON, A. D.; CASU, R. E.; AITKEN K. S.; HENRY, R. J. Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploid plant species using 454 sequencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7p. 347-354, dez. 2009.

BUTTERFIELD, M. K.; D'HONT, A.; BERDING, N. The sugarcane genome: a synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. **Proc S Afr Sug Technol Assn**, Edgcombe, v. 75, p. 1-5, 2001.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETATA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Viçosa, 2006. p. 11-81.

COELHO, A. S. G. Considerações gerais sobre análise de QTL's. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Org.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas: 2ª Jornada em Genética e Melhoramento de Plantas** realizada na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia: Funape, 2000. p. 1-20.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento**. Brasília: Conab, 2013. 21 p.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Guia da cana-de-açúcar: Avanço científico beneficia o País**. São Paulo: CIB, 2009. 20 p.

CESNIK, R. MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa, 2004. 307 p.

CRESTE, S.; ROSA-JÚNIOR, V. E.; PINTO, L. R.; ALBINO, J. C.; FIGUEIRA, A. V. O. A biotecnologia como ferramenta para o melhoramento genético. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 157-176.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodeling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 847-854, fev. 2004.

DA SILVA, J. A. G.; HONEYCUTT, R. J.; BURNQUIST, W.; AI-JANABI, S. M.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D.; SOBRAL, B. W. S. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP and PCR-based markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, p. 165-179, nov.1995.

DA SILVA, J. A. G.; SORRELLS, M. E.; BURNQUIST, W. L.; TANKSLEY, S. D. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. **Genome**, Ottawa, v. 36, p. 782-791, mar. 1993.

D'HONT, A. Unravelling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 27-33, 2005.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLAZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 221-225, jan. 1998.

D'HONT, A.; SOUZA, G. M.; MENOSSI, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M. A.; GLAZMANN, J. C.; ULIAN, E. Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol, and Bio-energy. In: MOORE, P. H.; MING, R. (Ed). **Genomics of Tropical Crop Plants**. New York: Springer Science, 2008. p. 483-514.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares:** aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa, 2007. 102 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 221 p.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 31-44.

GARCIA, A. A. F.; KIDO, E. A.; MEZA AN, SOUZA HMB, PINTO LR, PASTINA MM, LEITE CS, DA SILVA JAG, ULIAN EC, FIGUEIRA A, SOUZA AP. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, p. 298-314, 2006.

GOES, T.; ARAÚJO, M.; MARRA, R. Novas fronteiras tecnológicas da cana-de-açúcar no Brasil. **Revista de política agrícola**, Brasília, Ano XVIII, n. 1, p. 50-59, jan./fev./mar. 2009.

GOMES, F. P.; LIMA, U. de A. A cana-de-açúcar no mundo. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE POTASSA. **Cultura e adubação da cana-de-açúcar.** São Paulo: Peri Ltda, 1964. p. 11-26.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, v.137, n. 4, p. 1121-1137, ago. 1994.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 122-127, abr. 2001.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research Applications**, Fort Worth, v. 2, p. 9-17, 2004.

GRIVET, L.; D'HONT, A.; ROQUES, D.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J. C. RFLP mapping in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics**, Bethesda, v. 142, p. 987-1000, mar. 1996.

GRIVET, L.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. Molecular evidences for sugarcane evolution and domestication. In: MOTLEY, T.; ZEREGA, N.; CROSS, H. (Ed). **Darwin's Harvest:** New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops. New York: Columbia University Press, 2006. p. 49-66.

GUIMARÃES, C. T.; HONEYCUTT, R. J.; SILLS, G. R.; SOBRAL, B. W. S. Genetic linkage maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. **ExGrassl. Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 125-132, mar.1999.

GUPTA, P. K.; ROY, J. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, v. 80, n. 4, p. 524-535, fev. 2001.

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *Journal of Genetics*, Oxford, v. 8, p. 299-309, 1919.

HELLER-USZYNSKA, K.; USZYNSKI, G.; HUTTNER, E.; EVERS, M.; CARLIG, J.; CAIG, V.; AITKEN, K.; JACKSON, P.; PIPERIDIS, G.; COX, M.; GILMOUR, R.; D'HONT, A.; BUTTERFIELD, M.; GLASZMANN, J. C.; KILIAN, A. Diversity Arrays Technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. *Molecular Breeding*, Canberra, v. 28, n.1, p. 37-55, jun. 2011.

HOARAU, J. Y.; OFFMAN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A. M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J. C.; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 103, n. 1, p. 84-97, 2001.

HULBERT, S. H.; ILOT, T. W.; EGG, E. J. L.; LINCOLNE, S. E.; LANDER, S.; MICHELMORE, R. W. Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae* using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, Bethesda, v. 120, p. 947-958, dez. 1988.

HUTTNER, E.; WENZL, P.; AKBARI, M.; CAIG, V.; CARLING, J.; CAYLA, C.; EVERS, M.; JACCOUD, D.; PENG, K.; PATARAPUWADOL, S.; USZYNSKI, G.; XIA, L.; YANG, S.; KILIAN, A. Diversity Arrays Technology: A novel tool for harnessing the genetic potential of orphan crops. In: SERAGELDIN, I.; PERSLEY, G. J. (Ed). **Discovery to Delivery: BioVision Alexandria**, Proceedings of the 2004 Conference of The World Biological Forum. Alexandria: CABI Publishing, 2005. cap. 10.

IRVINE, J. E. *Saccharum* species as horticultural classes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 98, p. 186-194, 1999.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 29, n. 4, e25, Jan. 2001.

JACOB, H. J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S. E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R. K.; MAO, Y. P.; GANTEN, D.; DZAU, V. J.; LANDER, E. S. Genetic Mapping of a Gene Causing Hypertension in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. *Cell*, Cambridge, v. 67, p. 213-224, out. 1991.

JANK, M. S. Uma matriz de combustíveis para o Brasil. In: SOUZA, E. L. L.; MACEDO, I. C. (Org.). **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010. p. 10-13.

JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist*, Cambridge, v. 137, p. 165-177, jul. 1997.

KILIAN, A.; HUTTNER, E.; WENZL, P.; JACCOUD, D.; CARLING, J.; CAIG, V.; EVERS, M.; HELLER-USZYNSKA, K.; USZYNSKI, G.; CAYLA, C.; PATARAPUWADOL, S.; XIA, L.; YANG, S.; THOMSON, B. The fast and the cheap: SNP and DARt-based whole genome profiling for crop improvement. In: TUBEROSA, R.; PHILLIPS, R. L.; GALE, M. (Ed.). **Proceedings of the International Congress "In the Wake of the Double Helix: from the Green Revolution to the Gene Revolution"** 2003. Bologna: Avenue media, 2005. p. 443-461.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, Washington, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 101-156.

LIU, B. H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis**. Boca Baton: CRC Press, 1998. 611 p.

MACE, E. S.; XIA, L.; JORDAN, D. R.; HALLORAN, K.; PARH, D. K.; HUTTNER, E.; WENZL, P.; KILIAN, A. DARt markers: diversity analyses and mapping in *Sorghum bicolor*. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 26, Jan. 2008.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v. 144, p. 78-79, abr. 2007.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 225-274.

MING, R.; LIU, S. C.; LIN, Y. R.; BRAGA, D.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T. F.; WU, K. K.; MOORE, P. H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; IRVINE, J. E.; PATERSON, H. Detailed Alignment of *Sorghum* and *Saccharum* chromosomes: comparative organization of closely-related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, Bethesda, v. 150, p.1663-1882, dez. 1998.

MING, R.; LIU, S. C.; BOWERS, J. E.; MOORE, P. H.; IRVINE, J. E.; PATERSON, A. H. Construction of *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 570-583, 2002.

MING, R.; MOORE, P. H.; WU, K. K.; D'HONT, A.; GLASSMAN, J. C.; TEW, T. L.; MIRKOV, T. E.; DA SILVA, J.; JIFON, J.; RAI, M.; SCHNELL, R. J.; BRUMBLEY, S. M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J. C.; PATERSON, A. H. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. In: JANICK, J. (Ed.) **Plant Breeding Reviews 27**: New York: Wiley & Sons, 2006. p. 15-118.

NGUYEN, H. T.; WU, X. Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. In: Meksem, K.; Kahl, G. (Ed.) **The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping**. Weinheim: WILEY-VCH & Co. KGaA, 2005. p. 23-52.

OLIVEIRA, K. M.; PINTO, L. R.; MARCONI, T. G.; MARGARIDO, G. R. A.; PASTINA, M. M.; TEIXEIRA, L. H. M.; FIGUEIRA, A. V.; ULIAN, E. C.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P. Functional integrated genetic linkage map based on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 20, n.3, p. 189-208, out. 2007.

PALHARES, A. C. **Mapeamento genético de marcadores AFLP e de retrotransposons em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 1, p. 65-73, jul. 2010.

RABOIN, L. M.; OLIVEIRA, K. M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J. Y.; D'HONT, A. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using biparental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, p. 1382-1391, 2006.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO (RIDESA). **Liberação nacional de novas variedades "RB" de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010. 64 p.

ROSSI, M.; ARAUJO, G. P.; PAULET, F.; GARSMEUR, O.; DIAS, V. M.; CHEN, H.; VAN SLUYS, M. A.; D'HONT, A. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 269, p. 406-419, maio, 2003.

SCARPARI, M. S.; BEUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 47-56.

SCHULMAN, A. H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, Wageningen, v. 158, n. 3, p. 313-321, 2007.

SPEED, T. P.; ZHAO, H. Chromosome Maps. In: IN: BALDING, D. J.; BISHOP, M.; CANNINGS, C (Ed.). **Handbook of Statistical Genetics**. 3. ed. West Sussex: Wiley and Sons, 2007. p. 3-32.

VOORRIPS, R. E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Washington, v. 93, p.77-78, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, H.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 4407-4414, out. 1995.

WENZL, P.; CARLING, J.; KUDRNA, D.; JACCOUD, D.; HUTTNER, E.; KLEINHOF, A.; KILIAN, A. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 26, p. 9915-9920, Jun. 2004.

WITTENBERG, A. H. J. **Genetic mapping using the Diversity Arrays Technology (DArT):** Application and validation using the whole-genome sequences of *Arabidopsis thaliana* and the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. 2007. 224 f. Tese de PhD pela Universidade de Wageningen, Wageningen, 2007.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, out. 1990.

WU, K. K.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; TEW, T. L.; MOORE, P. H.; TANKSLEY, S. D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 294-300, 1992.

WU, R.; MA, C. X.; PAINTER, I.; ZENG, Z. B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in out-crossing species. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 61, p. 349-363, 2002.

XIE, Y.; MCNALLY, K.; LI, C. Y.; LEUNG, H.; ZHU, Y. Y. A High-throughput Genomic Tool: Diversity Array Technology Complementary for Rice Genotyping. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 9, p. 1069-1076, Set. 2006.

XU, Y. **Molecular Plant Breeding**. CABI, Cambridge: MPG Books Group, 2010. 755 p.

APÊNDICE A

Relação de pares de marcadores ligados a 0 cM, correspondentes à utilização da mesma sonda e obtidos por diferentes métodos de redução de complexidade.

pares de marcadores ligados	
população de autofecundação	população de cruzamento biparental
scPtb-426026 / scPth-426026	scPtb-166136 / scPth-166136
scPtb-166568 / scPth-166568	scPtb-252991 / scPth-252991
scPtb-416683 / scPth-416683	scPtb-175152 / scPth-175152
scPtb-166136 / scPth-166136	scPth-166568 / scPtb-166568
scPtb-252991 / scPth-252991	scPth-428309 / scPtb-428309
	scPth-425112 / scPtb-425112
	scPtb-426174 / scPth-426174
	scPtb-429650 / scPth-429650
	scPth-428811 / scPtb-428811
	scPtb-205470 / scPth-205470
	scPtb-436050 / scPth-436050
	scPth-418615 / scPtb-418615
	scPth-428328 / scPtb-428328
	scPtb-435594 / scPth-435594
	scPth-385676 / scPtb-385676
	scPth-436052 / scPtb-436052