

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/01/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MAPEAMENTO DE MICROSSATÉLITES FUNCIONAIS
DE SORGO (EST-SSR) EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Silvan Gomes de Brito
Engenheiro Agrônomo

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DE MICROSSATÉLITES FUNCIONAIS DE
SORGO (EST-SSR) EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Silvan Gomes de Brito

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Vicentini dos Santos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Genética e Melhoramento
Genético de Plantas)**

2016

Brito, Silvan Gomes
M499a Mapeamento de microssatélites funcionais de sorgo (EST-SSR)
em cana-de-açúcar. / Silvan Gomes de Brito. – – Jaboticabal, 2016
xix, 110 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Luciana Rossini Pinto
Banca examinadora: Dilermando Perecin, Fernanda Raquel
Camilo dos Santos, Gustavo Vitti Moro, Michael dos Santos Brito

Bibliografia

1. Colinearidade. 2. Genes ortólogos. 3. Microssatélites. 4.
Mapeamento comparativo. 5. Marcador molecular. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MAPEAMENTO DE MICROSSATÉLITES FUNCIONAIS DE SORGO (EST-SSR)
EM CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: SILVAN GOMES DE BRITO

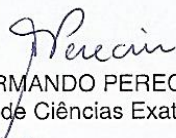
ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO

CO-ORIENTADOR: RENATO VICENTINI DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC / Instituto Agronômico de Campinas -
Ribeirão Preto, SP



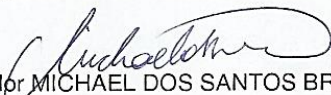
Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pós-doutoranda FERNANDA RAQUEL CAMILO DOS SANTOS
Instituto Agronômico de Campinas / Centro de Cana de Açúcar / Ribeirão Preto, SP



Pesquisador MICHAEL DOS SANTOS BRITO
Instituto Agronômico de Campinas / Centro de Cana de Açúcar / Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 01 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SILVAN GOMES DE BRITO – Nasceu em 05 de maio de 1984, no município de Santa Rita- Paraíba. Em dezembro de 2005, concluiu o curso Técnico em agropecuária, no Centro de Formação Tecnólogos, Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras-PB. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica (Bacharel), no ano de 2004, no Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, onde na mesma, obteve o título de Engenheiro Agrônomo no ano de 2009. Em julho de 2012, obteve o título de Mestre em Agronomia, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. Em agosto de 2012, ingressou no programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, São Paulo. Realizou estágio curricular para desenvolvimento da tese, no Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana, Instituto Agrônomo de Campinas-IAC/RP.

Tua caminhada ainda não terminou... A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória. Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem. Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar à perfeição.

A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leite dos rios precisa da água que rola e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

A Deus

Ofereço

Aos meus pais, Sebastião Gomes e Maria da Penha, a minha irmã, Silvana e aos amores de minha vida (minhas filhas), Janice, Samantha Gabrielle e Lavínia Fernanda.

Dedico

Agradecimentos

A Deus em primeiro lugar, por ter me dado a oportunidade de viver e a capacidade para enfrentar e vencer as dificuldades proporcionadas ao longo da vida. À minha família, pelo apoio e confiança no meu trabalho. Aos meus queridos pais por terem proporcionado toda condição para concluir este meu objetivo.

À minha irmã, pela força e carinho. Ao meu cunhado Eduardo, pelo apoio e grande amizade. À Paula Fernanda e seus pais, José Gomes e Anunciada Dutra e Berenice Eugênio, por acreditar em mim, dando crédito a minha escolha profissional e a minha inserção em sua família.

A minha orientadora Prof^{fa}. Dra. Luciana Rossini Pinto, pelo convívio, paciência, amizade e ensinamentos transmitidos, contribuindo para minha formação profissional e acadêmica ao longo desses anos.

Ao meu Co-orientador. Dr. Renato Vicentini dos Santos, pelas valiosas contribuições que melhoraram a qualidade deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento Genético de plantas) da UNESP/FCAV, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao professor Dr. Dilermando Perecin, pelos ensinamentos, paciência e a valiosa contribuição na análise de dados.

A Dra. Karen Toledo, por doar as sementes dos híbridos de sorgo da empresa Dow AgroScienses utilizadas nesse estudo.

Aos funcionários da seção técnica do Programa de Pós-Graduação da UNESP/FCAV, pela paciência e constantes ajudas fornecidas.

Aos amigos Alisson Esdras, Alisson Jales, Guilherme, Gustavo Hugo, Hudson, Ivanildo, Jacqueline Ferraça, Lucas (o paulista), Marília, Miquéias.

Aos companheiros GOU (Grupo de Oração Universitária), Andréa, Daniel, Denise, Liziane, Natalia Águila e Roberto pelos momentos de oração e amizade construída ao longo desses anos.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana-IAC/RP, Alexandre, Carol Neuber, Cibele, Fernanda Raquel, Isadora (Izinha), Jéssica, Juliana,

Larissa, Maria Natália, Maria Leticia, Marcel, Michael, Rafael e em especial ao Maycon (Maycão) e a Thaís, pela ajuda e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos funcionários do Centro de Cana-IAC/RP, pela paciência e constantes ajudas fornecidas, em especial a D. Marta, pelo carinho, atenção e amizade.

Ao apoio institucional e financeiro da Universidade Estadual Paulista e Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana/Apta-IAC/RP. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão à bolsa.

Enfim, a todos e aqueles que não pude citar, mas que contribuíram para a conclusão desta minha etapa profissional.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos gerais da cultura da cana-de-açúcar.....	4
2.2 Marcadores microssatélites derivados das etiquetas de sequências expressas (EST-SSRs) e transferibilidade entre gêneros correlatos.....	6
2.3 Mapeamento genético.....	9
2.4 Construção de mapa genético.....	11
2.5 Mapeamento comparativo.....	11
2.6 Mapeamento de QTL em cana-de-açúcar.....	13
2.7 Desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir de sequências ortólogas conservadas (COS) entre cana e sorgo.....	15
2.8 Importância do sorgo para o mapeamento genético da cana-de-açúcar.....	18
3 REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO II.....	34
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES COS-EST-SSRS ENTRE CANA E SORGO.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Material vegetal.....	39
2.2 Obtenção de sequências de etiquetas expressas ortólogas conservadas entre cana e sorgo (COS-EST) contendo microssatélites.....	40
2.3 Desenho dos pares de <i>primers</i> (COS-EST-SSRs).....	40
2.4 Anotação funcional dos COS-EST-SSR.....	41
2.5 Extração do DNA genômico.....	41
2.6 Amplificação dos COS-EST-SSR.....	42

2.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	42
2.8	Análise de polimorfismo dos COS-EST-SSR	46
3	RESULTADOS	46
3.1	Identificação dos COS-EST-SSRs	46
3.2	Anotação funcional dos COS-EST-SSR	48
3.3	Análise de polimorfismo dos COS-EST-SSRs em cana e sorgo	48
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÃO	56
6	REFERÊNCIAS	57
	CAPÍTULO III	62
	MAPEAMENTO DE MARCADORES MOLECULARES DE SORGO EM CANA-DE-AÇÚCAR	62
	RESUMO	63
	ABSTRACT	64
1	INTRODUÇÃO	65
2	MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1	Material vegetal	66
2.2	Genotipagem da população de mapeamento	67
2.2.1	Extração e quantificação do DNA genômico	67
2.2.2	Marcadores microssatélites genômicos (gSSRs) e derivados de sequências expressas (EST-SSRs) de sorgo	67
2.2.3	Amplificação dos COS-EST-SSR	67
2.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	68
2.4	Fenotipagem da população de mapeamento	68
2.4.1	Delineamento experimental	68
2.4.2	Análise fenotípica	68
2.5	Análise segregação de marcadores em dose única	71
2.6	Construção do mapa genético	72
2.7	Análise de associação	72
3	RESULTADOS	73
3.1	Marcadores em dose única gSSRs, EST-SSRs de sorgo e COS-EST-SSRs	73
3.2	Mapa de ligação	75

3.3	Comparação entre os grupos de ligação de cana-de-açúcar e o mapa consenso de sorgo	75
3.4	Associação dos marcadores de sorgo com os caracteres fenotípicos	79
3.4.1	Pol%Cana	81
3.4.2	Fibra%.....	82
4	DISCUSSÃO	83
5	CONCLUSÃO.....	87
6	REFERÊNCIAS	88

Mapeamento genético de microssatélites funcionais de sorgo (EST-SSRs) em cana-de-açúcar

RESUMO - O genoma do sorgo tem sido utilizado como referência em estudos de genômica funcional e comparativa em cana-de-açúcar. A utilização do genoma do sorgo, em estudos de mapeamento comparativo, tem contribuído para auxiliar a detecção de QTL (locus de caracteres quantitativos) em cana-de-açúcar. Marcadores microssatélites de sorgo podem ser empregados no mapeamento comparativo com a cana-de-açúcar, assim como, o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir de sequências ortólogas conservadas (COS - *Conserved Orthologous Sequences*) podem servir de “marcadores âncoras” entre estas duas espécies. No presente trabalho, marcadores microssatélites de sorgo foram incorporados em um mapa prévio de ligação derivado do cruzamento entre o clone IACSP95-3018 e a cultivar IACSP93-3046, ambos do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Paralelamente, um conjunto de marcadores microssatélites obtidos a partir da identificação de sequências expressas ortólogas conservadas (COS) entre cana-de-açúcar e sorgo foram desenvolvidos e avaliados quanto ao seu potencial de polimorfismo e mapeamento em cana-de-açúcar. Os marcadores obtidos também foram utilizados para identificar associações putativas aos parâmetros de qualidade (Fibra% e Pol%Cana). Um total de 41 pares de microssatélites COS-EST-SSRs foi desenhado, dos quais 34 produziram amplicons em um grupo de 24 genótipos de *Saccharum* e *Sorghum*. O número de alelos variou de 2 a 15 com valor médio de PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) de 0,71. Os 29 pares de *primers* de microssatélites de sorgo, juntamente com os 41 pares de *primers* COS-EST-SSRs genotipados na população de mapeamento produziram um total de 120 marcadores polimórficos, dos quais 92 segregaram em dose única. Destes 92, 52 (56,5%) foram incorporados ao mapa prévio originando 138 grupos de ligação agrupados em 12 grupos de homologia. A maioria das associações entre marcadores e o caractere Pol%Cana detectadas por meio da análise de marcas simples foram de efeito positivo contribuindo para o aumento deste caractere sendo apenas duas com contribuição negativa. De forma geral, os marcadores derivados de sorgo foram promissores no mapeamento da população aqui apresentada.

Palavra-chave: colinearidade, genes ortólogos, mapeamento comparativo, marcador molecular, microssatélites

Genetic mapping of sorghum functional microsatellites (EST-SSRs) markers in sugarcane

ABSTRACT- Sorghum genome has been used as a reference in functional and comparative genomics studies of sugarcane. The sorghum genome has aided to colocalize QTL (quantitative trait locus) in sugarcane through comparative mapping approach. Sorghum microsatellite markers, as well as, the development of microsatellite markers derived from orthologous conserved sequences (COS) can serve as "anchors markers" in comparative mapping between these two species. In the present study, sorghum microsatellite markers were included in a previous map derived from a bi-parental cross between a clone (IACSP95-3018) and a sugarcane cultivar (IACSP93-3046) from the Instituto Agronômico de Campinas (IAC) sugarcane breeding program. A set of microsatellite markers derived from conserved orthologous (COS-EST-SSRs) sequences between sugarcane and sorghum was developed and evaluated for their polymorphism and mapping potential in sugarcane. These markers were also used to identify putative associations for sugarcane quality parameters (fiber% and Pol% Cane). A total of 41 COS-EST-SSRs primer pairs was designed, of which 34 produced amplicons in a group of 24 genotypes of *Saccharum* and *Sorghum*. The number of alleles ranged from 2 to 15 with an PIC (polymorphism information content) average value of 0.71. The 29 sorghum SSR primer pairs along with the 41 COS-EST-SSR primer pairs was genotyped in the mapping population and produced a total of 120 polymorphic markers, of which 92 were single dose markers. Of these, 52 (56.5%) were added to the previous map generating 138 linkage groups grouped into 12 homology groups. The majority of the single marker-trait associations detected for Pol% Cane showed positive effects contributing to increase this trait (only two showed negative contribution to Pol% Cane). In general, the sorghum derived markers were promising in the genetic mapping of the bi-parental population evaluated.

Keyword: collinearity, orthologous genes, comparative mapping, molecular markers, microsatellites

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES COS-EST-SSRS ENTRE CANA E SORGO

Tabela 1 -	Genótipos utilizados na avaliação dos pares de <i>primers</i> flanqueadores de microssatélites derivados de sequências de etiquetas expressas ortólogas conservadas (COS-EST-SSRs) entre cana e sorgo.....	39
Tabela 2 -	Identificação das sequências ortólogas conservadas na base de dados SUCEST, iniciadores COS-EST-SSRs com suas respectivas sequências (forward/reverse), temperatura de anelamento (T _m), tamanho do produto esperado (TPes) e similaridade esperada.....	43
Tabela 3 -	Classes de motivos de COS-EST-SSR e respectiva porcentagem de amplificação nos gêneros de <i>Saccharum</i> e <i>Sorghum</i>	50
Tabela 4 -	Identificação dos COS-EST-SSRs, número de alelos (NA), variação do tamanho (pb), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e heterozigosidade esperada (He) dos marcadores COS-EST-SSRs avaliados em 24 genótipos de cana e sorgo.....	51

CAPÍTULO III - MAPEAMENTO E ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES COS-EST-SSRs, gSSR e EST-SSR DE SORGO EM CANA-DE-AÇÚCAR

Tabela 1 -	Relação dos pares de <i>primers</i> sequências forward e reverse, temperatura de anelamento (T _a) e tamanho do produto amplificado para os gSSRs e EST-SSRs avaliados.....	69
Tabela 2 -	Número de marcadores em dose única obtidos por EST-SSR e gSSR de sorgo e COS-EST-SSRs em cruzamento bi-parental.....	74
Tabela 3 -	Análise descritiva dos dados fenotípicos da população de mapeamento derivada de um cruzamento bi-parental entre o clone IACSP95-3018 e a cultivar IACSP93-3046.....	79
Tabela 4 -	Efeito de marcadores COS-EST-SSRs, gSSR e EST-SSRs associados a variável Pol%Cana avaliados na população derivada do cruzamento bi-parental.....	81

- Tabela 5** - Percentagem da variação fenotípica explicada pelas associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para o carácter Pol%Cana para marcadores do tipo COS-EST-SSRs, gSSR e EST-SSRs via procedimento *stepwise* do SAS..... 82
- Tabela 6** - Efeito de associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para o carácter Fibras para marcadores do tipo COS-EST-SSRs, gSSR e EST-SSRs via procedimento *Stepwise* do SAS..... 83

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1 -** Duplicação do gene. A e A' são ortólogos porque são relacionados por ascendência. Adaptada de Neale e Krutovsky (2005)..... 16

CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES COS-EST-SSRS ENTRE CANA E SORGO

- Figura 1 -** Identificação de sequências EST-SSR ortólogos conservados (COS-EST-SSR) entre os genomas de cana e sorgo. **Fonte:** Adaptado de Vicentini et al. (2012)..... 47
- Figura 2 -** Alinhamento realizado utilizando a ferramenta Clustal W: sequências ortólogas de cana em sorgo (SCAGLB1070D03.g-Sb04g000230.1, SCCCLR1069H09.g-Sb02g041350.1, SCCCL3005C02.g-Sb01g030835.1, SCCRZ2C04A03.g-Sb01g019290.1 e SCJLFL4187G07.g-Sb01g011810.1, respectivamente). Alinhamento utilizado na obtenção de *primers* COS-EST-SSRs: (A) alinhamento perfeito na região complementar ao primer forward (retângulo verde), na região do COS-EST-SSR (retângulo vermelho) e na região complementar ao primer reverse (retângulo azul). Alinhamentos não utilizados na obtenção de *primers* COS-EST-SSRs: (B) *Gaps* e incompatibilidade de nucleotídeos na região complementar ao *primer* (retângulo verde); região do COS-EST-SSR (retângulo vermelho); (C) COS-EST-SSR localizados no início de uma sequência alinhada; (D) Alinhamento com tamanho inferior a 150 pb e (E) COS-EST-SSR localizados no final de uma sequência alinhada..... 49
- Figura 3 -** Análise eletroforética dos produtos amplificados com *primers* COS-EST-SRR separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com prata. M: marcador 10-pb; híbridos de sorgo (1: 1G100; 2: 1G220; 3: 1G233; 4: 1G244; 5: 1G282; 6: SS318; 7: 50A40); cultivares comerciais de cana (8: IACSP95-5000; 9: RB867517; 10: SP801842; 11: SP803250; 12: RB835054; 13: RB855453); clones de *S. officinarum* (14: Ajax; 15: Badila; 16: Badila de java; 17: Bourbon sur; 18: Creola; 19: Sabura); clones de *S. spontaneum* (20: Dacca; 21: Djantoerll; 22: Formosa; 23: Gehrabon e 24: Holes1)..... 50

- Figura 4 -** Dendrograma (UPGMA) baseado na dissimilaridade estimada pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard para 24 genótipos..... 52

CAPÍTULO III - MAPEAMENTO E ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES COS-EST-SSRs, gSSR e EST-SSR DE SORGO EM CANA-DE-AÇÚCAR

- Figura 1 -** Padrão de amplificação obtido para o locus COS-EST-SSR2, por eletroforese em gel de poliacrilamida. M-marcador de peso molecular (10pb); LS-linhagem de sorgo; P1-genitor feminino (IACSP95-3018); P2-genitor masculino (IACSP93-3046) e 54 indivíduos da população de mapeamento..... 74
- Figura 2 -** Mapa de ligação de cana-de-açúcar integrado para a população derivada do cruzamento bi-parental entre os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046. Os números superiores referem-se ao grupo de ligação (GL). Os números à esquerda são as distâncias em centiMorgans (cM) entre os marcadores. Os nomes dos marcadores estão à direita, seguidos pela sigla D1 (presente no IACSP95-3018), D2 (presente no IACSP93-3046) e C (presente em ambos os genitores). Os GL foram reagrupados com base na presença de marcadores derivados de um mesmo loco de microssatélite (loco definido pelo par de *primers* que flanqueia o microssatélite) formando os grupos de homologia (GH)..... 76
- Figura 3 -** Alinhamento dos grupos de ligação obtido a partir do cruzamento entre IACSP95-3018 e IACSP93-3046 com o mapa consenso do sorgo (http://sorgblast3.tamu.edu/linkage_groups.htm), MACE et al. (2009). A identificação do locus da cana e do sorgo encontra-se a direita do grupo de ligação de cada espécie. As linhas na diagonal entre os grupos de ligação da cana e do sorgo indicam a posição correspondente do locus..... 80

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis para a análise em plantas, marcadores do tipo microssatélites tem-se mostrado úteis em diversas aplicações, tanto na genética quanto no melhoramento, principalmente devido a sua reprodutibilidade e abundância no genoma. Estes marcadores representam sequências repetitivas compostas por motivos (1 a 6 pares de bases) repetidos lado a lado, e cujas sequências que o flanqueiam apresentam-se conservadas a ponto de permitir o desenho de um par de iniciadores de síntese específica (*primers*) para a sua amplificação via reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*).

Os Projetos de Sequenciamento das Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) de culturas de importância, tais como a cana-de-açúcar (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/>) e o sorgo (<http://www.phytozome.net>) têm permitido o desenvolvimento de microssatélites de forma rápida e econômica pela simples mineração de sequências repetitivas nos bancos de dados. Tais microssatélites por derivarem de ESTs são chamados de microssatélites funcionais (EST-SSRs) e são considerados de grande utilidade para acessar a diversidade a nível de genes expressos em coleções de germoplasma e também no mapeamento genético, visto que o polimorfismo gerado permite o mapeamento direto de genes expressos, os quais podem proporcionar a identificação de marcadores funcionais associados a características de interesse.

Os microssatélites derivados de sequências expressas (EST-SSRs) apresentam uma maior transferibilidade entre espécies correlacionadas podendo ser utilizados como marcadores âncoras no mapeamento comparativo (CABRERA et al., 2009).

Os bancos de dados de sequências expressas também têm permitido o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir de sequências ortólogas conservadas (*Conserved Orthologous Sequences-COS*) entre espécies correlacionadas. Os COS são definidos como uma coleção de genes de cópia única que são ortólogos entre espécies (JEONG et al., 2014). Genes de cópias únicas possibilitam o desenvolvimento de marcadores universais (âncoras) ou os chamados

Conserved Orthologous Markers. De acordo com esses autores, esses marcadores provenientes de sequências ortólogas conservadas podem ser utilizados em estudos de filogenia e mapeamento comparativo.

A cana-de-açúcar pertence à tribo *Andropogoneae*, família das gramíneas, cuja respectiva tribo, inclui também as gramíneas tropicais e subtropicais, tais como os cereais do gênero *Sorghum* e *Zea*. As cultivares atuais são híbridos interespecíficos complexos de elevado nível de ploidia ($2n = 100$ a 120 cromossomos) apresentando, em alguns casos, aneuploidia com segregação irregular (D'HONT et al., 1996; PIPERIDIS et al., 2010; SOBHAKUMARI, 2013). A complexidade e o conteúdo cromossômico variável do genoma da cana são as maiores preocupações no procedimento de sequenciamento do genoma (DILLON et al., 2007).

A complexidade genômica da cana-de-açúcar dificulta os trabalhos de mapeamento genético e a detecção de características de interesse agrônomo aos programas de melhoramento, especialmente quando os mapas desenvolvidos são construídos utilizando-se cultivares comerciais como genitores. Segundo Le Cunff et al. (2008) a otimização de sistemas de marcadores moleculares contribui para aumentar a eficiência no desenvolvimento de mapas genéticos de cana-de-açúcar e sua utilização no mapeamento de QTL, o que pode proporcionar avanços em estudos genéticos, genômicos e aplicações nos programas de melhoramento genético (JAMES et al., 2011).

Por outro lado, o sorgo é uma espécie diplóide ($2n=20$), com um genoma relativamente pequeno e com uma vasta adaptação a ambientes severos e tolerância às condições de estresse bióticos e abióticos, o que contribui para que seja apontada como uma importante cultura modelo (SINGH et al., 2013b). A utilização do genoma pequeno do sorgo como referência em estudos de mapeamento comparativo tem contribuído para acelerar a análise do genoma da cana-de-açúcar, principalmente em relação à detecção de QTL relacionados à resistência a doenças (MCINTYRE et al., 2005b) e parâmetros agroindustriais (JORDAN et al., 2004) obtidos através de marcadores provenientes de sondas heterólogas em ensaios de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*).

Nesse contexto, esse estudo apresenta o desenvolvimento de marcadores microsatélites ortólogos conservados (COS-EST-SSRs) entre cana e sorgo bem

como o mapeamento destes COS-EST-SSRs e de EST-SSRs de sorgo em uma população de mapeamento genético de cana-de-açúcar do Programa Cana IAC. Para o nosso conhecimento, até o presente momento, não foram desenvolvidos marcadores microssatélites ortólogos conservados derivados de sequências expressas (COS-EST-SSRs) entre cana-de-açúcar e sorgo.

5 CONCLUSÃO

A quantidade de grupos de ligação com baixo número de marcadores reforça a necessidade de uma maior cobertura do mapa de ligação do cruzamento bi-parental aqui apresentado.

Os marcadores ortólogos conservados (COS-EST-SSRs) entre cana-de-açúcar e sorgo aqui desenvolvidos podem ser utilizados no mapeamento genético da cana-de-açúcar visando estudos de mapeamento comparativo com o sorgo.

Os marcadores COS-EST-SSRs poderão ser integrados a mapas genéticos de referência, contribuindo para aumentar a quantidade de informações disponíveis para cana-de-açúcar e outras espécies relacionadas.

6 REFERÊNCIAS

AITKEN, K. S.; MCNEIL, M. D.; BERKMAN, P. J.; HERMANN, S.; KILIAN, A.; BUNDOCK, P. C.; LI, J. C. Comparative mapping in the Poaceae family reveals translocations in the complex polyploid genome of sugarcane. **Bmc Plant Biology**, v. 14, 2014a.

AITKEN, K. S.; MCNEIL, M. D.; HERMANN, S.; BUNDOCK, P. C.; KILIAN, A.; HELLER-USZYNSKA, K.; HENRY, R. J.; LI, J. C. A comprehensive genetic map of sugarcane that provides enhanced map coverage and integrates high-throughput Diversity Array Technology (DART) markers. **Bmc Genomics**, v. 15, 2014b.

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 3, p. 281-281, 1999.

ALWALA, S.; KIMBENG, C. A.; VEREMIS, J. C.; GRAVOIS, K. A. Identification of molecular markers associated with sugar-related traits in a *Saccharum* interspecific cross. **Euphytica**, v. 167, n. 1, p. 127-142, 2009.

ANDRU, S.; PAN, Y. B.; THONGTHAWEE, S.; BURNER, D. M.; KIMBENG, C. A. Genetic analysis of the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar 'LCP 85-384'. I. Linkage mapping using AFLP, SSR, and TRAP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 1, p. 77-93, 2011.

BANERJEE, N.; SIRAREE, A.; YADAV, S.; KUMAR, S.; SINGH, J.; KUMAR, S.; PANDEY, D. K.; SINGH, R. K. Marker-trait association study for sucrose and yield contributing traits in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Euphytica**, v. 205, n. 1, p. 185-201, 2015.

CHEN, J. W.; LAO, F. Y.; CHEN, X. W.; DENG, H. H.; LIU, R.; HE, H. Y.; FU, C.; CHEN, Y. S.; LIU, F. Y.; LI, Q. W.; JACKSON, P. DNA Marker Transmission and Linkage Analysis in Populations Derived from a Sugarcane (*Saccharum* spp.) x *Erianthus arundinaceus* Hybrid. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA DE AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CONSECANA. **Manual de instruções**. 5.ed. Piracicaba, 2006. 112p.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers: A first decade of research. **International Society of Sugar Cane Technologists, Vol II, Proceedings**, p. 556-559, 2001.

DU, Y.; CHU, H.; WANG, M.; CHU, I. K.; LO, C. Identification of flavone phytoalexins and a pathogen-inducible flavone synthase II gene (SbFNSII) in sorghum. **J Exp Bot**, v. 61, n. 4, p. 983-94, 2010.

FAHMY, E. M.; EL-GAWAD, N. M. A.; EL-GEDDAWY, I. H.; SALEH, O. M.; EL-AZAB, N. M. Development of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Egyptian Journal of Genetics And Cytology**, v. 37, n. 1, 2016.

HENRY, R. J. Basic Information on the Sugarcane Plant. In: HENRY, R. J.; KOLE, C. **GENETICS, GENOMICS AND BREEDING OF SUGARCANE**. New York: Science Publishers, 2010. cap. 1, p. 1-7.

IRMISCH, S.; ZELTNER, P.; HANDRICK, V.; GERSHENZON, J.; KOLLNER, T. G. The maize cytochrome P450 CYP79A61 produces phenylacetaldoxime and indole-3-acetaldoxime in heterologous systems and might contribute to plant defense and auxin formation. **BMC Plant Biol**, v. 15, p. 128, 2015.

JANNOO, N.; GRIVET, L.; CHANTRET, N.; GARSMEUR, O.; GLASZMANN, J. C.; ARRUDA, P.; D'HONT, A. Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome. **Plant J**, v. 50, n. 4, p. 574-85, 2007.

JORDAN, D. R.; CASU, R. E.; BESSE, P.; CARROLL, B. C.; BERDING, N.; MCINTYRE, C. L. Markers associated with stalk number and suckering in sugarcane colocate with tillering and rhizomatousness QTLs in sorghum. **Genome**, v. 47, n. 5, p. 988-993, 2004.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire Eugenetic**, Washington, v.12, p.172-175, 1944.

LIU, P.; CHANDRA, A.; QUE, Y.; CHEN, P.-H.; GRISHAM, M. P.; WHITE, W. H.; DALLEY, C. D.; TEW, T. L.; PAN, Y.-B. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content based on an enriched genetic linkage map of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) cultivar 'LCP 85-384'. **Euphytica**, v. 207, n. 3, p. 527-549, 2016.

LU, X.; ZHOU, H.; PAN, Y. B.; CHEN, C. Y.; ZHU, J. R.; CHEN, P. H.; LI, Y. R.; CAI, Q.; CHEN, R. K. Segregation analysis of microsatellite (SSR) markers in sugarcane polyploids. **Genet. Mol. Res.**, v. 14, p. 18384-18395, 2015.

MACE, E. S.; RAMI, J. F.; BOUCHET, S.; KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R.; KILIAN, A.; WENZL, P.; XIA, L.; HALLORAN, K.; JORDAN, D. R. A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high-throughput Diversity Array Technology (DART) markers. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.

MANCINI, M. C.; LEITE, D. C.; PERECIN, D.; BIDÓIA, M. A. P.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R. Characterization of the genetic variability of a sugarcane commercial cross through yield components and quality parameters. **Sugar Tech**, v. 14, n. 2, p. 119-125, 2012.

MANCINI, M. C. **MAPEAMENTO GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP, MICROSSATÉLITES GENÔMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR**. 2010. 113p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Jaboticabal.

MARGARIDO, G. R.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v.144(3), p.78-79, 2007.

MCINTYRE, C. L.; CASU, R. E.; DRENTH, J.; KNIGHT, D.; WHAN, V. A.; CROFT, B. J.; JORDAN, D. R.; MANNERS, J. M. Resistance gene analogues in sugarcane and sorghum and their association with quantitative trait loci for rust resistance. **Genome**, v. 48, n. 3, p. 391-400, 2005.

MCINTYRE, C. L.; GOODE, M. L.; CORDEIRO, G.; BUNDOCK, P.; ELIOTT, F.; HENRY, R. J.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; AITKEN, K. S. Characterisation of alleles of the sucrose phosphate synthase gene family in sugarcane and their association with sugar-related traits. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 3, 2015.

NUCCIO, M. L.; WU, J.; MOWERS, R.; ZHOU, H. P.; MEGHJI, M.; PRIMAVESI, L. F.; PAUL, M. J.; CHEN, X.; GAO, Y.; HAQUE, E.; BASU, S. S.; LAGRIMINI, L. M. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. **Nat Biotechnol**, v. 33, n. 8, p. 862-9, 2015.

PALHARES, A. C.; RODRIGUES-MORAIS, T. B.; VAN SLUYS, M. A.; DOMINGUES, D. S.; MACCHERONI, W.; JORDAO, H.; SOUZA, A. P.; MARCONI, T. G.; MOLLINARI, M.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; VIEIRA, M. L. C. A novel linkage map of sugarcane with evidence for clustering of retrotransposon-based markers. **Bmc Genetics**, v. 13, 2012.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, C. T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; MEHBOOB UR, R.; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 551-6, 2009.

PINTO, L. R.; GARCIA, A. A. F.; PASTINA, M. M.; TEIXEIRA, L. H. M.; BRESSIANI, J. A.; ULIAN, E. C.; BIDOIA, M. A. P.; SOUZA, A. P. Analysis of genomic and functional RFLP derived markers associated with sucrose content, fiber and yield QTLs in a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Euphytica**, v. 172, n. 3, p. 313-327, 2010.

PROVINCE, M. A. Sequential methods of analysis for genome scan. In: RAO, D. C.; PROVINCE, M. A. **Dissection of complex traits**. San Diego: Academic, p.578-583, 1999.

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.

SANTOS, F. R. C.; PINTO, L. R.; CARLINI-GARCIA, L. A.; GAZAFFI, R.; MANCINI, M. C.; GONCALVES, B. S.; MEDEIROS, C. N. F.; PERECIN, D.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P.; ZUCCHI, M. I. Marker-trait association and epistasis for brown rust resistance in sugarcane. **Euphytica**, v. 203, n. 3, p. 533-547, 2015.

SANTOS, F. R. **IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (*Puccinia melanocephala*) EM CANA-DE-AÇÚCAR**. 2013. 110p. Tese (Doutorado) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas.

SAS, SAS; GUIDE, STAT User's. SAS Institute Inc. **Cary, NC, USA**, 2008.

SEKHWAL, M. K.; SHARMA, V.; SARIN, R. Identification of MFS proteins in sorghum using semantic similarity. **Theory Biosci**, v. 132, n. 2, p. 105-13, 2013.

SINGH, R. K.; JENA, S. N.; KHAN, S.; YADAV, S.; BANARJEE, N.; RAGHUVANSHI, S.; BHARDWAJ, V.; DATTAMAJUMDER, S. K.; KAPUR, R.; SOLOMON, S.; SWAPNA, M.; SRIVASTAVA, S.; TYAGI, A. K. Development, cross-species/genera transferability of novel EST-SSR markers and their utility in revealing population structure and genetic diversity in sugarcane. **Gene**, v. 524, n. 2, p. 309-329, 2013a.

SINGH, R. K.; SINGH, R. B.; SINGH, S. P.; SHARMA, M. L. Identification of sugarcane microsatellites associated to sugar content in sugarcane and transferability to other cereal genomes. **Euphytica**, v. 182, n. 3, p. 335-354, 2011.

SINGH, R. K.; SINGH, S. P.; TIWARI, D. K.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, S. B.; SHARMA, M. L.; SINGH, R.; MOHAPATRA, T.; SINGH, N. K. Genetic mapping and QTL analysis for sugar yield-related traits in sugarcane. **Euphytica**, v. 191, n. 3, p. 333-353, 2013b.

SMITH, J. J.; KUMP, D. K.; WALKER, J. A.; PARICHY, D. M.; VOSS, S. R. A comprehensive expressed sequence tag linkage map for tiger salamander and Mexican axolotl: enabling gene mapping and comparative genomics in Ambystoma. **Genetics**, v. 171, n. 3, p. 1161-71, 2005.

WANG, J.; ROE, B.; MACMIL, S.; YU, Q.; MURRAY, J. E.; TANG, H.; CHEN, C.; NAJAR, F.; WILEY, G.; BOWERS, J.; VAN SLUYS, M. A.; ROKHSAR, D. S.; HUDSON, M. E.; MOOSE, S. P.; PATERSON, A. H.; MING, R. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, v. 11, p. 261, 2010.

WANG, M. L.; WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; YU, J. K.; DEAN, R. E.; NEWMAN, M. L.; SORRELLS, M. E.; PEDERSON, G. A. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, v. 3, n. 1, p. 45-57, 2005.

XIE, D. W.; WANG, X. N.; FU, L. S.; SUN, J.; ZHENG, W.; LI, Z. F. Identification of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in winter wheat and expression analysis under conditions of freezing stress. **Journal of genetics**, v. 94, n. 1, p. 55-65, 2015.

YU, H.; CONG, L.; ZHU, Z.; WANG, C.; ZOU, J.; TAO, C.; SHI, Z.; LU, X. Identification of differentially expressed microRNA in the stems and leaves during sugar accumulation in sweet sorghum. **Gene**, v. 571, n. 2, p. 221-230, 2015.