

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS À SEVERIDADE DE SINTOMAS DA
FERRUGEM MARROM EM PAINEL ASSOCIATIVO DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)**

Bruna Sousa Gonçalves

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS À SEVERIDADE DE SINTOMAS DA
FERRUGEM MARROM EM PAINEL ASSOCIATIVO DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)**

Bruna Sousa Gonçalves

Orientadora: Dr.ª Luciana Rossini Pinto

Co-orientador : Prof. Dr. Dilermando Perecin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

G635i Gonçalves, Bruna Sousa
Identificação de marcadores moleculares relacionados à
severidade de sintomas da ferrugem marrom em painel associativo de
cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)/ Bruna Sousa Gonçalves – –
Jaboticabal, 2012
x, 68 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Banca examinadora: Antonio de Goes, Antonio Augusto Franco
Garcia

Bibliografia

1. AFLP, 2. fungo, 3. Mapeamento associativo, 4. Poliploidia, 5.
SSR. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 633.61:632.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA SOUSA GONÇALVES – nascida em 10 de março de 1988 em Uberaba (MG), Brasil. Ingressou em 2006, no curso de Ciências Biológicas na Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Durante a graduação estagiou no Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana - IAC/Apta, onde desenvolveu projeto de iniciação científica e trabalho de conclusão de curso sob a orientação da Dr.^a Luciana Rossini Pinto. Em janeiro de 2010 recebeu o grau de Bacharel em Ciências Biológicas e em março, deste mesmo ano, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, sendo bolsista CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) durante o curso

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal e ao Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas pela oportunidade de realização do meu mestrado.

Às Instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro na realização deste trabalho (Processo 2008/56146-5) e a Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FundAg) pelo apoio financeiro ao projeto e para participação em eventos científicos.

À Dr^a. Luciana Rossini Pinto, pela dedicação com que me orientou, pela oportunidade e confiança a mim depositada e, em especial, pelas palavras amigas e apoio durante esses anos compartilhados.

Ao Prof. Dr.: Dilermando Perecin, pela co-orientação e pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica, agradeço por todas as vezes que esclareceu minhas dúvidas estatísticas e, principalmente, pelo exemplo de professor e dedicação à ciência.

Ao Dr. Pery Figueiredo, que gentilmente me acompanhou em todas as avaliações fenotípicas, pelos ensinamentos e pela paciência.

À Dr^a. Luciana Ap. Carlini-Garcia, pela valiosa colaboração na revisão deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Claudio da Conceição Lopes, pela ajuda imprescindível no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade tão preciosa.

À Dr^a. Marcela Corbo Guidugli pela dedicação com que me atendeu nos momentos de dúvida.

À doutoranda Melina Cristina Mancini por disponibilizar uma série de seus dados moleculares.

A todos os pesquisadores do Centro de Cana, especialmente ao Dr. Márcio Bidóia, por cuidar da logística de instalação do experimento em campo, ao Dr. Maximiliano Salles

Scarpari e ao Dr. Júlio César Garcia, pela disponibilização de dados e pela dedicação nos momentos de dúvida.

Aos membros da banca de qualificação, Dr^a. Andréia da Silva Meyer e Dr. Gustavo Vitti Moro, e de defesa da dissertação, Dr. Antonio de Goes e Dr. Antonio Augusto Franco Garcia, por todas as contribuições para a versão final desta dissertação.

Aos funcionários do viveiro da Fazenda Experimental do Centro de Cana do IAC, especialmente a Dona Célia, Sr. Humberto e Sr. José Roberto, pela colaboração no plantio e tratamentos às mudas, pelo carinho e atenção que sempre me trataram.

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana, que também são responsáveis por este trabalho, Thaís, Fernanda Raquel, Maria Letícia, Maria Natália, Cibele, Flávia, Ana Carolina, Débora, Camila, Luiz, Mariana, Maicon, Rafael, Carol Neuber, João Ricardo, Paula, Michael, Izadora, pela amizade, ensinamentos, compreensão, assistência e pelos bons momentos de descontração.

Às minhas queridas amigas Maria Letícia, Maria Natália, Ariany, Cláu, Kátia, Luana, Letícia, Hemelin Ludimila, Ana Rita, Fernanda, Paula pela amizade e participação na minha vida profissional e pessoal.

Aos meus pais, Placidino e Oracilda, pelo investimento na minha formação acadêmica, acreditando na minha capacidade, além de toda compreensão, apoio, carinho, atenção, respeito e amor.

Ao meu irmão, Gustavo, pelo amor e apoio, paciência nas horas mais difíceis e pela companhia, que tornou os meus dias mais agradáveis e felizes.

Aos meus avós Olavo, Nair, Sebastião e Iracides por acreditarem em mim e me apoiarem desde a infância.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	iii
SUMMARY	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Revisão de Literatura	2
A cultura de cana-de-açúcar.....	2
Melhoramento genético na cultura de cana-de-açúcar.....	3
A ferrugem da cana-de-açúcar	6
O uso de marcadores moleculares no melhoramento de cana-de-açúcar.....	9
Mapeamento associativo: conexão marcadores moleculares-fenótipo.....	12
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (<i>Puccinia melanocephala</i>) EM PAINEL DE MAPEAMENTO ASSOCIATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR	15
Resumo.....	15
Introdução	15
Material e Métodos.....	17
Material vegetal	17
Delineamento experimental	17
Avaliação da ferrugem marrom.....	18
Análise de dados	19
Resultados	20
Discussão	25
Conclusões	27
CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À SEVERIDADE À FERRUGEM MARROM EM PAINEL ASSOCIATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum</i> spp.)	28
Resumo.....	28

Introdução	29
Material e Métodos.....	31
Material vegetal	31
Avaliação fenotípica.....	33
Extração e quantificação de DNA	34
Marcadores SSR (<i>Simple Sequence Repeat</i>).....	34
Marcadores AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>).....	35
Análise de dados	36
Avaliação do polimorfismo	36
Avaliação do desequilíbrio de ligação	37
Avaliação da estrutura genética	37
Análise de associação.....	39
Resultados	40
Diversidade genética	40
Desequilíbrio de ligação.....	43
Análise de estrutura genética	44
Análise de associação	48
Discussão	49
Conclusões	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À
SEVERIDADE DE SINTOMAS DA FERRUGEM MARROM EM PAINEL
ASSOCIATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)**

RESUMO – Associações entre marcadores moleculares e caracteres agronômicos importantes constituem uma ferramenta valiosa em programas de melhoramento, uma vez que podem identificar indivíduos superiores, ainda em fases juvenis, e, conseqüentemente, acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares. Neste contexto, este trabalho teve por finalidade estabelecer associações entre marcadores moleculares (AFLP e SSR) e resistência e/ou suscetibilidade à ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) da cana-de-açúcar, por meio da abordagem de mapeamento associativo. Os dados fenotípicos foram obtidos de experimentos conduzidos em Ribeirão Preto, durante março de 2010 e janeiro de 2012, em delineamento de blocos casualizados completos, DBC, com três repetições. Oitenta e três genótipos de cana-de-açúcar, incluindo cultivares comerciais e clones IAC, foram avaliados quanto a resistência à ferrugem marrom, sob condições de infecção natural. As plantas foram fenotipadas aos 10 meses após o plantio e 7 meses após o primeiro corte. A maioria dos genótipos avaliados (>71%) apresentou reação de resistência à ferrugem marrom; sendo o ciclo de cana-planta mais suscetível ao ataque do fungo do que a soqueira. A resistência à ferrugem marrom apresentou elevada herdabilidade, superior a 0,7. O painel associativo foi caracterizado com 79 pares de *primer* SSR e 20 combinações de AFLP, os quais detectaram 1015 marcas polimórficas. Os marcadores SCC60.8, SCA31.3, M56/E35 e M56/E37 foram correlacionados à suscetibilidade, enquanto SCB14.9 e M56/E33, ligados à resistência à ferrugem marrom. O efeito individual das marcas oscilou entre -0.37 ($R^2 = 0.05$) e 0.24 ($R^2 = 0.08$). Os marcadores moleculares associados à severidade à ferrugem marrom serão validados, visando explorá-los dentro do programa de melhoramento genético para identificar materiais resistentes ou mesmo eliminar alelos desfavoráveis, e, assim, acelerar os ganhos genéticos.

Palavras chave: AFLP, fungo, mapeamento associativo, poliploidia, SSR

**IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED TO SYMPTOMS
SEVERITY OF BROWN RUST IN SUGARCANE ASSOCIATION MAPPING PANEL
(*Saccharum* spp.)**

SUMMARY - Associations between markers and agriculturally important traits are a valuable tool for breeding programs, since they can identify superior individuals still in the initial developmental stages, and thus accelerate the cultivars development. In this context, the work aimed to establish associations between molecular markers (AFLP and SSR) and resistance and/or susceptibility to brown rust (*Puccinia melanocephala*) in sugarcane, using association mapping approach. The phenotypic data were obtained from field trials in Ribeirão Preto, during March 2010 and January 2012 in a randomized complete block design, DBC, with three replications. Eighty-three sugarcane genotypes, including commercial cultivars and IAC clones, were evaluated for resistance to brown rust under natural infection. The plants were phenotyped at 10 months after planting and 7 months after the first cut. Most of the evaluated genotypes (>71%) presented rust resistance reaction, with the plant cane crop cycle more susceptible to the fungus attack than the ratoon cane. Brown rust resistance showed high heritability, greater than 0,7. The whole panel was genotyped with 79 SSR primer pairs and 20 AFLP primer combinations, resulting in 1015 polymorphic markers. Markers SCC60.8, SCA31.3, M56/E35 and M56/E37 were correlated with susceptibility, while SCB14.9 and M56/E33 were associated to brown rust resistance. The individual marker effect ranged from -0.37 ($R^2 = 0.05$) to 0.24 ($R^2 = 0.08$). The molecular markers associated with the severity of brown rust should be validated, to be exploited in the breeding program to identify resistant materials or even eliminate unfavorable alleles, and thus accelerate the genetic gain.

Keywords: AFLP, fungus, association mapping, polyploid, SSR

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

A cultura de cana-de-açúcar é um dos principais cultivos no Brasil, com destaque para a produção de açúcar e etanol, sendo ainda utilizada na geração de energia elétrica e como boa alternativa na alimentação animal (DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

Cultivares de cana-de-açúcar são organismos poliplóides, com freqüente aneuploidia, características que contribuem para a complexidade genética desta cultura, restringindo a identificação de locos responsáveis pelo controle de características complexas de interesse agrônômico (OLIVEIRA et al., 2009).

O mapeamento associativo é uma metodologia recente para estabelecer associações entre polimorfismo genético e variação fenotípica em plantas e tem obtido sucesso na identificação de genes envolvidos em características importantes com florescimento, produção, tamanho de grãos e resistência a doenças (THORNSBERRY et al., 2001; BRESEGHELLO & SORRELLS, 2006a; WEI et al., 2006; AGRAMA et al., 2007).

Entre os problemas fitossanitários, a ferrugem marrom tem grande impacto econômico no setor canavieiro, pois é responsável por elevadas perdas na produção e substituição de cultivares suscetíveis (RAGO, 2005; DOS SANTOS, 2008). Essa é uma doença foliar causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* H. Sydow & P. Sydow, que em cultivares suscetíveis pode promover a morte de folhas jovens, redução do diâmetro e comprimento dos colmos, afetando negativamente a produtividade da cana-de-açúcar (PURDY et al., 1983; RAID & COMSTOCK, 2000).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil molecular e a resposta à ferrugem marrom em um grupo de cultivares comerciais e clones IAC, em fase avançada de seleção do Programa de Melhoramento Cana/IAC, a fim de buscar

associações importantes entre marcadores moleculares do tipo SSR e AFLP e a resistência à ferrugem marrom por meio da abordagem de mapeamento associativo.

Revisão de Literatura

A cultura de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical de metabolismo C4, de alta eficiência na conversão de CO₂, com capacidade de acumular grande quantidade de sacarose no seu colmo. Processada, a sacarose é, principalmente, convertida em diferentes tipos de açúcar (refinado, branco, confeito, mascavo, orgânico), matérias-primas para todas as indústrias alimentícias e de bebidas, e etanol combustível (NEVES & CONEJERO, 2010a).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), para a safra 2011/2012, a área destinada à cultura da cana-de-açúcar é 8.434,3 mil hectares, sendo a produtividade média estimada em 69.824 kg/ha. A previsão total de cana moída é de 588,9 milhões de toneladas, dos quais 288,3 milhões de toneladas serão destinadas à produção de açúcar e 300,6 milhões de toneladas, à produção de etanol que deverão produzir 23,7 bilhões de litros de etanol.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar e etanol, no entanto há expectativas em elevar esses números pelo aumento de área cultivada, em São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Mato Grosso, e pela implantação de novas usinas sucroalcooleiras (CONAB, 2011). O impulso a essa ampliação está ligado, principalmente, ao crescimento do mercado consumidor interno e externo.

O aumento das exportações do açúcar associa-se à conversão da União Europeia de exportador a importador, devido à redução de subsídios imposta pela Organização Mundial de Comércio a seus produtores, e ao crescimento populacional e desenvolvimento econômico da Ásia/Pacífico, que implica êxodo rural, com

consequente mudança de hábito alimentar. Da mesma forma, as políticas do governo como Fome Zero e Bolsa Família também impulsionam o mercado interno (VEIGA FILHO et al., 2008; NEVES & CONEJERO, 2010a). Para o álcool, a expansão do mercado interno é motivada pela crescente demanda de carros flex, enquanto o aumento nas exportações ocorre em função dos elevados preços do petróleo e da demanda por energia renovável e menos poluente (VEIGA FILHO et al., 2008; NEVES & CONEJERO, 2010b).

As preocupações relacionadas ao aquecimento global e desenvolvimento sustentável também tem orientado pesquisas que visam unir a utilização de “subprodutos” do processo de produção à geração de energia. O bagaço e a palha de cana-de-açúcar, por exemplo, podem ser queimados nas fornalhas das usinas sucroalcooleiras, produzindo vapor que move turbinas e gera energia elétrica. Estimam-se que em 2020 esses componentes serão responsáveis por 15.2GW, 15% da demanda doméstica (RIPOLI & RIPOLI, 2008; NEVES & CONEJERO, 2010c). Além disso, é promissor o desenvolvimento de bioplásticos, derivados do álcool ou açúcar (NEVES & CONEJERO, 2010d).

Nesse cenário favorável à produção canavieira, o Brasil precisa superar a baixa produtividade de parte seus plantios, principalmente os canaviais nordestinos, (CNA & CEPEA, 2011) e atender à sustentabilidade, ambas características que deveriam ser focos principais em programas de melhoramento genético desta cultura.

Melhoramento genético na cultura de cana-de-açúcar

O bom desempenho de cultivares de cana-de-açúcar é essencial a todas as cadeias produtivas do setor sucroalcooleiro. Assim, é necessário o desenvolvimento contínuo de novas cultivares que beneficiem os produtores e que atendam às exigências do mercado; características que constituem objetivos de programas de melhoramento genético (BRESSIANI, 2001; PALHARES, 2010).

O Brasil é um dos pioneiros na obtenção de cultivares de cana-de-açúcar de valor comercial, onde se destacam os programas de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas- IAC; o do Centro de Tecnologia Canavieira- CTC; o das universidades federais que compõem a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro- Ridesa; e a CanaVialis (BARBOSA & SILVEIRA, 2010).

Os métodos de melhoramento de cana-de-açúcar são baseados na seleção de genótipos superiores dentro de populações segregantes, derivadas de cruzamentos entre indivíduos diferentes, durante vários estágios de propagação clonal (MATSUOKA et al., 1999; LANDELL & BRESSIANI, 2008).

A variabilidade genética disponível para seleção provém de cruzamentos sexuais. Por isso, é fundamental a escolha adequada dos genitores, que deve considerar tanto o desempenho do clone quanto o resultado de sua progênie (LANDELL & BRESSIANI, 2008). Devido à poliploidia da cana-de-açúcar e à origem interespecífica das cultivares, os indivíduos utilizados nos cruzamentos são altamente heterozigóticos, o que proporciona progênies segregantes para grande número de locos já na primeira geração de cruzamento (geração F_1) (MATSUOKA et al., 1999).

Para realizar os cruzamentos, são necessários o florescimento e o seu sincronismo. Ambos os processos ocorrem em condições edafoclimáticas específicas que envolvem temperatura mínima de 18°C e máxima de 32 a 35°C, umidade relativa e precipitações elevadas, solos de menor fertilidade natural e latitude entre 10°N e 10°S (BARBOSA & SILVEIRA, 2010). No Brasil, essas condições são encontradas em municípios nordestinos, onde estão localizadas as estações de cruzamento dos diferentes programas de melhoramento, ou são simuladas artificialmente, como na câmara de fotoperíodo instalada no Centro de Cana do IAC em Ribeirão Preto, São Paulo.

O cruzamento envolve a retirada dos colmos com inflorescência, os quais são levados para a casa de hibridação, onde os cruzamentos são montados. Entre os métodos de hibridação da cana-de-açúcar estão os policruzamentos e os cruzamentos biparentais. Nos policruzamentos, diversos genitores masculinos são reunidos e cruzados com um único genitor feminino. Nos cruzamentos biparentais, são utilizados

apenas dois genitores, ou seja, são determinados o genitor masculino e o feminino (LANDELL & BRESSIANI, 2008). Como a cana-de-açúcar é uma planta alógama com flores hermafroditas, é importante determinar qual genótipo será utilizado como doador e receptor de pólen para evitar a autofecundação (BARBOSA & SILVEIRA, 2010).

Após a obtenção das sementes, denominadas de *seedlings*, são estabelecidas novas etapas de seleção. Na etapa inicial, existem milhares de genótipos para serem avaliados, mas pouco material de cada genótipo. Assim, é construído um experimento com parcelas pequenas, nas quais o genótipo é representado uma única vez, em um único ambiente. Nessa etapa a seleção é individual para caracteres de alta herdabilidade. À medida que os ciclos de seleção se sucedem, o número de genótipos distintos diminui, de modo que é possível submeter as plantas selecionadas anteriormente a ensaios mais acurados. Esses ensaios apresentam maior número de repetições, parcelas maiores e são instalados em diferentes unidades experimentais. Dessa forma, aumenta-se a precisão experimental, o que permite identificar, com maior segurança, o genótipo ou genótipos superiores (BRESSIANI, 2001).

O número de etapas de seleção pode variar entre os programas de melhoramento, atingindo quatro no programa da Ridesa e cinco nos programas do IAC e do CTC (LANDELL & BRESSIANI, 2008; BARBOSA & SILVEIRA, 2010). Considerando o número de etapas e de cortes em cada etapa, pode-se concluir que o desenvolvimento de uma cultivar de cana-de-açúcar é um processo que exige muito tempo, cerca 9-13 anos (LANDELL & BRESSIANI, 2008; BARBOSA & SILVEIRA, 2010).

Durante o processo de seleção, são objetivadas características como: resistência ou tolerância a doenças, tolerância à seca, ausência de florescimento e isoporização, capacidade de brotação sob palha, hábito ereto de crescimento, brotação rápida e prolongada no caso das soqueiras, despalha fácil ou espontânea e, fundamentalmente, elevada produtividade de açúcar (LANDELL & BRESSIANI, 2008). A avaliação da produção de açúcar envolve dois componentes: teor de sacarose na cana-de-açúcar, denominado pol% cana, e a produção de colmos, TCH- toneladas de colmo por hectare. Essas características apresentam herança complexa e baixa herdabilidade e,

consequentemente, determinam os métodos de seleção, os quais deveriam ser baseados nos valor fenotípico médio da família e exigem longo período de avaliação (BRESSIANI, 2001).

A ferrugem da cana-de-açúcar

Os problemas fitossanitários constituem expressivos fatores de redução de produtividade da cana-de-açúcar. Por isso, é objetivo dos programas de melhoramento o desenvolvimento de cultivares resistentes às principais doenças. Entre as doenças causadas por fungos, destaca-se a ferrugem marrom, que pode provocar perdas de produtividade de 25% em cultivares com resistência intermediária a moderada e superiores a 50% em cultivares suscetíveis (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006).

A ferrugem é uma doença causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, o qual pertence à divisão Basidiomycota, classe Teliomycetes, ordem Uredinales, família Puccinaceae (MATSUOKA & MACCHERONI, 2010).

O primeiro registro do patógeno ocorreu na Índia, no início do século 20, onde o fungo afetou plantas de *Erianthus ravennae*. No entanto, logo nas próximas décadas, foram relatados casos da doença em cana-de-açúcar em outros países da Ásia, além da África e Oceania (MATSUOKA & MACCHERONI, 2010).

Na América, a primeira ocorrência foi na República Dominicana, em 1978, e em poucos meses alcançou vários países do Caribe, América Central, América do Norte e América do Sul (CARDOSO & SANGUINO, 1988). Segundo MACCHERONI & MATSUOKA (2006), a entrada do patógeno no continente está relacionada a esporos provenientes da África, que foram transportados pelo vento.

No Brasil, a ferrugem foi registrada pela primeira vez em 1986, no município de Capivari, São Paulo, e rapidamente atingiu os canaviais de outros estados (SANGUINO & TOLEDO, 1983). Correntes aéreas vindas do continente africano também são consideradas como responsáveis pela entrada do patógeno no país (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006).

Atualmente o fungo está disseminado em quase todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar (ASNAGHI et al., 2004), sendo responsável por perdas na produção e substituição de cultivares suscetíveis em diversos países (RAGO, 2005; DOS SANTOS, 2008).

O fungo parasita os tecidos foliares e como sintoma inicial de seu ataque há o aparecimento de pequenas pontuações cloróticas, as quais progridem para manchas alongadas de coloração amarelada e que podem ser observadas nas superfícies superior e inferior das folhas. As manchas aumentam rapidamente de tamanho e adquirem coloração avermelhada ou vermelho-parda (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006). Essas lesões têm de 2-10 milímetros de comprimento e 1-3 milímetros de largura (TOKESHI & RAGO, 2005).

Na superfície inferior das folhas, as lesões assumem feição pustular, de coloração amarelada a marrom escuro. Essa coloração é conferida pelos esporos, que, durante sua liberação, rompem a epiderme da planta (CARDOSO & SANGUINO, 1988).

Em cultivares muito suscetíveis, devido ao grande número de lesões, as pústulas agrupam-se, formando amplas áreas de tecido necrosado; as quais prejudicam o processo fotossintético e, conseqüentemente, o crescimento e a produção da cana (TOKESHI & RAGO, 2005).

O fungo produz dois tipos de esporos: os urediniósporos, esporos do ciclo assexual, e os teliósporos, esporos do ciclo sexual do patógeno. Os esporos são facilmente transportados pelo vento, respingos de chuva e também por meio de materiais vegetais contaminados (CARDOSO & SANGUINO, 1988).

Ambos os esporos são capazes de germinar, todavia, somente os urediniósporos podem infectar o hospedeiro (CARDOSO & SANGUINO, 1988). Altas porcentagens de germinação ocorrem entre 20 e 25°C e umidade relativa do ar acima de 70%, sendo necessária a presença de água líquida na superfície foliar (TOKESHI & RAGO, 2005; SANGUINO & TOLEDO, 1983). Após a germinação, o fungo, por meio de uma hifa, *peg* de infecção, penetra seu hospedeiro através das aberturas estomáticas. A partir da câmara subestomática, o *peg* continua crescendo intercelularmente, produzindo

haustórios para o interior das células da planta, os quais são responsáveis pela absorção de nutrientes (CARDOSO & SANGUINO, 1988).

Dez a 14 dias após a infecção aparecem as pústulas, de onde são liberados os esporos para o ambiente (SANGUINO & TOLEDO, 1983).

Os picos de incidências da doença ocorrem nos meses de junho a agosto e de novembro a janeiro (GARCIA et al., 2007). Entretanto, no verão, as elevadas temperaturas podem inativar os esporos e as fortes chuvas, remover os esporos da superfície das folhas, reduzindo, assim, o nível de infecção (CARDOSO & SANGUINO, 1988).

As plantas mais suscetíveis ao ataque dos fungos são aquelas com dois a oito meses, assim como a cana planta em relação às soqueiras (SANGUINO & TOLEDO, 1983; IDO et al., 2006).

Entre os meios de controle da doença estão o plantio em áreas de escape, onde a incidência do patógeno é baixa, e o manejo da época do corte, que deve ser antecipado para o início de agosto na região Centro-Sul (DOS SANTOS, 2008). Entretanto, o principal método de controle da doença é o uso de cultivares resistentes, ou tolerantes à ferrugem (TOKESHI & RAGO, 2005).

O desenvolvimento de cultivares resistentes em programas de melhoramento é favorecido pela elevada herdabilidade desse caráter, 0,75- 0,9, sendo que grande parte da variação genética está relacionada a efeitos aditivos, 44%-68% (HOGARTH et al., 1993; RAMDOYAL et al., 2000). Em 1996, DAUGROIS et al. reportaram uma segregação de 3:1 para resistência à ferrugem marrom em uma progênie de 141 indivíduos derivada da auto-fecundação da cultivar R570, indicando que esse caráter é condicionado por um gene de efeito maior. Esses resultados foram confirmados por diversos trabalhos (RAMDOYAL et al., 2000; ASNAGHI et al., 2001; ASNAGHI et al., 2004). No entanto, RAMDOYAL et al. (2000) também sugeriram a existência de outros, de efeito menor, atuando de maneira quantitativa.

O uso de marcadores moleculares no melhoramento de cana-de-açúcar

Como mencionado anteriormente, o desenvolvimento de uma nova cultivar comercial de cana-de-açúcar é um processo longo. Uma das alternativas para acelerar os progressos genéticos é a união das práticas convencionais com as técnicas de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares são sequências de DNA, que permitem a distinção entre indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Nos programas de melhoramento, os marcadores têm várias aplicações, tais como: (1) auxiliar na identificação de genótipos superiores envolvidos em policruzamentos, de forma a direcionar os cruzamentos; (2) estimar a variabilidade existente, a fim de não restringir a base genética do material e explorar a heterose proveniente de cruzamentos entre indivíduos divergentes; (3) identificar genes específicos ou regiões que contenham genes responsáveis por caracteres qualitativos e quantitativos, o que permite direcionar a seleção dos indivíduos por meio de seu genótipo, ainda nas primeiras fases de seleção, ou mesmo desenvolver plantas transgênicas (COLLARD & MACKILL, 2008; CRESTE et al., 2008; KALIA et al., 2011). Além dessas vantagens, os marcadores moleculares são extremamente úteis, pois são numerosos e não são alterados devido a condições ambientais e/ou estágio de desenvolvimento do organismo (ALZATE-MARIN et al., 2005; JONES et al., 2009).

Atualmente, existem diversos tipos de marcadores moleculares, que se diferem pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade, capacidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (TEIXEIRA, 2006). Entre esses marcadores, destacam-se por seus elevados níveis de polimorfismo, ampla cobertura do genoma e alta reprodutibilidade, o SSR, *simple sequence repeat*, e o AFLP, *amplified fragment length polymorphism* (CAIXETA et al., 2009).

Os SSRs são sequências de DNA formadas por um motivo de um a seis nucleotídeos, que se repete lado a lado, de 5-100 vezes por sítio (LITT & LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989). Os SSRs estão presentes em procarionotos e eucariotos, sendo encontrados em regiões codantes e não codantes do genoma

nuclear, assim como em cloroplastos e mitocôndrias (SORANZO et al., 1999; WEISING & GARDNER, 1999; ZANE et al., 2002). Em plantas, as repetições AAG e AT são as mais comuns em sequências expressas e não expressas, respectivamente, enquanto, em animais, as repetições AC são as mais frequentes (KALIA et al., 2011).

O polimorfismo desse marcador é derivado do número variado de repetições dentro de um mesmo loco, cuja origem está ligada a inserções ou deleções de um ou mais motivos, provenientes de um deslizamento da DNA polimerase sobre a região de repetição, ou um *crossing over* desigual (ELLEGRÉN, 2004).

Os SSRs podem ser isolados de bibliotecas genômicas, nas quais diversos clones são submetidos a sondas baseadas em repetições para identificar fragmentos contendo SSR. Os fragmentos hibridizados são então sequenciados, o que permite a construção de *primers* específicos para os SSRs (JONES et al., 2009). Esse processo depende tempo e tem elevado custo, todavia existem protocolos de enriquecimento de biblioteca que tornam a identificação de SSRs mais simples e eficiente. Diferentes metodologias para construção de bibliotecas enriquecidas foram revisadas por ZANE et al. (2002), sendo o método de hibridização seletiva um dos mais utilizados. Na primeira etapa dessa técnica, fragmentos de DNA genômico são ligados a sequências conhecidas, um vetor ou um adaptador. Esses fragmentos são desnaturados e hibridizados com sondas de microssatélites, as quais estão aderidas à membrana de náilon ou são marcadas com biotina e, neste caso, podem ser capturadas por partículas magnéticas cobertas com estreptoavidina. Após a hibridização, o DNA é eluído, amplificado por PCR e clonado em vetor. Finalmente, os clones são submetidos a outra hibridização ou podem ser diretamente sequenciados.

Além das bibliotecas genômicas, os SSRs também podem ser facilmente obtidos a partir de bancos de dados públicos onde são depositadas sequências expressas de DNA e, nesse caso, são conhecidos por SSR gênico ou EST-SSR. Nessa abordagem, a identificação de sequências repetitivas é realizada por programas computacionais, o que representa uma forma simples, rápida e econômica de desenvolver *primers* de SSR. No Brasil, o projeto Sucest, *Sugarcane Expressed Sequence Tag Project*, gerou um dos mais completos bancos de dados de sequências expressas, a *expressed*

sequence tag (EST), para cana-de-açúcar no mundo, com 291.904 sequências reunidas em 43.141 clusters, dos quais 2.005 contêm SSRs (TELLES et al., 2001; PINTO et al., 2004).

O polimorfismo de SSRs em regiões transcritas sugere que o comprimento do marcador pode alterar a expressão e a função de um gene, ou seja, implica em variação fenotípica. Assim, uma determinada característica de interesse pode ser diretamente selecionada pela localização do marcador EST-SSR ao qual ela está ligada (VARSHNEY et al., 2005), ou ainda que ele seja o responsável pela característica em questão (MA et al., 2004). Isso torna esse tipo de marcador extremamente útil em estudos de associação entre genótipo e fenótipo. Além disso, como as seqüências transcritas, por pressão de seleção, são mais conservadas, os *primers* que se hibridizam a elas podem ser transferidos entre espécies relacionadas filogeneticamente (HOLTON et al., 2002). No entanto, por representarem sequências conservadas, os EST-SSR são menos polimórficos quando comparados aos SSRs genômicos.

Os marcadores AFLP são fragmentos, amplificados via PCR, originados a partir da digestão do DNA por enzimas de restrição. Como mutações pontuais, inserções, deleções alteram a sequêcia dos sítios de restrição, há mudanças no tamanho dos fragmentos, de forma que cada genótipo pode ser caracterizado por seu perfil de fragmentos.

A metodologia de marcadores AFLP foi proposta por VOS et al (1995) e para obter esses marcadores, o DNA genômico é digerido por meio de duas enzimas de restrição, uma de corte raro, que reconhece sítios de seis a oito bases, tais como *Apal*, *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*, e outra de corte freqüente, que reconhecem sítios de quatro bases, como, por exemplo, *MseI* e *TaqI*. Essas enzimas geram fragmentos com extremidades coesivas que auxiliam a ligação de adaptadores, oligonucleotídeos, às extremidades dos fragmentos. O conhecimento das sequências dos adaptadores e dos sítios de restrição permite a construção de *primers* complementares a essas sequências e, dessa forma, os fragmentos podem ser amplificados por PCR. Os produtos da amplificação podem ser separados por eletroforese.

A digestão produz grande número de fragmentos, os quais poderiam, durante a eletroforese, co-migrar, resultando em níveis falsos de polimorfismo. A fim de reduzir esse número, a PCR é realizada por meio de *primers* seletivos, os quais têm, além das sequências complementares ao adaptador e ao sítio de restrição da enzima, alguns nucleotídeos adicionais na extremidade 3'. Dessa forma, apenas os fragmentos com bases complementares a essa extensão são amplificados. Comumente, a amplificação é realizada em duas etapas. Na primeira, denominada pré-amplificação, o *primer* possui um único nucleotídeo seletivo, enquanto, na segunda etapa, amplificação seletiva, são utilizados três nucleotídeos seletivos.

Mapeamento associativo: conexão marcadores moleculares-fenótipo

Marcadores SSR e AFLP tem sido utilizados na construção de diversos mapas genéticos de ligação (HOARAU et al., 2001; AITKEN et al., 2005; RABOIN et al., 2006; GARCIA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; ALWALA et al., 2008; PIPERIDIS et al., 2008), os quais permitem identificar e mensurar o efeito de genes com efeitos significativos sobre o fenótipo; e auxiliam, portanto, a conexão de marcadores moleculares à características de interesse agrônômico. Uma abordagem recente para estabelecer essa conexão é por meio do mapeamento associativo, técnica empregada inicialmente na busca de marcadores associados a doenças humanas, que tem obtido sucesso na identificação de genes envolvidos em características importantes com florescimento, produção, tamanho de grãos e resistência a doenças (THORNSBERRY et al., 2001; BRESEGHELLO & SORRELLS, 2006a; WEI et al., 2006; AGRAMA et al., 2007).

As análises de associação estão diretamente relacionadas à extensão do desequilíbrio de ligação, LD, uma associação não aleatória de alelos/marcadores de diferentes locos, analisada em uma população, na qual os indivíduos são derivados de diferentes cruzamentos (FLINT-GARCIA et al., 2003). Ao explorar a diversidade de genótipos que exibem parentescos distintos, essa metodologia apresenta diferentes

vantagens, tais como: (1) a diversidade alélica é elevada; (2) é possível reduzir custos e tempo, uma vez que não é necessário construir uma população derivada de um cruzamento; (3) a resolução dos mapas associativos é elevada, pois ao longo de sucessivas gerações, que constituem a história evolutiva de cada indivíduo, o potencial de recombinação entre alelos é muito elevado. Assim, espera-se que somente marcadores fortemente ligados ao loco permaneçam associados ao caráter de interesse (GUPTA et al., 2005; ZHU et al., 2008). Apesar desta última vantagem, a redução do LD ao longo das gerações implica em menor correlação entre alelos e, por isso, esse tipo de análise exige um grande número de marcadores para uma cobertura adequada do genoma (BRESEGHELLO & SORRELLS, 2006a; BLAIR et al., 2009; COMADRAN et al., 2009).

Outra desvantagem do método é a elevada probabilidade de erros tipo I, devido, principalmente, à presença de estrutura genética na população, pois frequências alélicas distintas entre subgrupos podem conduzir a associações entre marcador e caráter falsas (CARPIO et al., 2011).

Em cana-de-açúcar, o mapeamento associativo tem gerado, principalmente, associações entre marcadores moleculares e resistência a doenças. BARNES et al. (1997), em uma coleção de 50 indivíduos, caracterizados com 382 marcadores RAPD, identificaram, por meio de regressão *stepwise*, quatro marcadores associados à resistência à broca do colmo (*Eldana saccharina*), quatro marcadores associados à resistência ao mosaico (SCMV-sugarcane mosaic virus) e três marcadores associados à resistência ao carvão (*Ustilago scitaminea*). Esses marcadores explicaram 34.7%, 40.1% e 31.6% da variação fenotípica observada para cada uma dessas doenças, respectivamente.

Também por análise de regressão, WEI et al. (2006), com emprego de 1.068 marcadores AFLP e 141 SSR, mostraram que 59% da variação fenotípica, relacionada a resistência ao carvão, foi associada a 11 marcadores; 32% da variação para podridão da raiz (*Pachymetra chaunorhiza*) e 32% para a escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*) foram ligadas a quatro marcadores cada, e para a doença de Fiji (*fiji disease virus*), 26% da variação foi explicada por cinco marcadores.

Assim como BARNES et al. (1997), por meio de regressão *stepwise*, BUTTERFIELD (2007), ao analisar uma coleção de 77 genótipos com 275 marcadores RFLP e 1056 marcadores AFLP, identificou seis marcadores que explicaram 55.3% da variação para a resistência ao carvão e seis marcadores responsáveis por 63.4% da resistência à broca do colmo.

Todos esses resultados confirmam o potencial do mapeamento associativo na identificação de marcadores associados a caracteres de interesse em cana-de-açúcar, informações que poderiam ser rapidamente assimiladas pelos programas de melhoramento genético.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (*Puccinia melanocephala*) EM PAINEL DE MAPEAMENTO ASSOCIATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo - O objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência à ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) em um painel de cana-de-açúcar, incluindo cultivares comerciais e clones superiores do Programa de Melhoramento Cana/IAC, sob condições de infecção natural. O experimento foi instalado em março de 2010 no Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana, Ribeirão Preto, SP, em delineamento de blocos casualizados completos, DBC, com três repetições. As plantas foram fenotipadas aos 10 meses após o plantio e 7 meses após o primeiro corte. A maioria dos genótipos avaliados (>71%) apresentou reação de resistência à ferrugem marrom; sendo o ciclo de cana-planta mais suscetível ao ataque do fungo do que a soqueira. A resistência à ferrugem marrom apresentou elevada herdabilidade, superior a 0,7.

Palavras chave: doença, fungo, herdabilidade, *Saccharum*

Introdução

Os problemas fitossanitários constituem expressivos fatores de redução de produtividade da cana-de-açúcar. Entre as doenças causadas por fungos, destaca-se a ferrugem marrom, que pode provocar perdas de produtividade de 25% em cultivares com resistência intermediária a moderada e superiores a 50% em cultivares suscetíveis (MATSUOKA & MACCHERONI, 2010).

Essa doença é causada pelo fungo biotrófico *Puccinia melanocephala*, o qual apresenta desenvolvimento acentuado no início do outono e final do inverno, quando as

condições climáticas apresentam temperaturas amenas, 16 a 29°C, e elevada umidade, superior a 70%. Sob essas condições climáticas e existindo água líquida na superfície foliar por no mínimo oito horas, os esporos do fungo germinam e podem penetrar no hospedeiro através dos estômatos (TOKESHI & RAGO, 2005; CARDOSO & SANGUINO, 1988).

Dez a 14 dias após a infecção aparecem os primeiros sintomas da doença, que incluem pequenas manchas alongadas de coloração esbranquiçadas ou amareladas, denominadas flecks. Essas manchas aumentam rapidamente de tamanho e adquirem coloração marrom avermelhado. Na superfície inferior das folhas, as lesões assumem feição pustular, de coloração amarelada a marrom escuro. Essa coloração é conferida pelos esporos, que, durante sua liberação, rompem a epiderme da planta (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006; CARDOSO & SANGUINO, 1988).

Em cultivares muito suscetíveis, devido ao grande número de lesões, as pústulas agrupam-se, formando amplas áreas de tecido necrosado; o qual prejudica o processo fotossintético. De fato, áreas infectadas apresentam redução de crescimento, morte de perfilhos, colmos finos e encurtamento de entrenós (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006; SANGUINO & TOLEDO, 1983).

O principal método de controle da doença é o uso de cultivares resistentes, ou tolerantes à ferrugem (DOS SANTOS, 2008). Por isso, é fundamental que os programas de melhoramento genético identifiquem e selecionem genótipos resistentes à doença. Uma estratégia importante que auxilia na identificação desses genótipos superiores, ainda em fases juvenis, é a correlação entre marcadores moleculares e os locos responsáveis por essa característica de interesse (COLLARD & MACKILL, 2008). Essa conexão pode ser estabelecida por meio de mapeamento associativo, o qual é baseado no desequilíbrio de ligação entre alelos de diferentes locos, observado em um grupo de indivíduos derivados de diferentes cruzamentos (FLINT-GARCIA et al., 2003). Ao explorar genótipos que exibem parentescos distintos, espera-se elevada diversidade alélica, o que implica grande variação fenotípica, a qual deve ser caracterizada adequadamente para o sucesso dos estudos associativos (SHARMA, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a severidade à ferrugem marrom sob condições naturais de infecção em um painel de mapeamento associativo composto por cultivares e clones IAC de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram utilizados 83 genótipos de cana-de-açúcar, incluindo clones IAC em fase avançada de seleção do Programa de Melhoramento Cana/IAC e cultivares comerciais com diferentes respostas quanto à severidade à ferrugem marrom (Tabela 4).

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em campo, no período de 2010 a 2012, em área do Centro de Cana, em Ribeirão Preto, SP. O Centro está localizado nas coordenadas 21°12' de latitude Sul e 47°52' de longitude Oeste, com altitude média de 640 m. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Férrico, de acordo com o sistema EMBRAPA (1999). Segundo o método de Köppen, o município de Ribeirão Preto apresenta clima Aw, caracterizado por elevadas temperaturas e elevada pluviosidade, embora o inverno seja seco e o verão úmido (ROLIM et al., 2007).

O experimento foi montado em delineamento de blocos casualizados completos (DBC), com três repetições, sendo cada parcela formada por um sulco de 1.5m de comprimento, com espaçamento entre linhas e de plantas dentro da linha de 2m, totalizando uma área de 2604m². Como bordadura foi plantada a cultivar IAC86-2480, altamente suscetível à ferrugem marrom. A adubação foi realizado com o fertilizante 08-28-16 na dosagem de 500Kg.ha⁻¹.

Avaliação da ferrugem marrom

O experimento foi plantado no dia 25 de março de 2010 e, sob condições de infecção natural, foi avaliado no dia 28 de janeiro de 2011, quando a bordadura atingiu níveis satisfatórios de infecção para a avaliação. O corte da cana-planta foi realizado no dia 03 de agosto de 2011, quando se iniciou o primeiro ciclo de cana-soca, o qual foi avaliado no dia 06 de março de 2012. Durante esses períodos, os dados meteorológicos do Centro de Cana/IAC foram anotados e apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados meteorológicos de Ribeirão Preto de março de 2010 a março de 2012. T-temperatura; UR- umidade relativa

Mês/Ano	Tmáx (°C)	Tmín (°C)	Precipitação (mm)	URmédia (%)
-----Cana-planta-----				
Março/2010	30.8	23.8	154.3	89.9
Abril/2010	30.1	21.3	45.0	75.1
Maio/2010	28.6	17.4	20.6	78.2
Junho/2010	28.5	15.2	9.2	75.6
Julho/2010	30.0	16.1	27	75.9
Agosto/2010	30.7	14.5	0	71.5
Setembro/2010	31.3	18.6	108.1	69.6
Outubro/2010	31.0	20.1	75.9	78.7
Novembro/2010	30.6	19.6	141.2	81.2
Dezembro/2010	31.5	20.5	227.4	88.7
Janeiro/2011	30.7	27.0	229.5	91
-----Cana-soca-----				
Agosto/2011	29.5	14.5	12.5	
Setembro/2011	31.2	15.1	11.8	
Outubro/2011	29.7	17.8	194.1	
Novembro/2011	29.7	16.7	201.7	
Dezembro/2011	30.2	18.6	141.7	
Janeiro/2012	27.2	18.2	295.0	
Fevereiro/2012	31.0	19.2	93.7	
Março/2012	33.7	19.1	15.2	

Fonte: APTA-Ribeirão Preto (SP), comunicação pessoal.

A avaliação da resistência à ferrugem marrom foi baseada na severidade da ferrugem, % da área foliar afetada pela doença, observada no terço médio das touceiras, de acordo com a escala de notas, descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Escala de notas para avaliar a severidade de ferrugem marrom. Reação de resistência (R); reação de resistência intermediária (RI); reação de suscetibilidade (S).

Notas	Sintomas	Área foliar com sintomas(%)	Níveis de reação à ferrugem ²
1	Ausência total de sintomas	0	R
2	Presença de flecks e poucas pústulas	<2	R
3	Presença de algumas pústulas	<5	R
4	Presença de pústulas	>5 a 15	RI
5	Presença de pústulas	>15 a 25	RI
6	Presença de pústulas	>25 a 35	RI
7	Presença de pústulas	>35 a 50	S
8	Presença de pústulas	>50 a 75	S
9	Presença de pústulas	>75	S

Análise de dados

Para homogeneizar a variância, as notas de severidade foram transformadas de acordo com a expressão: $N_{trans} = \sqrt{N_{ori} + 1}$, em que N_{ori} é a nota original atribuída pelo avaliador e N_{trans} é a nota obtida após a transformação. Os dados dos dois anos foram reunidos para determinar os valores médios de observações fenotípicas, segundo a equação

$$y_i = \mu + b + g_i + b * g + a + a * g_i + e$$

em que y representa as observações fenotípicas; μ , a média geral das observações; b , o efeito de bloco; g_i , o efeito genético do i -ésimo genótipo; a , o efeito do ano; $b * g$ e $a * g_i$, o efeito de interação de bloco x genótipo e ano x genótipo, respectivamente; e , o erro experimental associado a todas as observações. Essa análise estatística foi realizada

no programa SAS (SAS, 2008), de acordo com o procedimento PROC GLM. As médias das notas foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, o qual foi realizado no programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

A metodologia de modelos mistos foi utilizada para obter a predição dos valores genotípicos em relação à média geral, os BLUPs (*Best Linear Unbiased Predictors*), segundo o modelo

$$y = X\beta + Z\alpha + e$$

em que y é o vetor das observações fenotípicas; X , a matriz de incidência dos efeitos fixos β ; Z , a matriz de incidência dos efeitos aleatórios α (genéticos ou ambientais); β , o vetor de efeitos fixos a serem estimados; α , o vetor de efeitos aleatórios ou valores genotípicos a serem preditos; e e , o vetor de erros aleatórios associados a cada observação. Para essa análise foi utilizado o procedimento PROC MIXED do programa SAS (SAS, 2008), em que o efeito de bloco e de ano foi considerado fixo e o de genótipo, considerado aleatório.

Os componentes de variância foram estimados para o ciclo de cana-planta e para o ciclo de cana-soca, utilizando o procedimento PROC VARCOMP do programa SAS (SAS, 2008).

Resultados

A Figura 1 exibe a distribuição de frequência das notas referentes à incidência de ferrugem no material amostrado.

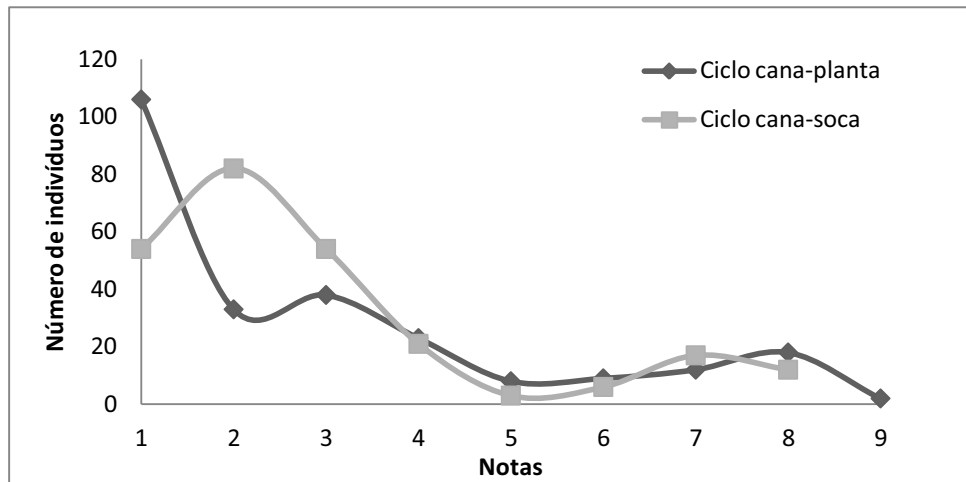


Figura 1: Incidência de ferrugem marrom no painel de cana-de-açúcar. Resultados dos três blocos, no ciclo de cana-planta e no ciclo de cana-soca.

Foram observados materiais com fenótipos variando desde os mais suscetíveis aos mais resistentes à ferrugem marrom.

O valor médio de severidade da ferrugem e o coeficiente de variação são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valor médio das notas de severidade da ferrugem marrom da cana-de-açúcar no painel de mapeamento associativo.

	Média	CV	Média	CV
	Cana-planta		Cana-soca	
Nori	2,88	35,15	2,94	25,61
$\sqrt{\text{Nori} + 1}$	2,60	13,34	2,74	10,08

As notas médias de severidade não apresentaram diferença significativa a 5% para o ciclo de cana-planta e planta-soca.

As notas de severidade e os valores genotípicos preditos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Notas de severidade para ferrugem marrom da cana-de-açúcar. Resultados médios dos três blocos para os ciclos de cana-planta e cana-soca.

Genótipo ¹	Notas médias ²		Predição do efeito genotípico ³
	Cana-planta	Cana-soca	
SP70-1143 (V)	8,00a	8,00a	1,058
SP86-42 (V)	8,00a	6,95a	0,947
RB72454 (V)	8,00a	6,95a	0,949
RB835486 (V)	8,00a	7,35a	0,978
SP79-1011 (V)	7,64a	7,35a	0,951
R570 (V)	7,64a	7,35a	0,951
IACSP98-5046 (C)	7,35a	7,35a	0,924
IAC86-2480 (V)	7,29a	7,64a	0,949
IACSP96-3056 (C)	6,67a	4,02b	0,559
IACSP95-2078 (C)	6,34a	5,25b	0,658
IACSP98-3020 (C)	5,92a	3,67c	0,457
IAC52-150 (V)	5,60b	7,01a	0,743
IACSP97-2023 (C)	5,50b	4,24b	0,482
IACSP99-1305 (C)	4,62b	2,53c	0,204
IACSP97-2020 (C)	4,62b	3,62c	0,327
IACSP95-1218 (V)	4,34b	3,67c	0,303
CTC9 (V)	4,29b	2,31c	0,140
IAC87-3396 (V)	4,02b	4,02b	0,306
IACSP97-6682 (C)	4,02b	4,95b	0,405
IACSP96-3076 (C)	3,97b	2,31c	0,107
IAC91-2195 (V)	3,71b	1,96d	0,028
IACSP99-4013 (C)	3,67b	7,35a	0,579
RB925211 (V)	3,58b	2,96c	0,143
IACSP02-2074 (C)	3,54b	1,99d	0,015
POJ2878 (V)	3,33c	4,24b	0,259
IACSP96-1066 (C)	3,28c	3,41c	0,152
IACSP94-2101 (V)	3,00c	3,41c	0,120
IACSP96-7586 (C)	3,00c	3,00c	0,082
RB855536 (V)	3,00c	1,96d	-0,053
IACSP97-2055 (C)	2,96c	2,65c	0,035

Tabela 4: continuação

Genótipo ¹	Notas médias ²		Predição do efeito genotípico ³
	Cana-planta	Cana-soca	
RB855156 (V)	2,96c	2,65c	0,035
IACSP98-6202 (C)	2,84c	1,59d	-0,121
IACSP99-4007 (C)	2,65c	2,53c	-0,016
IACSP93-6006 (V)	2,31c	2,61c	-0,050
IACSP97-7074 (C)	2,31c	2,65c	-0,045
IACSP97-3406 (C)	2,24c	2,65c	-0,053
IACSP98-3099 (C)	2,24c	2,65c	-0,053
IACSP99-4008 (C)	2,24c	1,96d	-0,146
IACSP93-2060 (V)	2,24c	3,00c	-0,011
IACSP96-2008 (C)	2,20c	2,31c	-0,101
IACSP97-7065 (C)	1,96c	2,31c	-0,138
IACSP97-7543 (C)	1,96c	2,24c	-0,146
IACSP98-3021 (C)	1,96c	1,99d	-0,180
IACSP98-7043 (C)	1,86d	1,00d	-0,306
IACSP97-7077 (C)	1,66d	1,66d	-0,273
IACSP98-2053 (C)	1,66d	2,31c	-0,180
IACSP99-4010 (C)	1,66d	3,00c	-0,078
SP80-3280 (V)	1,66d	2,31c	-0,180
IACSP96-1005 (C)	1,63d	1,66d	-0,273
IAC91-2218 (V)	1,59d	2,31c	-0,188
IACSP97-2053 (C)	1,59d	2,31c	-0,188
IACSP97-3331(C)	1,59d	1,66d	-0,281
IACSP97-4039 (C)	1,59d	1,00d	-0,382
IACSP98-2030 (C)	1,59d	2,31c	-0,188
IACSP99-3009 (C)	1,59d	1,99d	-0,053
IACSP95-5094 (V)	1,31d	1,99d	-0,273
IACSP96-2042 (V)	1,31d	1,99d	-0,273
IACSP96-7506 (C)	1,31d	1,99d	-0,273
IACSP97-2028 (C)	1,31d	2,65c	-0,188
IACSP97-3384 (C)	1,31d	1,31d	-0,374
IACSP97-7018 (C)	1,31d	1,00d	-0,424

Tabela 4: continuação

Genótipo ¹	Notas médias ²		Predição do efeito genotípico ³
	Cana-planta	Cana-soca	
IACSP99-3085 (C)	1,31d	1,66d	-0,323
IACSP99-4011 (C)	1,31d	1,66d	-0,348
RB867515 (V)	1,31d	1,31d	-0,374
IACSP96-3060 (V)	1,00d	1,66d	-0,374
IAC86-2210 (V)	1,00d	1,59d	-0,382
IAC91-1099 (V)	1,00d	1,31d	-0,424
IACSP93-3046 (V)	1,00d	2,31c	-0,281
IACSP94-2094 (V)	1,00d	2,96c	-0,201
IACSP94-4004 (V)	1,00d	2,31c	-0,281
IACSP95-3028 (V)	1,00d	1,66d	-0,374
IACSP95-5000 (V)	1,00d	1,31d	-0,424
IACSP96-2019 (C)	1,00d	1,00d	-0,474
IACSP96-3048 (C)	1,00d	1,31d	-0,424
IACSP96-7569 (C)	1,00d	1,96d	-0,331
IACSP97-2000 (C)	1,00d	1,31d	-0,424
IACSP97-2084 (C)	1,00d	1,96d	-0,331
IACSP97-2098 (C)	1,00d	1,00d	-0,474
IACSP97-2109 (C)	1,00d	1,00d	0,474
IACSP97-3313 (C)	1,00d	1,66d	-0,374
IACSP97-3391 (C)	1,00d	2,31c	-0,281
IACSP98-5010 (C)	1,00d	1,59d	-0,382
IACSP99-1308 (C)	1,00d	1,31d	-0,424

¹ C clone IAC; V cultivar comercial.

² Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, em nível de 5%, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

³ Respostas médias dos genótipos, ajustadas para o efeito fixo de bloco.

Para o ciclo de cana-planta, dos 83 genótipos avaliados, 59 (71%) foram reunidos no grupo de materiais resistentes, com notas variando de um a três, sendo que 40 desses indivíduos são clones IAC, com destaque para os clones IACSP96-2019, IACSP97-2098 e IACSP97-2109, os mais resistentes pela análise de modelo misto, com genótipo aleatório. Onze genótipos (13.3%), com notas entre 5,92 e oito, foram

classificados como suscetíveis, no entanto apenas quatro desses eram clones IAC. No ciclo de cana-soca, oito indivíduos anteriormente classificados, principalmente, como materiais com resposta intermediária, foram incluídos no grupo de materiais resistentes, totalizando 67 (81%) genótipos, com notas variando de um a 3,67.

Os componentes de variância, assim como a herdabilidade do caráter, são mostrados na Tabela 5. Nas condições do presente trabalho, notou-se elevada herdabilidade desse caráter.

Tabela 5: Componentes de variância e herdabilidade para resistência à ferrugem marrom derivados do painel associativo de cana-de-açúcar.

		Cana-planta	Cana-soca
σ^2_b	Componentes de variância devido aos blocos	0,003	0,002
σ^2_g	Componentes de variância devido aos genótipos	0,225	0,169
σ^2_a	Componentes de variância devido ao ambiente	0,064	0,038
$\sigma^2_p(\sigma^2_b + \sigma^2_g + \sigma^2_a)$	Variância fenotípica	0,292	0,209
$h^2(\sigma_g / \sigma_p)$	Herdabilidade	0,77	0,81

Discussão

O mapeamento associativo é uma estratégia recente para estabelecer associações entre marcadores moleculares e características importantes em plantas (THORNSBERRY et al., 2001; GUPTA et al., 2005). Essa é uma metodologia de destaque, reflexo de suas vantagens, principalmente no que diz respeito à possibilidade de identificar alelos favoráveis em uma população de interesse e elevado nível de polimorfismos (BRESEGHELLO & SORRELLS, 2006b).

O painel de cana-de-açúcar avaliado foi composto por materiais importantes, que são parentais de cultivares recentes ou materiais em desenvolvimento no Programa de Melhoramento Genético Cana/IAC, contrastantes quanto ao conteúdo de fibra e, portanto, com destaque no contexto de bio-energia.

Os materiais analisados neste trabalho exibiram fenótipos em todas as classes de resistência à ferrugem, ou seja, há polimorfismos nas regiões do DNA responsáveis por essa característica, que podem ser correlacionados a marcadores moleculares, explorando a elevada diversidade alélica esperada em um painel associativo, no qual os indivíduos exibem parentescos distintos (YU & BUCKLER, 2006). O potencial em identificar marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem marrom é ainda mais atrativo devido à alta herdabilidade observada desse caráter (MYLES et al., 2009). O elevado valor da herdabilidade também foi relatado por HOGARTH et al. (1993) e RAMDOYAL et al. (2000). Ambos trabalhos afirmam que a resistência à ferrugem possui herdabilidade superior a 70%, sendo que grande parte da variação fenotípica está relacionada à presença de um gene dominante de efeito maior identificado, inicialmente, por DAUGROIS et al. (1996), ao observarem uma segregação de 3:1 para resistência a essa doença em uma progênie de 141 indivíduos derivada da autofecundação da cultivar R570. Uma vez identificado um marcador molecular fortemente ligado a esse gene de efeito maior, ele poderá explicar grande parte da variação fenotípica, o que o torna um excelente guia no processo de seleção assistida por marcadores. Essa é uma estratégia muito valiosa nas etapas de avaliação e seleção dos programas de melhoramento genético, visto que o estabelecimento do fungo é muito afetado por condições ambientais e pelo estágio de desenvolvimento da planta (SORDI et al., 1988; IDO et al., 2006), limitações que os marcadores moleculares não possuem (ALZATE-MARIN et al., 2005; JONES et al., 2009).

A interação entre resistência e fase de desenvolvimento da planta foi notada pela alteração da classificação de genótipos, que no ciclo de cana-planta apresentaram resposta intermediária à ferrugem marrom, mas no primeiro ciclo de cana-soca foram tidos como resistentes. IDO et al. (2006), ao avaliarem clones RB (Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético), também relataram que cana-planta, em relação às soqueiras, é mais suscetível ao ataque do fungo.

Neste trabalho, para minimizar essas ações do ambiente, foi priorizada a metodologia REML/BLUP, que, ao corrigir os valores genotípicos para os demais efeitos fixos do modelo, reduz os efeitos ambientais sobre o desempenho dos genótipos

(RESENDE, 2005) e fornece, portanto, dados mais precisos (RESENDE, 1996). Estes valores serão utilizados no modelo associativo e conferem maior confiabilidade à análise.

Conclusões

O painel associativo, composto por clones IAC e cultivares comerciais, inclui materiais contrastantes para a resistência à ferrugem marrom, com fenótipos variando desde os mais suscetíveis aos mais resistentes à doença.

A resistência a ferrugem marrom, analisada em uma população derivada de diferentes parentescos, é um caráter de elevada herdabilidade.

CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À SEVERIDADE À FERRUGEM MARROM EM PAINEL ASSOCIATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

Resumo - O mapeamento associativo é uma abordagem recente para estabelecer associações entre marcadores moleculares e caracteres de interesse em plantas. Detalhes de diversidade, extensão do desequilíbrio de ligação, LD, e estrutura genética foram investigados em um painel de mapeamento associativo de cana-de-açúcar, constituído por cultivares e clones IAC, visando estabelecer correlações entre marcadores do tipo SSR e AFLP e resistência ou suscetibilidade à ferrugem marrom. No total foram obtidas 1015 marcas polimórficas, sendo o polimorfismo do material elevado, com PIC médio de 0.7 e 0.34 para marcadores SSR e AFLP, respectivamente. Houve evidente redução de LD acima de 40cM, indicando grandes haplótipos no genoma de cultivares de cana-de-açúcar. Foram identificados 3 subgrupos pelas análises filogenética e de coordenadas principais (PCoA) e 2 subgrupos pelo programa STRUCTURE, porém eles não reduziram o número de marcas significativamente associadas. Os marcadores SCC60.8, SCA31.3, M56/E35 e M56/E37 foram correlacionados à suscetibilidade, enquanto SCB14.9 e M56/E33, ligados à resistência à ferrugem marrom. O efeito individual das marcas oscilou entre -0.37 ($R^2 = 0.05$) e 0.24 ($R^2 = 0.08$). Os marcadores moleculares associados à severidade à ferrugem marrom serão validados, visando explorá-los dentro do programa de melhoramento genético para identificar materiais resistentes ou mesmo eliminar alelos desfavoráveis e, assim, acelerar os ganhos genéticos.

Palavras chave: AFLP, estrutura populacional, mapeamento associativo, similaridade genética, SSR

Introdução

A cultura de cana-de-açúcar é um dos principais cultivos mundiais. Ela é responsável por mais de 75% da produção açucareira e está em contínua expansão, motivada, principalmente, pelo estímulo à produção de etanol, uma fonte alternativa de energia (SHING et al., 2011).

Os atuais cultivares de cana-de-açúcar são derivados de hibridações interespecíficas entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, com pequena contribuição de *S. barberi*, *S. robustum* e *S. sinense* (IRVINE, 1999). Essa hibridação foi responsável por um genoma altamente poliplóide, com cerca de 8-14 cópias de cromossomos homó(eo)logos, aneuplóide, com número de cromossomos entre 100-130 (PIPERIDIS et al., 2008). Essas características conferem à cana-de-açúcar um dos mais complexos genomas entre as plantas cultivadas (GRIVET & ARRUDA, 2002), restringindo a identificação de locos responsáveis pelo controle de características complexas de interesse agrônômico (OLIVEIRA et al., 2009).

Atualmente, a associação entre estrutura genética e caracteres fenotípicos é estabelecida por meio de mapeamento de ligação e de mapeamento associativo. Ambos os métodos exploram o processo de recombinação genética, entre o marcador molecular e o loco que controla o caráter, mas se diferenciam na identificação de quando essas recombinações ocorreram (MYLES et al., 2009). Os mapeamentos de ligação são baseados em populações experimentalmente construídas a partir de um cruzamento bi-parental. Dessa forma, somente os eventos de recombinação que ocorreram durante o estabelecimento dessa população são analisados. Como o número de recombinações é reduzido, o genoma é pouco fragmentado e o loco de interesse é localizado em uma área extensa do cromossomo, 10 a 20 centimorgans, cM, ou seja, a resolução das análises é reduzida (ZHU et al., 2008). No mapeamento associativo, são explorados todos os eventos de recombinação, que ocorrem ao longo de sucessivas gerações, que constituem a história de cada indivíduo da análise de associação (GUPTA et al., 2005). Neste sistema, uma vez que o potencial de recombinação é muito elevado, espera-se que somente marcadores fortemente ligados ao loco permaneçam

associados ao caráter de interesse. Por isso, a resolução dos mapas associativos é superior aos de ligação (GUPTA et al., 2005; ZHU et al., 2008).

Além disso, a possibilidade de analisar uma população, na qual os indivíduos exibem parentescos distintos, permite ao mapeamento associativo avaliar uma população de interesse, um germoplasma elite, por exemplo; sendo que as correlações genótipo-fenótipo se estendem a todos os indivíduos. Nas análises de ligação, por outro lado, os resultados são específicos para o cruzamento. Dessa forma, pode-se concluir que as informações geradas pelo mapeamento associativo são assimiladas mais rapidamente pelos programas de melhoramento (BRESEGHELLO & SORRELS, 2006a; ZHU et al., 2008).

As análises de associação estão diretamente relacionadas à extensão do desequilíbrio de ligação, LD, uma associação não aleatória de alelos/marcadores de diferentes locos, ou seja, uma correlação de alelos em uma população (FLINT-GARCIA et al., 2003). Os valores de LD dependem do nível e distribuição da diversidade genética dos indivíduos envolvidos no estudo, assim como, da quantidade de eventos de recombinação que ocorreram ao longo da história evolutiva de cada um deles (COMADRAN et al., 2009).

O desequilíbrio de ligação tem sido documentado em diversas espécies cultivadas, tais como, milho, cevada, arroz, trigo (REMINGTON et al., 2001; KRAAKMAN et al., 2004; IWATA et al., 2007; HORVATH et al., 2009). Para a cana-de-açúcar, tem sido confirmada a existência de um elevado nível de LD (JANNOO et al., 1999; RABOIN et al., 2008), o qual está relacionado ao reduzido número de gerações, entre cinco e sete, que separa as cultivares modernas dos clones fundadores de cana-de-açúcar.

A maior desvantagem do método de mapeamento associativo é a elevada probabilidade de erros tipo I, devido, principalmente, à presença de estrutura genética na população, uma vez que frequências alélicas distintas entre subgrupos podem conduzir a associações falsas (FLINT-GARCIA et al., 2003; CARPIO et al., 2011). Por isso, a presença de subgrupos na amostra deve ser investigada e seu efeito, incluído no

modelo de análise para minimizar erros ao estimar os efeitos dos alelos sobre o fenótipo (BRESEGHELLO & SORRELS, 2006a).

O objetivo do trabalho foi: (1) avaliar a diversidade e o grau de estrutura genética dentro de um painel associativo de cana-de-açúcar, constituído por cultivares e clones IAC; (2) investigar os padrões de LD em cultivares de cana-de-açúcar; (3) identificar, por meio da abordagem de mapeamento associativo, marcadores moleculares correlacionados à resistência à ferrugem marrom, doença disseminada em quase todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar (ASNAGHI et al., 2004), que pode provocar perdas de produtividade superiores a 50% em cultivares suscetíveis (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006).

Material e Métodos

Material vegetal

Foram amostrados 83 genótipos de cana-de-açúcar, incluindo cultivares comerciais e clones IAC em fase avançada de seleção do Programa de Melhoramento Cana/IAC. (Tabela 1).

Tabela 1: Genótipos de cana-de-açúcar utilizados neste estudo, com seus respectivos genitores.

Genótipo¹	Genitores Feminino x Masculino²	Genótipo¹	Genitores Feminino x Masculino²
<i>CTC9(V)</i>	<i>SP83-1483x?</i>	<i>IACSP97-3331(C)</i>	<i>RB835486xRB835486</i>
<i>IAC52-150(V)</i>	<i>CO419xCO285</i>	<i>IACSP97-3384(C)</i>	<i>RB855113xRB855453</i>
<i>IAC86-2210(V)</i>	<i>CP5248xCO798</i>	<i>IACSP97-3391(C)</i>	<i>SP85-1625xSP77-5181</i>
<i>IAC86-2480(V)</i>	<i>US71399x?</i>	<i>IACSP97-3406(C)</i>	<i>SP84-2066xIAC86-3154</i>
<i>IAC87-3396(V)</i>	<i>CO740xSP70-1143</i>	<i>IACSP97-4039(C)</i>	<i>RB835486xRB855453</i>

Tabela 1: continuação

Genótipo¹	Genitores FemininoxMasculino²	Genótipo¹	Genitores FemininoxMasculino²
IAC91-1099(V)	RB785148x?	IACSP97-6682(C)	SP84-2066xSP84-7017
IAC91-2195(V)	RB785148x?	IACSP97-7018(C)	SP79-2233xSP84-1192
IAC91-2218(V)	RB855035x?	IACSP97-7065(C)	SP84-2066xIAC86-3154
IACSP02-2074(C)	-	IACSP97-7074(C)	SP84-7017xIAC86-2210
IACSP93-2060(V)	RB765418x?	IACSP97-7077(C)	SP80-1816xISC86-2210
IACSP93-3046(V)	SP79-1011x?	IACSP97-7543(C)	SP80-185xSP82-3530
IACSP93-6006(V)	SP79-1011x?	IACSP98-2030(C)	SP91-1483xCTC88-13
IACSP94-2094(V)	SP84-7017x?	IACSP98-2053(C)	SP84-7017xSO80-1842
IACSP94-2101(V)	SP77-5181xRB785148	IACSP98-3020(C)	SP84-2066xSP80-4445
IACSP94-4004(V)	SP82-6108xSP77-5181	IACSP98-3021(C)	SP81-6115xSP80-3280
IACSP95-1218(V)	SP80-3280xRB835486	IACSP98-3099(C)	SP81-3251xRB785750
IACSP95-2078(C)	SP80-185x?	IACSP98-5010(C)	F174xSP80-185
IACSP95-3028(V)	SP80-3280xRB835486	IACSP98-5046(C)	SP81-3251xSP82-3697
IACSP95-5000(V)	SP84-2060xSP80-185	IACSP98-6202(C)	SP81-3251xIAC91-3111
IACSP95-5094(V)	SP80-3280x?	IACSP98-7043(C)	IAC91-3093xSP82-3530
IACSP96-1005(C)	SP83-2210xSP80-3280	IACSP99-1305(C)	F175xSP87-432
IACSP96-1066(C)	SP80-1842xIAC85-3229	IACSP99-1308(C)	SP85-1682xSP80-185
IACSP96-2008(C)	SP80-144x?	IACSP99-3009(C)	CP70-1133xSP83-2847
IACSP96-2019(C)	SP81-3251xSP84-1192	IACSP99-3085(C)	RB855036xSP80-3280
IACSP96-2042(V)	SP81-5193xSP77-5181	IACSP99-4007(C)	SP80-3420xSP87-365
IACSP96-3048(C)	SP84-2025xSP84-7017	IACSP99-4008(C)	SP80-3420xSP87-365
IACSP96-3056(C)	SP82-6108x?	IACSP99-4010(C)	CTC9688xSP87-365
IACSP96-3060(V)	SP82-6108x?	IACSP99-4011(C)	SP84-2025xRB855113
IACSP96-3076(C)	SP84-7017x?	IACSP99-4013(C)	SP84-2025xRB855113
IACSP96-7506(C)	SP87-5019xIAC83-1313	POJ2878(V)	POJ2364xEK28
IACSP96-7569(C)	SP84-1192xSP80-3280	R570(V)	H393633xM20246
IACSP96-7586(C)	SP84-7017x?	RB72454(V)	CP5376x?

Tabela 1: continuação

Genótipo¹	Genitores FemininoxMasculino²	Genótipo¹	Genitores FemininoxMasculino²
<i>IACSP97-2000(C)</i>	<i>SP80-185xSP82-3530</i>	<i>RB835486(V)</i>	<i>L6014x?</i>
<i>IACSP97-2020(C)</i>	<i>SP84-7017xIAC86-2210</i>	<i>RB855156(V)</i>	<i>RB72454xTUC717</i>
<i>IACSP97-2023(C)</i>	<i>CTC9662xSP88-607</i>	<i>RB855536(V)</i>	<i>SP70-1143xRB72454</i>
<i>IACSP97-2028(C)</i>	<i>SP84-2066xSP84-1192</i>	<i>RB867515(V)</i>	<i>RB72454x?</i>
<i>IACSP97-2053(C)</i>	<i>SP84-2066xIAC86-3154</i>	<i>RB925211(V)</i>	<i>RB855206x?</i>
<i>IACSP97-2055(C)</i>	<i>SP84-2066xIAC86-3154</i>	<i>SP70-1143(V)</i>	<i>IAC48-65x?</i>
<i>IACSP97-2084(C)</i>	<i>RB855035xSP80-185</i>	<i>SP79-1011(V)</i>	<i>NA5679xCO775</i>
<i>IACSP97-2098(C)</i>	<i>SP80-185xSP77-5181</i>	<i>SP80-3280(V)</i>	<i>SP71-1088xH575028</i>
<i>IACSP97-2109(C)</i>	<i>SP80-185xSP82-3530</i>	<i>SP86-42(V)</i>	<i>SP70-1143x?</i>
<i>IACSP97-3313(C)</i>	<i>SP77-5181xRB835486</i>		

¹ C clone IAC; V cultivar comercial.

² ?, genótipo proveniente de um policruzamento, no qual o genitor masculino é desconhecido.

Avaliação fenotípica

Os dados fenotípicos, referentes à severidade à ferrugem marrom, foram obtidos previamente a partir de experimento conduzido em campo, no período de 2010 a 2012, em área do Centro de Cana, em Ribeirão Preto, SP (Brasil lat: 21°12'S, long: 47°52' O) (GONÇALVES et al., dados não publicados). O experimento foi montado em delineamento de blocos completos casualizados, DBC, com três repetições. Sob condições de infecção natural, os genótipos foram avaliados durante o ciclo de cana-planta e cana-soca, sendo os dados submetidos à análise estatística no programa SAS (SAS, 2008). Foi utilizado o procedimento PROC MIXED, considerando blocos como efeito fixo e genótipos e anos como efeitos aleatórios para obter a predição dos valores genotípicos em relação à média geral, os BLUPs (*Best Linear Unbiased Predictors*). Essa metodologia, ao corrigir os valores genotípicos para os demais efeitos fixos do modelo, reduz os efeitos ambientais sobre o desempenho dos genótipos e fornece, portanto, dados mais precisos (RESENDE et al., 1996) para o modelo associativo.

Extração e quantificação de DNA

A partir de folhas de cada um dos materiais, o DNA total foi extraído de acordo com a metodologia proposta por AL-JANABI et al. (1999).

A concentração de DNA, assim como sua qualidade, foi estimada, visualmente, tendo como referência padrões de concentrações conhecidas de DNA do fago λ , em gel de agarose 0.8% (p.v⁻¹), corado com brometo de etídio.

Marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*)

Foram utilizados 79 pares de *primers* SSR para caracterizar cada material (Tabela 2). Desse total, 16, com iniciais SMC e Cir, foram desenvolvidos a partir bibliotecas genômicas (gSSR) (CORDEIRO et al., 1999; CORDEIRO et al., 2000) e 63, SCA, SCB, SCC e CV, a partir do banco de seqüências expressas do SUCEST (EST-SSR) (PINTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; JORDÃO JR., 2009).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 15 μ l contendo 30ng do DNA molde, 0.2 μ M de cada par de *primer*, *forward* e *reverse*, 100 μ M de cada dNTP, 2.0mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, e 0.5 U de Taq DNA polimerase.

As condições de amplificação para os pares de *primers* SMC e Cir foram definidas pelo ICSB, *International Consortium for Sugarcane Biotechnology*, e pelo CIRAD, *Centre de Cooperation Internationale em Recherché Agronomique pour le Développement*, como descrito por GARCIA et al. (2006). Para o *primer* CV e para os demais EST-SSR, o programa de amplificação foi realizado de acordo com JORDÃO JR. (2009) e PINTO et al. (2004), respectivamente.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante 5%, utilizando *ladder* de 10 pb como marcador de peso molecular. As bandas foram reveladas pela coloração com nitrato de prata de acordo com protocolo estabelecido por CRESTE et al. (2001).

A fim de automatizar o processo de eletroforese, também foram utilizados *primers* marcados com fluoróforos, que permitiram a detecção dos produtos de PCR por sistemas a laser. Neste caso, à extremidade 5' do *primer forward* foi adicionada a sequência M13 como descrito por SCHUELKE (2000). Essa "cauda M13" hibridiza-se a outro *primer*, dito universal, o qual foi marcador com IRDye700 ou IRDye800 e tem função de *forward* na reação de PCR, após a incorporação da sequência M13 aos produtos de PCR, nos primeiros ciclos. Nesse protocolo, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 15µl contendo 25ng do DNA molde, 5.3pM do *primer forward* com cauda M13, 20pM do *primer* universal M13, 20pM do *primer reverse*, 100µM de cada dNTP, 2.0mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, e 0.5U de Taq DNA polimerase.

As condições de amplificação foram: 94°C (5min); 30 ciclos de 94°C (30s)/ 55°C (45s)/ 72°C (45s); 8 ciclos de 94°C (30s)/ 53°C (45s)/ 72°C (45s) e um ciclo final de extensão a 72°C por 10min. Esse protocolo foi utilizado para os pares de *primer* SCA26, SCA31 e SCB40.

A marcação com infravermelho permitiu a identificação dos fragmentos pelo aparelho *4300 DNA Analyser* (LiCor Biosciences), onde foi realizada a eletroforese, de acordo com as recomendações do fabricante.

Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Para marcadores AFLP, 300ng de DNA genômico foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *MseI*, sendo os fragmentos ligados a adaptadores, como exposto por VOS et al. (1995). Os produtos dessa digestão foram diluídos 6x em água ultrapura e submetidos à pré-amplificação com *primers* complementares aos adaptadores de *EcoRI* e *MseI*, os quais não continham nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. As reações de pré-amplificação foram realizadas em volume final de 15µl contendo 2µl da diluição 6x, 3.33µM de cada par de *primer*, 167µM de cada dNTP, 2.0mM MgCl₂, 10mM Tris-

HCl, 50mM KCl, e 1U de Taq DNA polimerase. O programa de pré-amplificação incluiu 29 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 1min e 72°C por 1min.

Os produtos dessa reação foram diluídos 10x em água ultrapura e submetidos à amplificação seletiva com *primer* seletivo para três nucleotídeos. Foram utilizadas 20 combinações de *primers* *EcoRI/MseI* (Tabela 3), sendo que os *primers* *EcoRI* foram marcados com os fluoróforos IRDye700 ou IRDye800. As reações com IRDye700 foram realizadas em um volume final de 10µl contendo 2µl da pré-amplificação diluída 10x, 0.05µM do *primer* marcado e 0.25µM do *primer* não marcado, 267.5µM de cada dNTP, 2.0mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, e 0.5U de Taq DNA polimerase. Para reações com IRDye800, foram mantidas essas condições, com exceção do *primer* marcado, que foi elevado para 0.07µM. O programa de amplificação para a reação seletiva seguiu as condições propostas por VOS et al. (1995).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese no aparelho 4300 DNA Analyser (LiCor Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise de dados

Avaliação do polimorfismo

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada SSR foi calculado segundo CORDEIRO et al. (2003), de acordo com a expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

em que p_i é a frequência do i -ésimo padrão para o marcador SSR e p_j é a frequência do j -ésimo ($i + 1$) padrão. Para marcadores AFLP, devido à natureza dominante desse marcador, o valor de PIC foi calculado de acordo com a expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Neste caso, os valores mínimo e máximo de PIC são 0 e 0.5, respectivamente.

Devido à poliplodia da cana-de-açúcar e a impossibilidade de determinar a dosagem de cada alelo, para as demais análises, todas as bandas geradas foram consideradas como marcadores dominantes, de modo que, cada indivíduo foi caracterizado de acordo com a presença (1) ou ausência (0) do marcador.

Avaliação do desequilíbrio de ligação

Para estimar o desequilíbrio de ligação, LD, foram utilizados os marcadores apresentados no mapa único de ligação derivado da população de mapeamento obtida entre o clone IACSP95-3018 e a cultivar IACSP93-3046 (MANCINI et al., comunicação pessoal), dois materiais desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas.

LD foi obtido em função da associação entre cada par de marcadores do mesmo cromossomo, calculado a partir do Teste Exato de Fisher (RABOIN et al., 2008). A extensão do LD foi analisada pela dispersão da distância (cM) entre esses pares de marcadores pelo logaritmo negativo de cada *P-value*. Foi utilizada correção de Bonferroni, dividindo o limite de confiança $\alpha=0.05$ (erro do tipo I) pelo número de comparações realizadas, a fim de evitar associações entre marcadores devido à epistasia e outras interações de genes não ligados ao mesmo haplótipo.

Avaliação da estrutura genética

A estrutura genética da população foi examinada por três metodologias diferentes: análise filogenética, análise de coordenadas principais (PCoA) e modelo de agrupamento baseado na estatística bayesiana.

A análise filogenética foi construída a partir de uma matriz de similaridade (j), baseada no coeficiente de Jaccard, o qual é considerado mais indicado para comparar populações dentro da mesma espécie (DIAS, 1998). Essa matriz de similaridade foi convertida em matriz de dissimilaridade ($d=1-j$), a qual foi utilizada na construção de um dendrograma pelo método *Neighbour-Joining*, NJ (Saitou & Nei, 1987; Gascuel, 1997). A consistência da topologia foi obtida pelo método de *bootstrap* com 1000 repetições. Para avaliar o método de agrupamento, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética, que mede o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de dissimilaridade original (DIAS, 1998). Todas as análises foram realizadas no programa DARWIN (PERRIER & JACQUEMOUND-COLLET, 2006), utilizando todos os marcadores gerados.

A partir da matriz de dissimilaridade (d) também foi realizada a análise de PCoA, Análise de Coordenadas Principais. Essa análise também foi realizada no programa DARWIN (PERRIER & JACQUEMOUND-COLLET, 2006), o qual exige uma matriz de distâncias Euclidianas (d'), obtida pela transformação: $d' = d^p$, em que p é o índice Euclidiano.

O modelo de agrupamento bayesiano foi realizado no programa STRUCTURE versão 2.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003, 2007; HUBISZ et al., 2009). Foi realizada uma seleção prévia entre os marcadores para evitar aqueles com forte ligação entre si, como recomendado por FALUSH et al. (2003). Para SSR, apenas marcadores previamente mapeados (GARCIA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; MANCINI et al., 2011, comunicação pessoal) e localizados em grupos de ligação distintos foram escolhidos. Dentre estes, apenas o alelo mais frequente de cada loco foi selecionado, como proposto por CARPIO et al. (2011). Essa análise utilizou 36 marcadores SSR. Para AFLP, foram utilizados apenas os marcadores com frequência maior que 5% e menor que 95%, o que representou 427 marcas. Como configurações, os genótipos foram considerados haplóides e nenhuma informação prévia sobre a

origem dos cultivares foi inserida. Foram escolhidos o modelo *admixture*, no qual cada indivíduo pode ter ancestrais em mais de uma população, e a opção de frequências alélicas correlacionadas entre populações, uma vez que há uma ancestralidade comum para muitos dos genótipos amostrados. Inicialmente, avaliou-se a hipótese de K, número de subgrupos, variando de 1 a 10. Para cada K, o agrupamento mais provável foi obtido a partir de 200000 interações MCMC, *Monte Carlo Markov Chain*, após um período de 100000 interações iniciais (período de *burnin*). Para verificar a consistência dos resultados, o programa foi executado 10 vezes para cada hipótese de K. Os resultados de todas as corridas foram transferidos para o programa STRUCTURE HARVESTER v. 0.6.92 (EARL, 2011), o qual determinou o número mais provável K, de acordo com EVANNO et al. (2005).

Análise de associação

A associação entre polimorfismo genético e variação fenotípica foi realizada no programa SAS (SAS, 2008), de acordo com a metodologia de regressão múltipla *stepwise*, segundo o modelo:

$$y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n + e$$

em que y representa os BLUPs, referente às observações fenotípicas; a , o intercepto da equação; x corresponde aos n marcadores moleculares; b_1 a b_p são coeficientes de regressão, que especificam a relação entre y e x ; e é o vetor de efeitos residuais. Foram incluídos, na análise, apenas marcadores com frequência alélica maior que 5% e menor que 95%, o que representou 922 marcas, sendo 427 do tipo AFLP e 495 do tipo SSR. Para manter graus de liberdade na variável *resíduo*, o modelo foi aplicado a grupos de até 50 marcadores e aqueles relacionados a y , a nível de significância $\alpha=0.05$, foram submetidos a outra rodada *stepwise*. Após quatro rodadas *stepwise*, determinou-se, por meio de regressão linear, o efeito em conjunto e isolado das marcas selecionadas sobre o fenótipo.

Para avaliar a contribuição dos efeitos de estrutura da população, foi testada a interação entre os marcadores significativamente associados e os subgrupos detectados pelo programa STRUCTURE e pelo dendrograma, de acordo com a expressão:

$$y = \text{subgrupo} + x + \text{subgrupo} * x + e$$

A ausência de interação marcador*grupo significativa ($P < 0.05$) indicaria que os efeitos dos marcadores eram independentes da base genética dos indivíduos, enquanto a presença dessa interação recomendaria a observação da correlação, fenótipo e genótipo, dentro do subgrupo (SHARMA, 2009).

Resultados

Diversidade genética

Os 79 *primers* SSR detectaram um total de 550 alelos polimórficos. O número de alelos por SSR variou de 1 (SCB303) a 19 (CV38), com média de 7 alelos por SSR. O valor de PIC variou de 0.30 (SCC47) a 0.93 (CV38), com um valor médio de 0.70 (Tabela 2).

Para AFLP, as 20 combinações seletivas geraram 465 fragmentos polimórficos. O número de fragmentos por combinação variou de 12 (M60/E33) a 36 (M48/E33), com uma média de 23. O valor de PIC deste marcador variou de 0.27 (M58/E35) a 0.42 (M47/E37), com uma média de 0.34 (Tabela 3).

Ambos marcadores produziram, portanto, 1.015 marcas polimórficas, sendo que suas frequências na população foram distribuídas entre 1.3 a 98.8%, com uma média de 45.6%.

Tabela 2: Detalhes dos 79 SSR polimórficos. Total de alelos polimórficos, faixa de tamanho (pb) dos alelos e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada SSR.

SSR	nº de alelos	bp	PIC	SSR	nº de alelos	bp	PIC
Cir1 ¹	9	128-182	0.83	SCB222*	4	247-271	0.58
Cir4 ¹	7	237-247	0.78	SCB225*	7	204-231	0.79
Cir12 ¹	12	241-284	0.88	SCB227*	7	197-219	0.75
Cir14 ¹	9	203-232	0.83	SCB228*	4	203-212	0.65
Cir23 ¹	8	236-278	0.80	SCB246*	4	156-195	0.53
Cir51 ¹	6	231-262	0.69	SCB248*	12	270-355	0.87
Cir56 ¹	9	128-161	0.82	SCB252*	3	194-200	0.53
Cir74 ¹	5	207-229	0.70	SCB256*	3	210-238	0.44
CV38 ²	19	97-203	0.93	SCB259*	6	226-264	0.77
SMC1047HA ³	12	115-146	0.88	SCB262*	5	255-270	0.64
SMC119CG ³	7	102-130	0.82	SCB285*	15	114-193	0.90
SMC2017FL ³	10	200-246	0.85	SCB292*	2	161-165	0.37
SMC2039FL ³	11	249-287	0.85	SCB297*	5	180-195	0.75
SMC236CG ³	11	141-249	0.86	SCB303*	1	197	-
SMC31CUQ ³	11	135-176	0.83	SCB307*	5	193-208	0.70
SMC448MS ³	4	180-199	0.66	SCB309*	8	161-213	0.79
SMC477CG ³	2	133-134	0.38	SCB310*	5	204-214	0.70
SCA26 ⁴	5	180-203	0.74	SCB312*	13	194-273	0.87
SCA31 ⁴	6	206-225	0.76	SCB381*	13	192-252	0.86
SCA48 ⁴	11	231-289	0.80	SCB423*	8	208-266	0.82
SCA53 ⁴	12	170-215	0.88	SCB436*	9	182-229	0.82
SCB06 ⁵	5	152-174	0.70	SCC01 ⁵	15	245-293	0.90
SCB07 ⁵	14	207-297	0.91	SCC05 ⁵	10	139-191	0.80
SCB14 ⁴	8	274-301	0.85	SCC19 ⁴	8	229-271	0.79
SCB27 ⁴	6	212-200	0.73	SCC22 ⁴	5	160-198	0.65
SCB40 ⁴	4	150-170	0.62	SCC24 ⁴	4	162-172	0.51
SCB43 ⁴	3	598-613	0.52	SCC25 ⁴	4	252-277	0.58
SCB45 ⁴	10	70-132	0.84	SCC26 ⁴	2	163-179	0.37
SCB82 ⁴	5	244-263	0.73	SCC33 ⁴	4	120-138	0.55
SCB130 ⁴	9	110-144	0.81	SCC36 ⁴	6	220-237	0.75
SCB174*	7	192-212	0.80	SCC44 ⁴	2	180-191	0.34
SCB181*	9	153-184	0.84	SCC47 ⁴	2	154-158	0.30

Tabela 2: continuação

SSR	nº de alelos	bp	PIC	SSR	nº de alelos	bp	PIC
SCB188*	3	181-205	0.53	SCC50 ⁴	3	212-218	0.58
SCB189*	9	-	0.84	SCC60 ⁴	9	154-175	0.81
SCB191*	5	206-222	0.71	SCC67 ⁴	5	305-332	0.62
SCB194*	4	175-187	0.62	SCC77 ⁴	7	161-179	0.75
SCB210*	5	162-201	0.53	SCC81 ⁴	2	146-149	0.32
SCB213*	10	287-322	0.84	SCC84 ⁴	5	229-243	0.46
SCB218*	3	294-309	0.58	SCC91 ⁴	2	232-248	0.32
SCB219*	11	160-225	0.81				
Total de alelos: 550			Nº médio de alelos: 7	Nº médio de PIC: 0.70			

Sequência de pares de *primer* e condições de hibridização estabelecidas por: ¹ CORDEIRO et al. (2000). ² JORDÃO JR. (2009). ³ CORDEIRO et al. (1999). ⁴ OLIVEIRA et al. (2009). ⁵ PINTO et al. (2004).
*Comunicação pessoal A. P. de Souza (anete@unicamp.br).

Tabela 3: Detalhes das 20 combinações de AFLP polimórficas. Total de fragmentos polimórficos, faixa de tamanho (pb) dos fragmentos e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada combinação de AFLP.

Combinação AFLP (MseI/EcoRI)	nº de bandas	pb	PIC	Combinação AFLP (MseI/EcoRI)	nº de bandas	pb	PIC
M48/E33	36	127-578	0.32	M56/E40	22	140-425	0.32
M56/E35	34	40-600	0.39	M56/E37	22	76-574	0.35
M60/E37	33	56-515	0.35	M56/E36	20	170-510	0.35
M58/E40	30	120-500	0.31	M48/E37	20	106-305	0.31
M47/E37	29	65-683	0.42	M58/E37	20	95-552	0.36
M58/E33	26	95-395	0.35	M56/E33	19	52-235	0.32
M58/E38	25	120-620	0.32	M59/E37	16	41-136	0.39
M58/E32	24	150-460	0.37	M62/E37	16	192-292	0.37
M56/E41	23	130-640	0.31	M58/E35	15	167-460	0.27
M58/E39	23	110-630	0.29	M60/E33	12	76-307	0.38
Total de fragmentos: 465	Nº médio de fragmentos: 23			Valor médio de PIC: 0.34			

A similaridade genética (SG), baseada no coeficiente de *Jaccard*, para cada par de genótipos variou de 0.38, entre IACSP97-6682 e RB925211; a 0.64, entre IACSP97-2020 e IACSP97-7074, que são irmãos completos. A SG média da população analisada foi 0.47.

Desequilíbrio de ligação

Foram realizados 999 testes exatos de Fisher, correspondendo a todas as comparações 2 x 2 dos marcadores moleculares do mapa integrado de ligação IACSP95-3018 x IACSP93-3046. O gráfico de dispersão da associação entre dois marcadores em função da distância entre eles permitiu visualizar rápido decaimento de ligação entre marcadores acima de distâncias de 40cM (Figura 1).

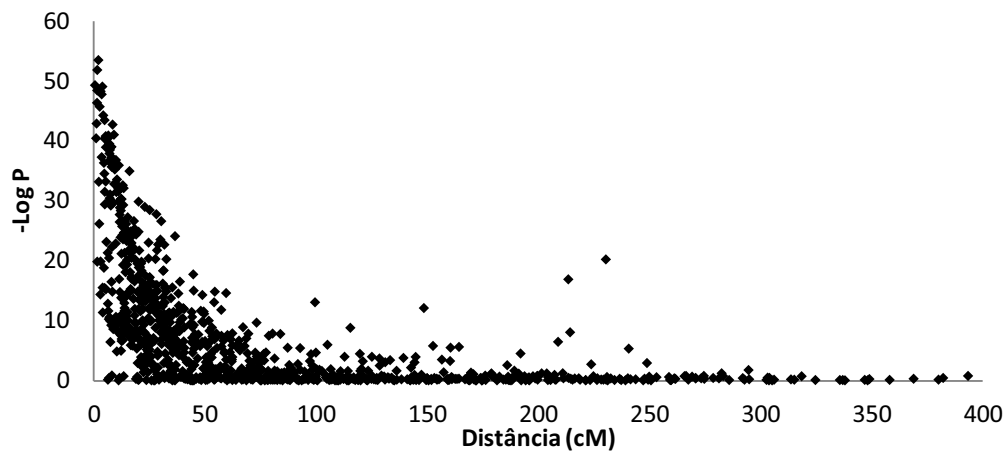


Figura1: LD como função da distância genética em centimorgan (cM). LD foi medida como logaritmo negativo de p -value do Teste Exato de Fisher. Foram inseridas 999 associações par a par de marcadores SSR e AFLP.

Após correção de Bonferroni, com $\alpha=5.10^{-5}$ para cada teste e nível de significância conjunta $\alpha=0.05$, foram obtidas 478 associações significativas (Tabela 4), das quais 391 (82%) não ultrapassaram a distância de 40cM entre os pares de marcadores.

Tabela 4: Número de pares de marcadores, associados significativamente pelo teste Exato de Fisher de acordo com a distância entre os marcadores. A correção de Bonferroni determinou limite de significância de $\alpha=5.10^{-5}$.

	Distância (cM) de marcadores associados (2x2)						Total
	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50	
Nº associação (2x2)	83	137	101	70	26	61	478
%	0.17	0.29	0.21	0.15	0.05	0.13	1.00

Análise de estrutura genética

O dendrograma obtido pelo método *NJ* apresentou um bom ajuste em relação à matriz de dissimilaridade, uma vez que o coeficiente de correlação cofenética foi 0.88. O dendrograma permitiu identificar visualmente três subgrupos (Figura 2).

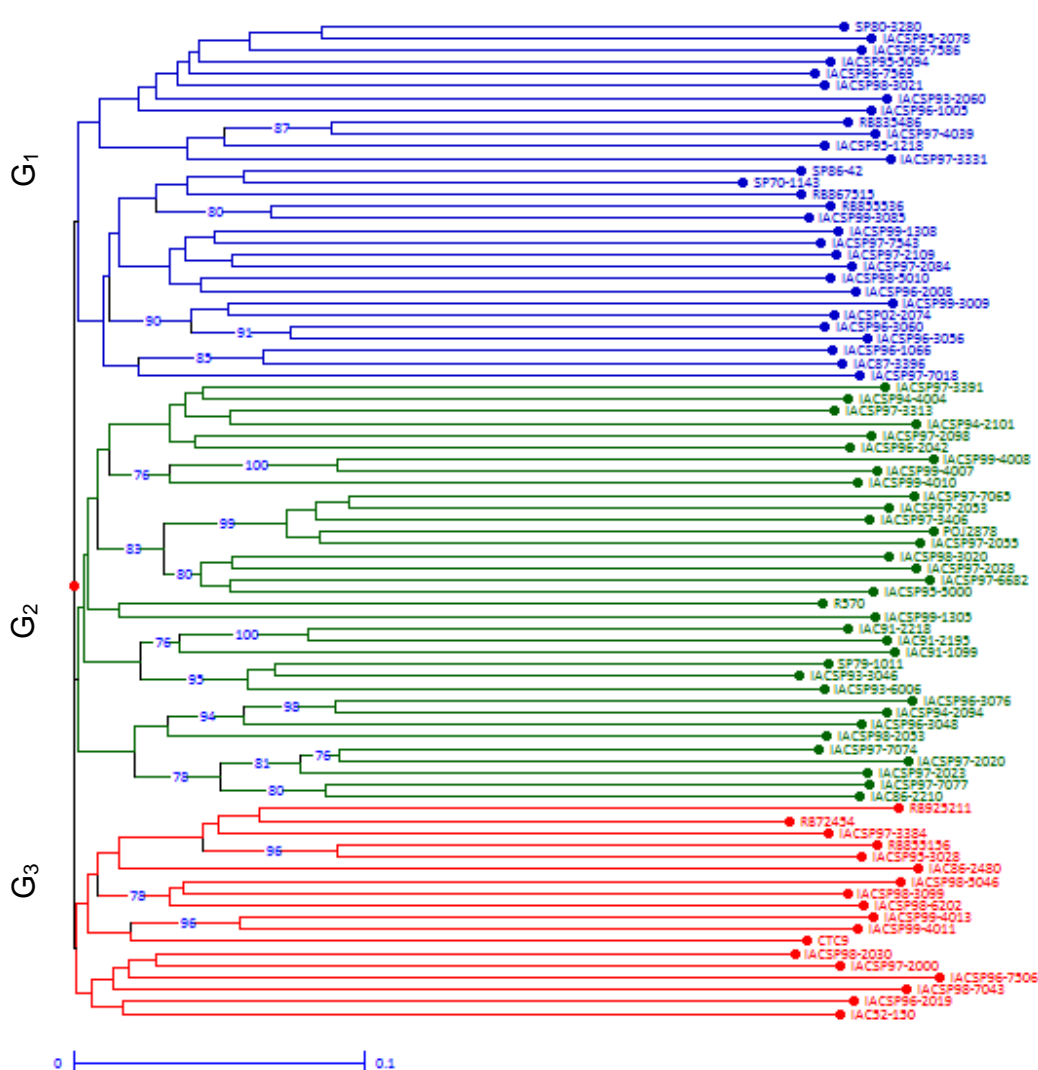


Figura 2: Agrupamento de 83 genótipos de cana-de-açúcar baseado na matriz de dissimilaridade $(1-j)$, obtida a partir do coeficiente de similaridade de *Jaccard* (j). O método *neighbour-joining*, *NJ*, foi utilizado para estabelecer o dendrograma.

De acordo com os dados genealógicos do programa Caiana do IAC, os grupos formados apresentam diversos indivíduos que são meios-irmãos ou irmãos completos. No grupo 1, por exemplo, as cultivares IACSP95-5094, IACSP96-7569, IACSP98-3021, IACSP96-1005 e IACSP95-1218, IACSP99-3085 são meias-irmãs e foram agrupados juntamente com sua genitora feminina, SP80-3280. Da mesma forma, a cultivar RB835486 foi alocada junto a suas progênes IACS97-4039, IACSP95-1218 e IACSP97-3331. A cultivar SP70-1143 também está nesse grupo, assim como suas progênes SP86-42, RB855536 e IAC87-3396. Ainda são meias-irmãs IACSP96-3060 e IACSP96-3056, assim como IACSP99-1308, IACSP97-2084 e IACSP98-5010, IACSP97-7543, IACSP97-2109, sendo estas duas últimas, irmãs completas. No grupo 2, a cultivar SP79-1011 apareceu mais relacionada a suas progênes, IACS93-3046 e IACSP93-6006, assim como a cultivar IAC86-2210, a suas progênes IACSP97-7077, IACSP97-2020 e IACSP97-7074. Estas duas últimas cultivares também compartilham a genitora SP84-7017, a qual também é genitora de IACSP98-2053, IACSP96-3048, IACSP94-2094, IACSP96-3076 e IACSP 97-6682. Também estão reunidas as meias-irmãs IACSP997-3391, IACSP94-4004, IACSP97-3313, IACSP94-2101, IACSP97-2098 e IACSP96-2042; IAC91-2195 e IAC91-1099; e IACSP97-2028 e IACSP97-6682, que tem como genitoras SP77-5181; RB785148 e SP84-2066, respectivamente. Nesse grupo, são irmãs completas IACSP99-4008 e IACSP99-4007, derivadas de SP80-3420 e SP87-365, e IACSP97-7065, IACSP97-2053, IACSP97-3406 e IACSP97-2055, originadas do cruzamento entre IAC86-3154 e SP84-2066. Esta última também é genitora das cultivares IACSP97-2028 e IACSP84-2066. No grupo 3, estão reunidas as meias-irmãs IACSP98-3099 e IACSP98-6202; e IACSP97-2000 e IACSP98-7043, provenientes das cultivares SP81-3251 e SP82-3530, respectivamente. As cultivares IACSP99-4013 e IACSP99-4011 são irmãs completas, derivadas do cruzamento entre SP84-2025 e RB855113. Nesse grupo ainda estão reunidas RB855156 e sua genitora RB72454. Dentro de cada grupo, os valores de similaridade genética foram $SG_1=0.49$, $SG_2=0.47$ e $SG_3=0.48$.

As análises de coordenadas principais (PCoA) também contribuíram para elucidar os subgrupos existentes na população (Figura 3). Nessa representação, as

cultivares foram identificadas com cores diferentes de acordo com o agrupamento do dendrograma ($K=3$), o que demonstrou correspondência entre as duas análises, com maior diferenciação entre o grupo 1 e o grupo 2. Os resultados da análise de PCoA mostraram que os dois primeiros eixos explicaram 5.71% e 4.85% da variabilidade existente na população, respectivamente, e mesmo os cinco primeiros eixos identificaram apenas 23.18% da diversidade.

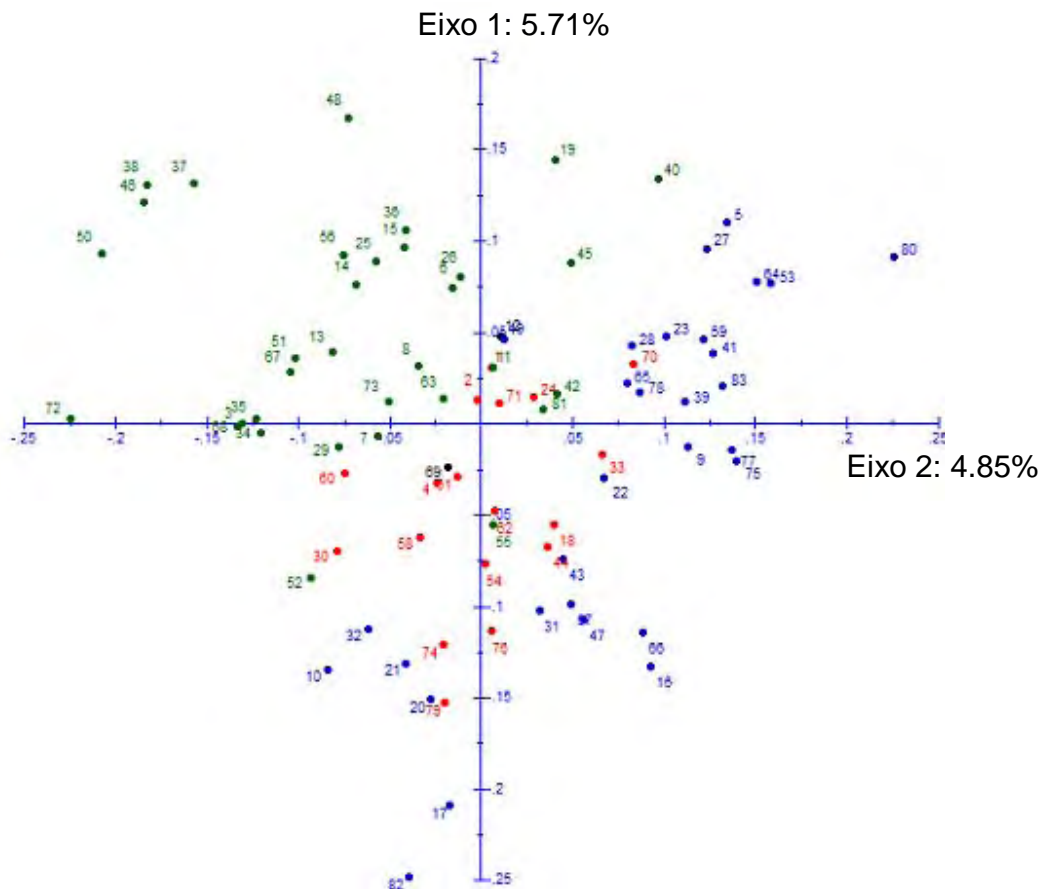


Figura 3: Agrupamento de 83 genótipos de cana-de-açúcar pelo método de PCoA. São exibidos os dois primeiros eixos, que explicaram 10.56% da variabilidade existente na população avaliada.

Os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE mostraram a existência de 2 subgrupos na população, ($K=2$), valor de K no qual “Delta K ” é máximo (Figura 4).

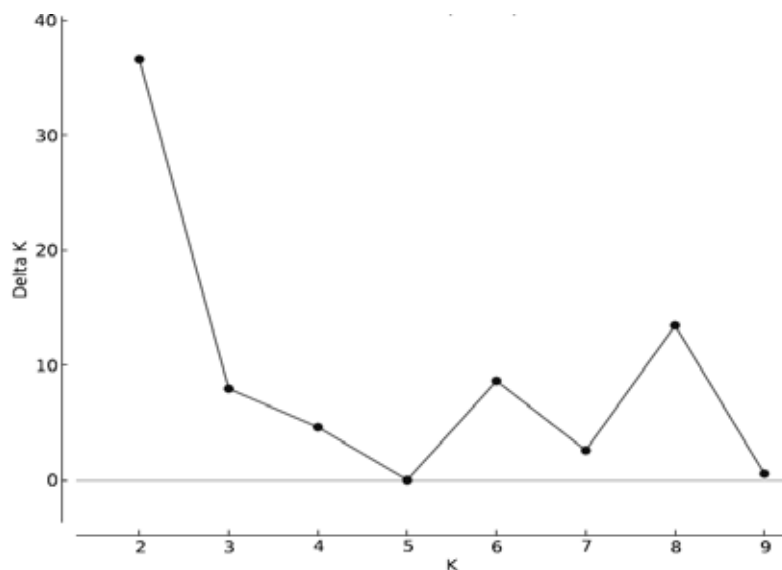


Figura 4: Número de subgrupos no painel de mapeamento associativo. O maior valor de “Delta K” indicou K=2.

A distribuição dos genótipos nos 2 grupos, assim como a porcentagem do genoma compartilhada com o outro grupo, é mostrada na Figura 5.

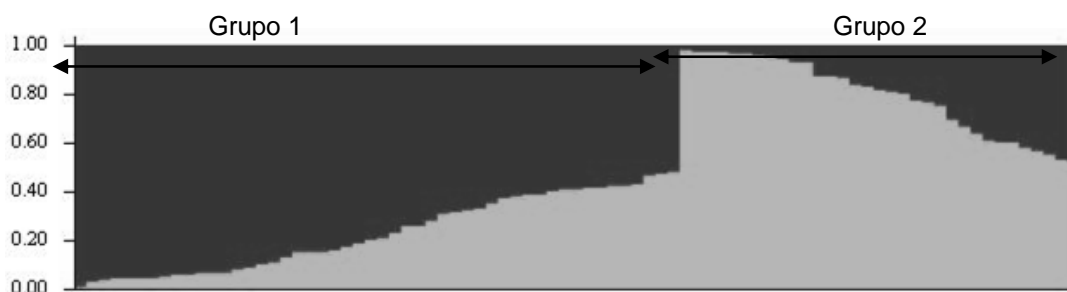


Figura 5: Agrupamento de 83 genótipos de cana-de-açúcar pelo programa STRUCTURE. O genoma de cada indivíduo está segmentado de acordo com a fração de seu genoma (eixo vertical) compartilhada com o outro grupo.

Nesta análise, no grupo 1 foram reunidos todos os indivíduos agrupados no grupo 1 do dendrograma, com exceção dos indivíduos IACSP96-7586 e IACSP97-7018. Ainda no grupo 1 foi alocado a maioria dos representantes do grupo 2 do dendrograma, com exceção dos materiais CTC9, IACSP96-7506, IACSP98-5046 e IACSP98-6202. Já

os genótipos do grupo 3 do dendrograma, exceto IACSP93-3046, IACSP93-6006, IACSP95-5000, IACSP97-3391, IACSP98-2053, IACSP99-4010 e SP79-1011, foram reunidos no grupo 2.

Análise de associação

A análise de regressão *stepwise* identificou seis marcadores associados significativamente à resposta à ferrugem marrom com $P < 0.05$, os quais explicaram, conjuntamente, 43.96% da variação fenotípica, sendo que o efeito individual das marcas oscilou entre -0.37 ($R^2 = 0.05$) e 0.24 ($R^2 = 0.08$) (Tabela 5). As marcas SCC60.8, SCA31.3, M56/E35 e M56/E37 tiveram efeito positivo sobre as notas de severidade e estão, portanto, associadas à suscetibilidade a essa doença, enquanto SCB14.9 e M56/E33 exibiram efeito negativo e estão ligadas à resistência. Esta última marca, no entanto, mostrou-se associada ao fenótipo apenas quando analisada individualmente e não exibiu essa correlação na presença dos outros marcadores, o que poderia indicar desequilíbrio de ligação entre M56/E33 e SCB14.9, sendo este mais importante para a resistência, ou interações epistáticas que minimizam a ação desse loco. O efeito individual, não significativo, do loco SCC60.8 também sugere a existência de epistasia, que neste caso acentuaria a participação desse marcador no fenótipo. Os efeitos da estrutura populacional não interferiram significativamente, $P < 0.05$, na detecção de marcadores associados à característica de interesse.

Tabela 5: Regressão *stepwise* para marcadores moleculares associados com ferrugem marrom a $P < 0.05$. Os efeitos da estrutura populacional são indicados pela interação marcador*subgrupo. Os subgrupos foram determinados pelo dendrograma (D) e pela análise bayesiana (S).

Marcador	Efeito sobre o fenótipo		Efeito sobre o fenótipo		R ²	Interação marcador*subgrupo	
	Pr > t		Pr > t			D	S
	Ação conjunta das marcas		Ação individual das marcas				
SCC60.8	0.36751	0.0008	0.17866	0.1553	0.0254	0.8142	0.6673
SCA31.3	0.2912	0.0017	0.2532	0.0244	0.0657	0.5532	0.4495
M56/E35	0.285997	0.0004	0.24105	0.0094	0.0813	0.9232	0.5136
M56/E37	0.23591	0.0034	0.19891	0.0408	0.0526	0.1092	0.8732
M56/E33	-0.22239	0.0615	-0.29617	0.0339	0.0564	0.2232	0.0700
SCB14.9	-0.48181	0.0011	-0.36849	0.0400	0.0517	0.3521	0.3057
R ²	0.4396						
F	0.83	<0.0001					

Discussão

Marcadores SSR e AFLP têm sido utilizados em muitos trabalhos para avaliar a diversidade genética em cana-de-açúcar (LIMA et al., 2002; CORDEIRO et al., 2003; PAN, 2006; PINTO et al., 2006; CRESTE et al., 2010; DUARTE FILHO et al., 2010; SINGH et al., 2011). De fato, ambos marcadores apresentam elevada capacidade de detectar polimorfismo, o que pode ser observado pelo alto valor de PIC. O valor médio de PIC detectado por SSR neste estudo, 0.7, foi superior aos observados por DUARTE FILHO et al. (2010), 0.57, e SINGH et al. (2011), 0.53; e inferior aos exibidos por PAN (2006), 0.75, e PINTO et al. (2006), 0.78. O valor médio de PIC detectado por AFLP (0.34) foi similar a 0.32, apresentado por CRESTE et al. (2010). Além dos distintos locos utilizados nesses trabalhos, essas diferenças se devem, também, às diferentes populações amostradas, que incluíam espécies selvagens do gênero *Saccharum*, clones e cultivares comerciais de cana-de-açúcar de diferentes programas de melhoramento do Brasil, EUA e Índia (PAN, 2006).

O valor de similaridade genética médio entre os genótipos do painel associativo, 0.47, indicou que o material é diverso. Esse valor é contrastante ao relatado por DUARTE FILHO et al. (2010), que obtiveram similaridade de 0.78, ao analisarem uma população de cultivares RB, desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Brasil). No entanto, é relevante ressaltar que esses autores avaliaram apenas 30 genótipos, enquanto no presente trabalho foram amostrados 83.

Além do baixo nível de similaridade genética, a diferenciação do material avaliado também foi evidenciada análise de coordenadas principais (PCoA). Os baixos valores das porcentagens da variabilidade explicados pelos eixos 1 e 2, 5.7% e 4.9%, respectivamente (Figura 2), indicaram que as coordenadas principais foram incapazes de resumir a diversidade. Para a cultura de feijão, que possui 2 conjuntos gênicos principais (CORTÉS et al., 2011), BLAIR et al. (2009), por esse tipo de análise, conseguiram explicar mais de 85% da variabilidade existente em um painel de 604 genótipos.

Apesar da diversidade observada, a base genética de cana-de-açúcar é, na verdade, estreita e reflete a origem dos programas de melhoramento genético dessa cultura, nos quais as atuais cultivares são derivadas de menos de 20 genótipos, todos provenientes dos programas de melhoramento de Java e Índia (LANDELL & BRESSIANI, 2008). No entanto, como as atuais cultivares de cana-de-açúcar são híbridos interespecíficos, derivados, principalmente, do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, elas apresentam genoma altamente poliplóide, com cerca de 8-14 cópias de cromossomos homó(eo)logos, e locos altamente heterozigóticos (AITKEN et al., 2005). Isso representa grande potencial na formação de combinações genéticas diferentes, o que significa populações muito segregantes. Neste trabalho, por exemplo, de acordo com o programa Caiana e analisando apenas as duas primeiras gerações, os genótipos SP80-185, SP70-1143, SP82-3530, RB72454, SP82-6108, RB835486, SP84-1192, SP80-1842, SP71-1088, H575028, RB855035, SP84-7017, POJ2878 e SP84-2025 apareceram na composição de indivíduos localizados em grupos distintos do dendrograma. Além disso, as cultivares SP80-3230, SP70-1143,

SP80-185, RB72454, SP84-7017, SP77-5181, SP84-2066 eram genitores de pelo menos cinco indivíduos diferentes.

Estimado em 18.000cM (AITKEN et al., 2005; REFFAY et al., 2005), o comprimento total elevado do genoma das atuais cultivares de cana-de-açúcar cria dificuldades ao mapeamento, uma vez que é necessário utilizar um grande número de marcadores para cobrir todos cromossomos (ZHANG et al., 2009). ROSSI et al. (2003), por exemplo, com emprego de 1123 marcadores, derivados de genes análogos à resistência, AFLPs, RFLPs, SSRs e isoenzimas, obtiveram um mapa de ligação que identificou somente cerca de 50% do genoma da cultivar R5700. Todavia, para populações de cana-de-açúcar, como a apresentada neste trabalho, será possível identificar marcadores associados a caracteres, sem extensa cobertura do genoma, pois os elevados valores de desequilíbrio de ligação (LD) indicaram, principalmente, haplótipos da ordem de 11-30cM (Tabela 4). Em cana-de-açúcar, elevado nível de LD também foi relatado por JANNOO et al. (1999) e RABOIN et al. (2008) e está claramente relacionado a história recente dos programas de melhoramento, nos quais é comum os genótipos apresentarem *pedigree* composto, em média, por 5 a 7 gerações, ou seja, 5-7 meioses (JANNOO et al., 1999). O número limitado de eventos de recombinação mantém os blocos gênicos e, dessa forma, um gene, que controla um fenótipo de interesse, pode estar correlacionado a uma série de marcadores. Apesar desse benefício, o elevado LD restringe a resolução do mapeamento, uma vez que associações entre gene e marcador, se separados por algumas dezenas de cM, podem ser perdidas por recombinação.

A complexidade do genoma da cana-de-açúcar também se reflete no momento de determinar o número de subgrupos existentes na população. HUANG et al. (2010) argumentam que não há um programa para estrutura genética que incorpore todas as características dessa planta. Por isso, foi importante apresentar três metodologias de agrupamento, uma baseada na estatística bayesiana, implementado no programa STRUCTURE, e duas baseadas em dissimilaridades genéticas: as análises de coordenadas principais (PCoA), que fornecem uma representação geral da diversidade presente na população e não estão restritas a relações entre os indivíduos em termos

de genealogia, que, todavia, são o foco dos métodos de filogenia (PERRIER & JACQUEMOUND-COLLET, 2006). Também, por meio dessas análises, BUTTERFIELD (2007), ao avaliar 77 genótipos do programa de melhoramento SASRI (*South Africa Sugarcane Research Institute*), identificou 2 subgrupos, enquanto para materiais do programa Cana/IAC, este trabalho, assim como o apresentado por LOPES (2011), identificou 3 subgrupos. Esses trabalhos evidenciam o papel decisivo dos programas de melhoramento na estruturação genética em culturas submetidas a seleções artificiais. O método de PCoA não mostrou grande diferenciação visual entre os genótipos, o que limitou o agrupamento dos indivíduos, por isso, na análise de associação foram utilizados apenas os resultados do dendrograma e do programa STRUCTURE. No entanto, a ausência de interações entre marcadores moleculares e os subgrupos (Tabela 4) indicaram que os efeitos provenientes de estrutura populacional não têm participação significativa nas associações estabelecidas neste trabalho.

Individualmente, os marcadores associados à severidade da ferrugem marrom tiveram pequeno efeito sobre a proporção da variação fenotípica total explicada (R^2), que variou entre 2,5 e 8%. Efeitos dessa magnitude foram relatados por HOARAU et al. (2002), AITKEN et al. (2006) e AITKEN et al. (2008), que identificaram R^2 de 3 a 10% para caracteres ligados à produção de biomassa, e podem estar relacionados à natureza poliplóide da cana-de-açúcar, em que a presença de um grande número de alelos por loco confere, à maioria dos caracteres, padrão de herança quantitativa, na qual um único alelo tem influência restrita sobre a variação fenotípica total (AITKEN et al., 2008). Para a ferrugem marrom, DAUGROIS et al. (1996) observaram segregação de 3:1 para resistência a essa doença em uma progênie de 141 indivíduos derivada da auto-fecundação da cultivar R570, sugerindo a presença de um alelo dominante de efeito maior, no entanto, RAMDOYAL et al. (2000) também afirmaram a existência de alelos, de efeito menor, atuando de maneira quantitativa. A herança quantitativa e as interações epistáticas tornam a identificação de marcadores moleculares associados a características agrônômicas importantes um desafio ainda maior. Por isso são importantes os esforços para saturar o genoma da cana-de-açúcar com marcadores moleculares e unir as estratégias de mapeamento associativo e mapeamento bi-

parental, visando encontrar marcadores com potencial para guiar e acelerar o processo de seleção dos programas de melhoramento genético.

Conclusões

Como conclusões, nossos resultados apontaram que o painel de cana-de-açúcar avaliado apresentou extenso desequilíbrio de ligação e elevada diversidade. Foi possível identificar marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem marrom, SCB14.9 e M56/E33, e a suscetibilidade, SCC60.8, SCA31.3, M56/E35 e M56/E37. As correlações fenótipo-genótipo foram corrigidas para o efeito da estrutura populacional, mas este não influenciou, significativamente, as interações. Como a população amostrada incluiu importantes materiais em fase avançada de seleção do Programa de Melhoramento Cana/IAC, as associações entre marcador e fenótipo detectadas serão validadas, visando utilizá-las para orientar decisões durante o processo de seleção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAMA, H.A., EIZENGA, G.C., YAN, W. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, p. 341–356, 2007.

AITKEN, K.S.; HERMANN, S.; KARNO, K.; BONNETT, G.D.; MCINTYRE, L.C.; JACKSON, P.A. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, p. 1191-1203, 2008.

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. 5, p. 789-801, 2005.

AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (*Saccharum spp.*) cultivar x *Saccharum officinarum* population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, p. 1306-1317, 2006.

AL-JANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reports**, Netherlands, v. 17, n. 3, p. 1-8, 1999.

ALWALA, S.; KIMBENG, C.A.; VEREMIS, J.C., GRAVOIS, K.A. Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 164, n. 1, p. 37-51, 2008.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistidas por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant disease**, Saint Paul, v. 85, n. 3, p. 282-286, 2001.

ASNAGHI, C.; ROQUES, D.; RUFFEL, S.; KAYE, C.; HOARAU, J.-Y.; TÉLISMART, H.; GIRARD, J.C.; RABOIN, L.M.; RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; D'HONT, A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, n. 4, p. 759-764, 2004.

BARBOSA, M.H.P; SILVEIRA, L.C.I. Melhoramento genético e recomendação de cultivares. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds). **Cana-de-açúcar - Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologias e Perspectivas**. Viçosa: UFV, 2010. p. 313-331.

BARNES, J.M.; RUTHERFORD, R.S.; BOTHA, F.C. 1997. The identification of potential genetic markers in sugarcane varieties for the prediction of disease and pest resistance ratings. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, KwaZulu-Natal, v. 71, p. 57-61, 1997.

BLAIR, M.W.; DÍAZ, L.M.; BUENDÍA, H.F., DUQUE, M.C. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 6, p. 955-972, 2009.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Marcadores Moleculares. In: _____. **Melhoramento de plantas**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005. cap. 30, p. 441-463.

BRESEGHELLO, F.; SORRELLS, M.E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics**, Baltimore, v. 172, n. 2, p. 1165-1177, 2006a.

BRESEGHELLO, F.; SORRELLS, M.E. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 1323-1330, 2006b.

BRESSIANI, J.A. **Seleção seqüencial em cana-de-açúcar**. 2001. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BUTTERFIELD, M.K. **Marker assisted breeding in sugarcane: a complex polyploid**. 2007, 162 p. Tese (PhD Thesis, Doutorado em Filosofia) - University of Stellenbosch, Matienland, Stellenbosch, South Africa, 2007.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 11-94

CARDOSO, C.O.N.; SANGUINO, A. Ferrugem da cana-de-açúcar. In: 4º SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA COPERSUCAR, 4., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Ave Maria LTDA, 1988. p. 609-625.

CARPIO, D.P.D., BASNET, R.K.; VOS, R.C.H.; MALIEPAARD, C.; PAULO, M.J., BONNEMA, G. Comparative methods for association studies: a case study on metabolite variation in a *Brassica rapa* core collection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, e19624, 2011.

CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL; CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. Custos e Rentabilidade do Setor Sucreenergético nas safras 2009/10 e 2010/11. **Ativos da pecuária de corte**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/ativos_CANA2_0.pdf>. Acesso em: 30 janeiro 2012.

COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences**, London, v. 363, p. 557-572, 2008.

COMADRAN, J.; THOMAS, W.T.B.; VAN EEUWIJK, F.A.; CECCARELLI, S.; STANCA, A.M.; PECCHIONI, N.; AKAR, T.; AL-YASSIN, A.; BENBELKACEM, A.; OUABBOU, H.; BORT, J.; ROMAGOSA, I.; HACKETT, C.A.; RUSSELL, J.R. Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 1, p. 175-187, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira:** Cana-de-açúcar, 2º Levantamento. Brasília, 2011, 20p.

CORDEIRO, G.M.; MAGUIRE, T.L.; HENRY, R.J.; EDWARDS, K.J. Optimisation of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. **Plant Molecular Biology Reports**, Piscataway, v. 17, n. 3, p. 225-229, 1999.

CORDEIRO, G.M.; PAN, Y.B.; HENRY, R.J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 1, p. 181-189, 2003.

CORDEIRO, G.M.; TAYLOR, G.O.; HENRY, R.J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) a highly polyploid species. **Plant Science**, Limerick, v. 155, n. 2, p. 161-168, 2000.

CORTÉS, A.J.; CHAVARRO, M.C.; BLAIR, M.W. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 123, n. 5, p. 827-845, 2011.

CRESTE, S.; ACCORONI, K.A.G.; PINTO, L.R.; VENCOVSKY, R.; GIMENES, M.A.; XAVIER, M.A.; LANDELL, M.G.A. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 172, n. 3, p. 435-446, 2010.

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.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 157-176.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Netherlands, v. 19, p. 299–306, 2001.

DAUGROIS, J.H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J.Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with an

RFLP marker in sugarcane cultivar R570. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 1059-1064, 1996.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In ALFENAS, A.C. (Ed). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins- Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. cap 9, p. 405-475.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. 882p.

DOS SANTOS, A. DA S. Doenças causadas por fungos. In. DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.C.A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap. 19, p. 423-435.

DUARTE FILHO, L.S.C.; SILVA, P.P.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; RAMALHONETO, C.E.; SOARES, L.; ANDRADE J.C.F.; ALMEIDA, C. Genetic similarity among genotypes of sugarcane estimated by ssr and coefficient of parentage. **Sugar Tech**, New Dehli, v. 12, n. 2, p. 145-149, 2010.

EARL, D.A. Structure harvester v 0.6.92., 2011. Disponível em: <http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/>. Acesso em: 4 fevereiro 2012.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. **Nature Reviews/Genetics**, London, v. 5, p. 435-445, 2004.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Produções da Informação. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.

- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 574-578, 2007.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- FLINT-GARCIA, S.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 357-374, 2003.
- GARCIA, A.A.F.; KIDO, E.A.; MEZA, A.N.; SOUZA, H.M.B.; PINTO, L.R.; PASTINA, M.M.; LEITE, C.S.; DA SILVA, J.A.G.; ULIAN, E.C.; FIGUEIRA, A.; DE SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 288-314, 2006.
- GARCIA, E.O.; CASAGRANDE, M.V.; RAGO, A.M.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Preservação de uredinósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2007.
- GASCUEL, O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 14, n. 7, p. 685-695, 1997.
- GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 122-127, 2001.
- GUPTA, P.K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P.L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, n. 4, p. 461-485, 2005.
- HOARAU, J.-Y.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A.-M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J.-CH; 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.

HOARAU, J.-Y., GRIVET, L.; OFFMANN, B.; RABOIN, L.-M.; DIORFLAR, J.P.; PAYET, J.; HELLMANN, M; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.-C. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) II. Detection of QTLs for yield components. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 1027-1037, 2002.

HOGARTH, D.M.; RYAN, C.C.; TAYLOR, P.W.J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugarcane. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 187-193, 1993.

HOLTON, T.A.; CHRISTOPHER, J.T.; MCCCLURE, L.; HARKER, N.; HENRY, R.J. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 63-71, 2002.

HORVATH, A.; DIDIER, A.; KOENING, J.; EXBRAYAT, F.; CHARMET, G.; BALFOURIER, F. Analysis of diversity and linkage disequilibrium along chromosome 3B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.119, n.8, p.1523-1537, 2009.

HUANG E, AITKEN K ; GEORGE A. Association Studies. In: Henry R and Kole C (Eds). **Genetics, Genomics and Breeding of sugarcane**. Science Publishers, Enfield, 2010. p. 43-68.

HUBISZ, M.J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, Malden, v. 9, n. 5, p. 1322-1332, 2009.

IDO, O.T.; NETO LIMA, V.C.; DAROS, E.; POSSAMAI, J.C.; ZAMBON, J.L.C.; WEBER, H.; OLIVEIRA, R.A. Incidência e severidade da ferrugem em clones de cana-de-açúcar no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 159-163, 2006.

IRVINE, J.E. Saccharum species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 2, p.186–194, 1999.

IWATA, H.; UGA, Y.; YOSHIOKA, Y.; EBANA, K.; HAYASHI, T. Bayesian association mapping of multiple quantitative loci and its application to the analysis of genetic variation among *Oryza sativa* L. germplasms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n.8, p. 1437-1449, 2007.

JANNOO, N.; GRIVET, L.; DOOKUN, A.; D`HONT, A.; GLASZMANN, J.C. Linkage disequilibrium among modern sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 6, p. 1053-1060, 1999.

JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; PASAKINSKIENE, I. Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**, Cambridge, v. 183, p. 935-966, 2009.

JORDÃO Jr., H. **Desenvolvimento de um sistema baseado em marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites para identificação de variedades de cana-de-açúcar**. 2009. 106p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KRAAKMAN, A.T.W.; NIKS, R.E.; VAN DEN BERG P, P.M.M.M.; STAM, P.; VAN EEUWIJK, F.A. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. **Genetics**, Baltimore, v. 168, p.435-446, 2004.

LANDELL, M.G.A.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap. 5, p. 101-155.

LIMA, M.L.A.; GARCIA, A.A.F; OLIVEIRA, K.M; MATSUOKA, S.; SOUZA Jr., C.L.; SOUZA, A.P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 1, p. 30-38, 2002.

LITT, M; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.

LOPES, F.C.C: **Mapeamento genético de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) por associação empregando marcadores SSR e AFLP**. 2011, 140p. Tese (Doutorado em Ciências- Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) -. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MA, H.-M.; SCHULZE, S.; LEE, S.; YANG, M.; MIRKOV, E.; IRVINE, J.; MOORE, P.; PATERSON, A. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, n. 5, p. 851-863, 2004.

MACCHERONI, W.; MATSUOKA, S. Manejo das principais doenças da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (Orgs). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Prol, 2006. cap. 14, p. 239-256.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 203-251.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, C.G. Hibridação em cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed). **Hibridação Artificial de Plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 221-254.

MATSUOKA, S.; MACCHERONI, W. Manejo de Doenças. In. SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds). **Cana-de-açúcar. Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologias e Perspectivas**. Viçosa: UFV, 2010, p. 161-180.

MYLES, S.; PEIFFER, J.; BROWN, P.J.; ERSOZ, E.S.; ZHANG, Z.; COSTICH, D.E.; BUCKLER, E.S. Association Mapping: Critical Considerations shift from Genotyping to Experimental Design. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 18, p. 2194-2202, 2009.

NEVES, M.F.; CONEJERO, M.A. Estratégias da indústria da cana. In: _____. **Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial**. São Paulo: Atlas, 2010d, p. 59-88.

NEVES, M.F.; CONEJERO, M.A. Etanol: histórico e perspectivas internacionais. In: _____. **Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial**. São Paulo: Atlas, 2010b, p. 113-1179.

NEVES, M.F.; CONEJERO, M.A. O negócio da bioeletricidade da cana. In: _____. **Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial**. São Paulo: Atlas, 2010c, p. 181-204.

NEVES, M.F.; CONEJERO, M.A. O negócio do açúcar no Brasil e no mundo. In: _____. **Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial**. São Paulo: Atlas, 2010a, p. 89-112.

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**, Berlin, v. 20, n. 3, p. 189-208, 2007.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MOLINARI, M.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, Ottawa, v. 52, n. 2, p. 191-209, 2009.

PALHARES, A.C. **Mapeamento genético de marcadores AFLP e de retrotransposons em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2010. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAN, Y.B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germoplasm evaluation and variety identity testing. **Sugar Tech**, New Dehli, v. 8, n. 4, p. 246-256, 2006.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P. **DARwin software 5.0**. Montpellier, France, 2006. Disponível em: <<http://darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 10 janeiro

2011.

PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MARCONI, T.; GARCIA, A.A.F.; ULIAN, E.C.; DE SOUZA, A.P. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, p. 378-384, 2006.

PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; ULIAN, E.C.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 5, p. 795–804, 2004.

PIPERIDIS, N.; JACKSON, P.A.; D'HONT, A.; BESSE, P.; HOARAU, J.Y.; COURTOIS, B.; AITKEN, K.S.; McINTYRE, C.L. Comparative genetics in sugarcane enables structured map enhancement and validation of marker-trait association. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 233-247, 2008.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Baltimore, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PURDY, L.H.; LIU, L.J.; DEAN, J.L. Sugarcane rust, a newly important disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 11, p. 1292-1296, 1983.

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 bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 7, p. 1382-1391, 2006.

RABOIN, L.-M.; PAUQUET, J.; BUTTERFIELD, M.; D'HONT, A.; GLASMANN, J.-C. Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 116, n. 5, p. 701-714, 2008.

RAGO, A.M. **Variabilidade patogênica de *Puccinia melanocephala* e *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo**. 2005. 42f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Área de concentração: Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RAID, R.N.; COMSTOCK, J.C. Common rust. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SALEM SAUMTALLY, A. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRARD-ISSCT, 2000. p. 85-89.

RAMDOYAL, K.; SULLIVAN, S.; LIM-SHIM-CHONG, L.C.Y.; BADALOO, G.H.; SAUMTALLY, S. DOMAINGUE, R. The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 557-563, 2000.

REFFAY, N.; JACKSON, P.A.; AITKEN, K.S.; HOARAU, J.-Y; D'HONT, A.; BESSE, P.; MCINTYRE, C.L. Characterisation of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane. **Molecular Breeding**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 367-381, 2005.

REMINGTON, D.L.; THORNSBERRY, J.M.; MATSUOKA, Y.; WILSON, L.M.; WHITT, S.R.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11479-11484, 2001.

RESENDE, M.D.V. Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo no melhoramento de plantas. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADO À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 11., 2005, Londrina. **CDROM**.

RESENDE, M.D.V.; PRATES, D.F.; YAMADA, C.K.; JESUS, A. Estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e melhor predição não viciada (BLUP) em *Pinus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n. 32/33, p. 23-42, 1996.

RIPOLI, M.L.C.; RIPOLI, T.C.C. Palhiço como fonte de energia. In DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap. 36, p. 791-806.

ROLIM, G.S.; CAMARGO, M.B.P.; LANIA, D.G.; MORAES, J.F.L. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas

agroclimáticas para o estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 711-720, 2007.

ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; 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, n. 3, p.406–419, 2003.

SAITOU, N.; MASATOSHI, NEI. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANGUINO, A.; TOLEDO, A.C.D. Considerações sobre a ferrugem da cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, v. 22, p. 25-31, 1983.

SAS Institute. **SAS/STAT user's guide, version 9.2** SAS, Cary, 2008.

SCHUELKE, M. An economic method for fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 233-234, 2000.

SHARMA, V. **Identification of drought-related quantitative trait loci (qtls) in sugarcane (*saccharum spp.*) using molecular markers**. 2009. 67f. Tese (Doutorado em Filosofia- Área de concentração: Melhoramento Vegetal) - Texas A&M University, Wisconsin, 2009.

SINGH, R.K.; KHAN, M.S.; SINGH, R.; PANDEY, D.K.; KUMAR, S.; LAL, S. Analysis of genetic differentiation and phylogenetic relationships among sugarcane genotypes differing in response to red rot. **Sugar Teech**, New Dehli, v. 12, n. 2, p. 137-144, 2011.

SORANZO N.; PROVAN J.; POWELL, W. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 158–161, 1999.

SORDI, R.A.; ARIZONO, H.; MATSUOKA, S. Indicadores de herdabilidade e avaliação da resistência de clones RB à ferrugem da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 18-23, 1988.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TEIXEIRA, L.H.M. **Mapeamento funcional em cana-de-açúcar utilizando ESTs como marcadores moleculares**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular- Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TELLES, G.P.; BRAGA, M.D.V.; DIAS, Z.; LIN, T.-L.; QUITZAU, J.A.A.; DA SILVA, F.R.; MEIDANIS, J. Bioinformatics of the sugarcane EST project. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n 1-4, p. 9-15, 2001.

THORNSBERRY, J.M.; GOODMAN, M.M.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; NIELSEN, D.; BUCKLER, E.S. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. **Nature Genetics**, New York, v. 28, n. 3, p. 286-289, 2001.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. cap. 21, v. 2, p. 185-196.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 48–55, 2005.

VEIGA FILHO, A.A.; FRONZAGLIA, T.; TORQUATO, S.A. A necessidade de inovação tecnológica e agrícola para sustentar o novo ciclo expansionista do setor sucroalcooleiro. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 855-868.

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

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEI, X., JACKSON, P.A.; McINTYRE, C.L.; AITKEN, K.S.; CROFT, B. Associations between DNA markers and resistance to disease in sugarcane and effects of population substructure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 1, p. 155-164, 2006.

WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 1, p. 9–19, 1999.

YU, J.; BUCKLER, E.S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 155-160, 2006.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZHANG, L.Y.; MARCHAND, S.; TINKER, N.A.; BELZILE, F. Population structure and linkage disequilibrium in barley assessed by DArT markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 1, p. 43-52, 2009.

ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. **The Plant Genome**, Madison, v. 1, n. 1, p. 5-20, 2008.