

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATELITES
GENÔMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A
PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Daniel Carvalho Leite

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2010

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

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATELITES
GENÔMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A
PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Daniel Carvalho Leite

Orientador: Prof. Dr. Dilermando Perecin

Co-orientadora: Dra. Luciana Rossini Pinto

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

Fevereiro de 2010

Leite, Daniel Carvalho
L533i Identificação de marcadores microssatélites genômicos e
funcionais associados a parâmetros agroindustriais em cana-de-
açúcar/ Daniel Carvalho Leite. -- Jaboticabal, 2010
x, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Dilermando Perecin
Banca examinadora: Silvana Aparecida Creste Dias de Souza,
Sandra Helena Unêda Trevisoli
Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Microssatélites. 3. Parâmetros
Agroindustriais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:631.52

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANIEL CARVALHO LEITE - nascido em 26 de maio de 1981 na cidade de Itumbiara, Goiás. Em 1999, ingressou na Faculdade Dr^o Francisco Maeda – FAFRAM – Ituverava, no Curso de Agronomia, graduando-se como Engenheiro Agrônomo em julho de 2004, e em Agosto de 2007, ingressou no programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal.

"Nós todos fazemos parte da grande família da humanidade e somos moradores em comum de uma imensa casa chamada terra. Não há outra forma senão nos entendermos. Não há por que não chegarmos a um entendimento através de um sincero diálogo. Ao menos devemos nos esforçar e nos empenhar ao máximo para isso. Quem não se esforça nesse sentido demonstra uma grande arrogância em relação as pessoas. Além disso, na maioria das vezes, existe por trás disso um espírito covarde que tenta proteger a si mesmo"

Daisaku Ikeda

*A Deus, pois sem Ele, nada seria possível
Aos meus pais José Luiz Leite e Maria Aparecida de Carvalho Leite
a minha irmã Priscilla Carvalho Leite
e a minha “filha” Ana Júlia Silva Rodrigues
pela força e compreensão em todos os momentos
desta e de outras caminhadas.*

Amo vocês

DEDICO

*Para meu Pai e minha Mãe,
obrigado pelo apoio e por acreditarem
que eu chegaria até o fim.
Mas vão ter que esperar
um pouco mais pelo carro*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado uma família maravilhosa.

A meus pais, na pessoa de **José Luiz Leite**, guerreiro e amigo, cuja conduta não tem igual, a **Maria Aparecida**, minha mãe, incentivadora e companheira inigualável, minha irmã **Priscilla Carvalho Leite**, pela amizade e solidariedade e a minha “filha” **Ana Júlia** símbolo de pureza e ternura, por alegrar minha vida. Amo vocês.

A todos da minha família (tios, tias, primas e primos) em especial a minha grande Avó **Aparecida de Carvalho** sempre presente nos momentos mais precisos. “Vó Cida” a Senhora é excepcional

A **Ana Rosa**, namorada, amiga e partícipe da minha vida.

Ao corpo clínico e funcionários do **Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII** em especial ao **Drº Antonio de Oliveira Talvane** e **Drº Gilberto Fava**, pela receptividade, apoio, atenção e disponibilidade no tratamento de saúde. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Dilermando Perecin** meu orientador, pela receptividade, um profissional exemplar e uma pessoa excepcional, cujos ensinamentos técnicos, com certeza balizarão a minha vida profissional futura.

A Pesquisadora **Drª. Luciana Rossini Pinto** do Centro de Cana localizado em Ribeirão Preto, minha co-orientadora, pela acolhida, pelos ensinamentos que transcenderam as exigências do seu papel e da sua responsabilidade.

Aos membros participantes da pré-banca: o **Prof. Dr. João Ademir de Oliveira** (FCAV – Jaboticabal) e a **Drª. Sandra Helena Unêda-Trevisoli** (FATEC – Jaboticabal) pelas sugestões e disponibilidade.

Aos membros participantes da banca examinadora: a **Dr^a. Silvana Aparecida Creste Souza** (IAC – Centro de Cana) e a **Dr^a. Sandra Helena Unêda-Trevisoli** (FATEC – Jaboticabal) pelas sugestões e disponibilidade.

Ao **Prof. Dr. Rinaldo César de Paula**, pela receptividade e apoio.

Aos demais professores da FCAV/UNESP, pela contribuição intelectual e exemplo profissional.

Ao **Centro de Cana – IAC** e a **Fazenda Nova Aliança**, pelo uso da infraestrutura de suas dependências para implantação do ensaio experimental.

Aos Pesquisadores do Centro de Cana **Dr. Marcos Landell**, **Dr. Ivan dos Anjos**, **Ms. Mauro Alexandre**, **Ms. Márcio Bidoia**, **Dr. Julio Garcia**, **Dr. Jeremias**, **Dr^a. Leila**, **Dr. Maximiliano**, **Dr. Carlos Azania** e a **Dr^a. Silvana Creste** pelos ensinamentos e incentivos para minha formação profissional.

Aos funcionários e estagiários do Centro de Cana que direta ou indiretamente colaboraram para realização desta etapa na minha vida, cujos nomes e rostos se confundem na hora de agradecer, e em especial **Thais Fávero**, **Bruna Sousa**, e **Carlos Alexandre** que durante a minha estada nunca se omitiram em esclarecer dúvidas e questionamentos relacionados à condução da pesquisa.

Aos que já passaram pelo laboratório, **Cristiane**, **Liliam**, **Klaus**, **Rafael**, **Patrícia**, **Juliana** e **Thales**, obrigado pela companhia.

Aos funcionários da Fazenda Nova Aliança que muito contribuíram para obtenção dos dados de campo. Valeu.

Aos meus amigos **Juliano Fracasso**, **Paulo Eduardo**, **Fabricio Zera**, **Ana Schiavetto**, **Maria Letícia**, **Tadeu Frigel**, **Ana Carolina**, **Cibele Nataliane**, **Vivi**, **João Henrique**, **Deborah**, **Camila**, **Melina**, **Alexandre**, **Luis Fernando** e **Flavinha** (muito obrigado, sempre, por tudo!), pela sólida amizade, carinho e apoio nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação pela troca de experiências, ensinamentos e bons momentos compartilhados, e em especial a **Maria Natália, Josiane Rodrigues e Lina Maria** pelo apoio e pelas risadas e descontração, sem isso tudo se tornaria muito mais difícil.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Exatas: **Juliana, Shirley, Zezé Norival** e ao **Alan R. Panosso** pela colaboração e amizade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas (PG/GMP), pelo apoio e contribuição em minha formação profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 07/57828-0) pelas bolsas MSI e MSII concedidas e auxílios financeiro.

A todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, inclusive aos que me esqueci de mencionar.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMO	VII
SUMMARY	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. ORIGEM DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	3
2.2. PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	4
2.3. MARCADORES DO TIPO MICROSSATÉLITES	6
2.4. MAPEAMENTO GENÉTICO E DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE EM CANA-DE-AÇÚCAR	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO.....	12
3.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO PARA OS PARÂMETROS AGROTECNOLÓGICOS.....	12
3.2.1. <i>Delineamento Experimental</i>	12
3.2.2. <i>Componentes de produção</i>	13
3.2.3. <i>Parâmetros de Qualidade</i>	14
3.2.4. <i>Análise estatística</i>	16
3.3. AVALIAÇÕES COM MARCADORES MOLECULARES	17
3.3.1. <i>Extração e quantificação do DNA genômico</i>	17
3.3.2. <i>Marcadores microssatélites</i>	18
3.4. CONSTRUÇÃO DO MAPA DE LIGAÇÃO	19
3.4.1. <i>Análise da segregação de marcadores em dose única (MDU)</i>	19

3.4.2. <i>Análise de ligação entre marcadores MDU</i>	20
3.5. ANÁLISE DE MARCAS SIMPLES	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO PARA OS PARÂMETROS AGROTECNOLÓGICOS.....	22
4.1.1. <i>Componentes de produção</i>	22
4.1.2. <i>Parâmetros de qualidade</i>	29
4.2. AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE MARCADORES GSSRs E EST-SSRs ENTRE OS GENITORES DA POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO	39
4.2.1. <i>Microsatelites funcionais (EST-SSRs)</i>	39
4.2.2. <i>Microsatelites genômicos (gSSRs)</i>	42
4.3. CONSTRUÇÃO DO MAPA DE LIGAÇÃO	45
4.3.1. <i>Análises de ligação entre marcadores em dose única</i>	46
4.4. ANÁLISE DE MARCAS SIMPLES	50
4.4.1. <i>Componentes de produção e produtividade</i>	52
4.4.2. <i>Parâmetros de qualidade</i>	58
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	GRAU DE LIBERDADE (GL), QUADRADO MÉDIO E OUTRAS ESTATÍSTICAS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE CANA PLANTA E CANA SOCA PARA OS COMPONENTES DE PRODUÇÃO: DIÂMETRO DE COLMOS (DC), PESO MÉDIO DOS COLMOS (PC), ALTURA DO COLMO (AC) E NÚMERO DE COLMOS (NC).	23
TABELA 2.	GRAU DE LIBERDADE (GL), QUADRADO MÉDIO E OUTRAS ESTATÍSTICAS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS PARÂMETROS DE QUALIDADE BRIX, POL%CANHA E FIBRA EM CANA PLANTA E CANA SOCA.....	30
TABELA 3.	GRAU DE LIBERDADE (GL), QUADRADO MÉDIO E OUTRAS ESTATÍSTICAS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE CANA PLANTA E CANA SOCA PARA TCH E TPH.....	34
TABELA 4.	VALORES REFERENTES AS MÉDIAS DE PROGENIES (XPOP), MÉDIAS DOS RESPECTIVOS GENITORES E AMPLITUDE (AMP) OBTIDOS PARA OS CARACTERES NÚMERO DE COLMOS (NC), DIÂMETRO DE COLMOS (DC), ALTURA (ALT), BRIX, POL, FIBRA E TCH EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE MAPEAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	38
TABELA 5.	NÚMERO DE MARCAS OBTIDAS (ALELOS) PARA CADA EST-SSRs AVALIADO E SUA PROVÁVEL SEGREGAÇÃO COMO (1:1 OU 3:1) NA AMOSTRA UTILIZADA.	40
TABELA 6.	NÚMERO DE MARCAS OBTIDAS (ALELOS) PARA CADA GSSRs SELECIONADO E SUA PROVÁVEL SEGREGAÇÃO (1:1 OU 3:1) NA AMOSTRA UTILIZADA.....	43
TABELA 7.	RELAÇÃO DE MARCADORES EM DOSE ÚNICA QUANTO A SUA ORIGEM.	45
TABELA 8.	COMPARAÇÃO ENTRE OS MARCADORES EM DOSE ÚNICA (MDU) OBTIDOS NAS POPULAÇÕES SP80-180 x SP80-4966 E IACSP95-3018 x IACSP93-3046.....	46
TABELA 9.	COMPARAÇÃO ENTRE OS MAPAS DE LIGAÇÃO DOS CRUZAMENTOS IACSP95-3018 x IACSP93-3046, SP80-180 x SP80-4966 E JJ76-514 x Q165.	47

TABELA 10.	RELAÇÃO DE MARCADORES EM DOSE ÚNICA CONFORME SUA ORIGEM, EM RELAÇÃO À ANÁLISE DE LIGAÇÃO.....	47
TABELA 11.	RELAÇÃO DOS EST-SSRs COM SUAS RESPECTIVAS HOMOLOGIAS.....	52
TABELA 12.	ANÁLISE DE MARCAS SIMPLES PARA OS COMPONENTES DE PRODUÇÃO (DIÂMETRO, ALTURA, PESO E NUMERO DE COLMOS) AVALIADOS EM CANA PLANTA E CANA SOCA, COM OS RESPECTIVOS EFEITOS E OS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO PARCIAL EXPRESSO EM PORCENTAGEM R^2 (%).	55
TABELA 13.	ANÁLISE DE MARCAS SIMPLES PARA PRODUTIVIDADE DE CANA (TCH) E PRODUTIVIDADE DE AÇÚCAR POR HECTARE (TPH) AVALIADOS EM CANA PLANTA E CANA SOCA, COM OS RESPECTIVOS EFEITOS E OS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO PARCIAL EXPRESSO EM PORCENTAGEM R^2 (%).	57
TABELA 14.	ANÁLISE DE MARCAS SIMPLES PARA OS PARÂMETROS DE QUALIDADE (BRIX, POL E FIBRA) AVALIADOS EM CANA PLANTA E CANA SOCA, COM OS RESPECTIVOS EFEITOS E OS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO PARCIAL EXPRESSO EM PORCENTAGEM R^2 (%).	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	CROQUI DE CAMPO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO.....	15
FIGURA 2.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO COMPONENTE DE PRODUÇÃO DIÂMETRO DO COLMO EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.	25
FIGURA 3.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO COMPONENTE DE PRODUÇÃO PESO DO COLMO EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.	26
FIGURA 4.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO COMPONENTE DE PRODUÇÃO ALTURA DO COLMO EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.....	27
FIGURA 5.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO COMPONENTE DE PRODUÇÃO NÚMERO DE COLMO EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.	28
FIGURA 6.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO PARÂMETRO DE QUALIDADE BRIX EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.....	31
FIGURA 7.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO PARÂMETRO DE QUALIDADE POL%CANHA EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.....	32
FIGURA 8.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO PARÂMETRO DE QUALIDADE FIBRA EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.....	33
FIGURA 9.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA PRODUTIVIDADE (TCH) EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.....	36

FIGURA 10.	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA PARA TPH (ACIMA) EM 220 INDIVÍDUOS DERIVADOS DO CRUZAMENTO IACSP95-3018 E IACSP93-3046.	37
FIGURA 11.	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO ENTRE OS GENITORES E AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO PARA OS EST-SSRs: A) SCC30 E B) SCB56, RESPECTIVAMENTE.....	42
FIGURA 12.	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO ENTRE OS GENITORES E AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO PARA OS GSSRs: A) SMC31CUC E B) SMC1047HA, RESPECTIVAMENTE.	44
FIGURA 13.	MAPA DE LIGAÇÃO OBTIDO PARA O CRUZAMENTO ENTRE IACSP95-3018 E IACSP93-3046.....	48

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES GÊNOMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - A produção de açúcar por hectare constitui o foco principal dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar e depende tanto da produção da cana colhida no campo como da concentração de açúcar (sacarose) contida no colmo. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores microssatélites genômicos e funcionais associados aos componentes de produção (altura, diâmetro, peso e número de colmos), produtividade e parâmetros de qualidade em cana-de-açúcar (Brix, Fibra, Pol%Cana), com base em uma progênie proveniente do cruzamento entre o clone IACSP95-3018 e a cultivar IACSP93-3046 ambos do Programa de Melhoramento Cana IAC. O mapa de ligação foi composto por 175 marcadores em dose única distribuídos em 58 grupos de ligação (GL) com cobertura de 1525 centiMorgans e distância média entre os marcadores de 8,71 centiMorgans. O comprimento dos grupos de ligação variou de 1 a 72 centiMorgans. Os 58 GL deram origem a 9 grupos de homologia. Com os marcadores em dose única foi feita uma análise de marca simples para a identificação de QTLs putativos associados as medidas fenotípicas obtidas em cana planta e cana soca. No total foram detectadas 69 (25%) associações marcador/característica fenotípica ($P < 0.05$) das quais, 32 (46%) em cana planta, 37 (54%) cana soca e 6 (9%) em ambos os ciclos. Estas associações foram derivadas de 47 locos de microssatélites. Para os componentes de produção e produtividade foram encontradas 38 associações e duas em ambos os ciclos (planta e soca) enquanto para os parâmetros de qualidade foram detectadas 22 associações e duas em ambos os ciclos. Para os marcadores derivados de seqüências expressas, algumas associações mostraram uma relação entre a função do gene do qual o marcador foi derivado com a característica fenotípica associada. Para estas associações, apesar dos marcadores terem apresentado

efeitos de baixa magnitude, é provável que tais marcadores contribuam para a característica fenotípica em questão.

Palavras chave: cana-de-açúcar, microssatélites, parâmetros agroindustriais

IDENTIFICATION OF GENOMIC AND FUNCTIONAL MICROSATELLITES MARKERS ASSOCIATED TO TECHNOLOGICAL PARAMETERS IN SUGARCANE

SUMMARY – Sugar production per hectare is the main focus of sugarcane breeding programs and depends on the sugarcane production harvest in the field and the sugar content (sucrose) of the stalk juice. The objective of the present work was to identify genomic and functional microsatellites markers associated to yield components (height, diameter, weight and stalk number), productivity and quality parameters (Brix, Fibre, Pol%Cane) in a progeny derived from a cross of the elite clone IACSP95-3018 and the variety IACSP93-3046, both from the IAC Sugarcane Breeding Program. The genetic map was composed by 175 single dose markers distributed onto 58 linkage groups (LG). The map coverage was 1525 centiMorgans with an average distance between markers of 8.71 centiMorgans (cM) and length of the LG ranging from 1 to 72 cM. The 58 LG gave rise to 9 homology groups. Single marker trait association analysis was performed with the single dose markers to identify putative QTLs associated with the phenotypic measures obtained at plant cane and ratoon cane. A total of 69 (25%) marker/trait associations ($P < 0.05$) was detected, of which, 32 (46%) at plant cane, 37 (54%) at ratoon cane and 6 (9%) at both cycles. These associations were derived from 47 microsatellite loci. For the yield components and productivity 38 associations were found and 2 at both cycles while for the quality parameters 22 associations were detected and 2 at both cycles. For the EST derived markers, some associations showed a relation between the function of the gene of which it was derived with the phenotypic trait. For such associations, although the marker effects were low, it is probable that these markers contribute to the respective phenotypic trait.

Key words: sugarcane, microsatellites, technological parameters

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) está entre as culturas de maior importância econômica no mundo, constituindo uma das principais fontes de produção de açúcar e álcool. No Brasil, a biomassa energética oriunda da cultura da cana-de-açúcar representa a base para o agronegócio sucroalcooleiro, o qual movimenta cerca de 36 bilhões de reais por ano e constituem um dos setores de maior geração de empregos diretos e indiretos no país. Este cenário torna o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, participando com 25% da produção (www.camda.com.br).

Os programas de melhoramento de cana-de-açúcar têm como objetivo principal a obtenção de novos cultivares que aumentem os lucros ou reduzam as perdas para os produtores, por um longo período de tempo, BRESSIANI (2001). O foco principal do melhoramento da cana-de-açúcar é a produção de açúcar por hectare (TPH) a qual depende da produtividade em termos de toneladas de cana por hectare (TCH) e da quantidade de açúcar da cultivar (POL). Além disso, a recomendação de plantio de cultivares melhoradas adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas (solo e clima), boa capacidade de rebrota, ausência de florescimento e resistência ou tolerância a pragas e doenças colaboram para aumentar a produtividade. Entretanto, a seleção de clones superiores é um processo caro e demorado que consome em média 12 anos. Estes clones são selecionados a partir de populações derivadas de cruzamentos entre dois clones elites (cruzamentos bi-parentais) ou mais (policruzamentos). Os clones são propagados de forma vegetativa e avaliados em sucessivos ensaios durante as várias etapas do programa de melhoramento antes de serem liberados como cultivar, CALIJA et al. (2001).

Atualmente, os marcadores moleculares constituem uma ferramenta valiosa, de grande potencial para os programas de melhoramento genético. A construção de mapas genéticos de ligação, utilizando marcadores moleculares,

pode auxiliar na elaboração de estratégias a serem introduzidas em programas de melhoramento, de forma a acelerar o desenvolvimento de novas cultivares. Uma das aplicações diretas da construção de mapas genéticos é a localização de genes de importância econômica ou locos de características quantitativas – QTLs, EDWARDS et al. (1992).

Em cana-de-açúcar, o banco de dados das etiquetas de seqüências expressas (SUCEST) tem viabilizado o desenvolvimento de marcadores funcionais para serem aplicados no mapeamento genético, PINTO et al. (2004), OLIVEIRA et al. (2007). A utilização de marcadores moleculares derivados de ESTs permite que “genes candidatos”, envolvidos em uma determinada via metabólica, sejam associados a características agrônomicas de interesse. Esses marcadores são considerados ideais para seleção assistida, já que os mesmos podem ser os responsáveis pela característica em questão, CATO et al. (2001); MA et al. (2004).

Devido à natureza co-dominante, marcadores microssatélites são úteis, principalmente em organismos poliplóides, como no caso da cana-de-açúcar, para alocar os grupos de ligação nos respectivos grupos de homologia além de permitirem comparações com os demais mapas disponíveis para a espécie.

Neste contexto, a presente pesquisa tem como objetivo identificar marcadores moleculares associados com os parâmetros agroindustriais, tais como: Brix, Fibra, Pol%Cana e produtividade, com base em uma progênie proveniente de cruzamento bi-parental, entre o clone IACSP95-3018 e a cultivar IACSP93-3046 do Programa de Melhoramento Cana IAC. Para tanto foram utilizados marcadores moleculares do tipo microssatélites genômicos (gSSRs) desenvolvidos pelo Consórcio Internacional de Biotecnologia da Cana-de-Açúcar, ROSSI et al. (2003) e microssatélites provenientes de seqüências expressas (EST-SSRs), os quais apresentam homologia com genes de interesse em cana-de-açúcar. Alguns destes EST-SSRs representam genes candidatos relacionados às características agrônomicas a serem avaliadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae* e gênero *Saccharum*. Existem pelo menos seis espécies do gênero sendo quatro classificadas por Jeswiet em 1925 como *Saccharum spontaneum*, *Saccharum officinarum*, *Saccharum barberi* e *Saccharum sinense*; e duas descritas por ARTSCHWAGER e BRANDES em 1958 para o mesmo gênero, as quais foram classificadas como *Saccharum edule* e *Saccharum robustum*.

Quanto ao centro de origem, relatos de diversos autores afirmam que as espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático restringindo as regiões das Ilhas do Arquipélago da Polinésia, Nova Guiné e da Índia. Segundo ROACH e DANIELS (1987), Nova Guiné apresenta maior diversidade para *Saccharum officinarum* e *Sacharum robustum* enquanto a China para *Saccharum sinense* e o norte da Índia para *Saccharum barberi*.

A espécie *Saccharum spontaneum* L. ($2n=40-128$), apresenta são plantas de menor porte, colmos curtos e finos, fibrosos e praticamente sem açúcar, porém apresentam vigor, dureza, perfilhamento, capacidade de rebrota de soqueira, resistência a condições adversas, doenças e pragas, oferecendo grande contribuição ao melhoramento.

Por sua vez, *Saccharum officinarum* L. ($2n=80$) representa a espécie-base dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, em que se buscam colmos suculentos, bom teor de sacarose, boa pureza do caldo e teor de fibra adequado para moagem.

A espécie *Saccharum barberi* Jesw. ($2n=81-124$), provavelmente surgiu da introgressão de *S. officinarum* com *Erianthus* sect. *Ripidium*. As plantas dessa

espécie possuem porte médio a baixo, colmos finos, fibrosos e pobres em sacarose e também são pouco exigentes em relação ao solo.

A *Saccharum sinense* Roxb. ($2n=111-120$), provavelmente surgiu da introgressão de *S. officinarum* com *Miscanthus*, ou com *S. spontaneum*, na China. Suas plantas têm como características colmos finos, fibrosos e regularmente ricos em sacarose e são pouco exigentes quanto ao solo.

Por sua vez, *Sacchaum robustum* Jesw. ($2n=60-250$), possivelmente, derivou da introgressão de *S. spontaneum* com outros gêneros na região da Nova Guiné. Suas plantas possuem porte alto, são muito fibrosas e muito pobres em sacarose, de modo que são pouco participativas nos híbridos atuais.

Por fim, *Saccharum edule* ($2n=60-80$) é resultado da introgressão de *S. officinarum* ou *S. robustum* com outros gêneros. Alguns cultivares são restritos a nova Guiné e ilhas vizinhas. Essa espécie possui uma inflorescência entumecida com flores utilizadas na alimentação humana.

De acordo com relatos CAIRO (1924); LIPPMAN (1942) e LIMA (1984) a cana-de-açúcar chegou ao Brasil no ano de 1500 expandindo-se rapidamente pelo Nordeste, mais precisamente na Bahia, Piauí, Alagoas e Paraíba contribuindo com o desenvolvimento do país, CAIRO (1924), CALMON (1935) e CORRÊA (1935) e com o início da agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil.

2.2. Parâmetros Agroindustriais em cana-de-açúcar

A produção de açúcar constitui o foco principal dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar e depende tanto da produção da cana colhida no campo como da concentração de açúcar (sacarose) contida no colmo, JORDAN et al. (2004).

A produção de açúcar por hectare (TAH ou TPH) é um dos caracteres mais importantes para o melhoramento da cana-de-açúcar. A produção de açúcar por

hectare envolve os componentes: tonelagem de cana por hectare (TCH) e teor de açúcar da cana (POL da cana) sendo obtida pelo produto destes dois componentes, isto é, $TPH = (TCH \times POL)/100$. O componente TCH é composto pelo número de colmos por hectare e peso do colmo, o qual, por sua vez, é composto pelo diâmetro, altura e densidade.

Os parâmetros tecnológicos Brix%, Pol%Cana e Fibra são também os mais importantes para indicar a qualidade da cana-de-açúcar, SILVA (1996). O pagamento da cana-de-açúcar, por exemplo, é feito com base no teor de sacarose contido no caldo da cana. O Brix, parâmetro mais utilizado na indústria do açúcar e do álcool, expressa a porcentagem dos sólidos solúveis contidos em uma solução pura de sacarose, FERNANDES (2000). Este parâmetro, medido em refratômetro, é a unidade de escala que pelo índice de refração da luz, expressa a porcentagem em peso dos sólidos dissolvidos em uma solução açucarada a 20⁰, LOPES (1986), SILVA (1996). Entretanto, no Brix são expressos, não apenas a sacarose, mas todos os sólidos solúveis (açúcares e não açúcares) presentes no caldo. Por outro lado, o Pol, definido como a quantidade em peso de sacarose em 100 ml de solução, a qual é medida pelo desvio ótico provocado pela solução, no plano de uma luz polarizada, LOPES (1986), SILVA (1996), reflete a concentração de sacarose presente na cana.

A fibra % Cana refere-se à matéria insolúvel em água contida no colmo da cana-de-açúcar. Ela inclui toda a matéria estranha que acompanha os colmos. A quantidade de fibra exerce influência direta na moagem da cana, uma vez que altas porcentagens de fibra refletem em uma baixa quantidade de caldo extraído e, portanto baixa produção de açúcar. Em geral, os caracteres fibra e pol apresentam-se negativamente correlacionados, entretanto existe variação quanto ao grau de correlação destes caracteres entre diferentes materiais, o que pode permitir a seleção de cultivares com altos níveis de Pol e valores adequados de fibra. Atualmente, há um interesse crescente no aumento da produção do bagaço para a co-geração de energia como a utilização da fibra no processo de hidrólise (enzimática ou ácida) na produção de etanol.

O sucesso de um programa de melhoramento depende, entre outros fatores, da herdabilidade dos caracteres em questão. Brix e Pol apresentam alta herdabilidade, tal que estes caracteres, respondem positivamente a seleção. Segundo HOGARTH (1987), a característica teor de sacarose, medida como Brix, aparentemente, não apresenta depressão por endogamia sendo que a maior parte da variância genética tem sido apontada como aditiva. Na etapa de *seedlings* os coeficientes de herdabilidade considerando plantas individuais são baixos devendo-se a seleção de plantas individuais ser feita apenas para os caracteres de alta herdabilidade como, por exemplo, o Brix. Por outro lado, Fibra % Cana tem mostrado baixa herdabilidade. Valores de herdabilidade no sentido restrito, em torno de 0,38 foram estimados a partir da análise de variância de cruzamentos biparentais (14 famílias) entre cultivars comerciais e clones de *S. spontaneum*, BADALOO & RAMDOYAL (2003).

A tonelagem de cana por hectare (TCH), também apresenta baixa herdabilidade. Na maioria dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, na fase de *seedlings*, a seleção visual é praticada de forma indireta baseando-se nos caracteres secundários para selecionar o caráter principal, ou seja, em respostas correlacionadas à produção. Desta forma, nesta fase a seleção é feita sobre os componentes de produção, tais como, a altura da planta, diâmetro e número de perfilhos como também o Brix, BRESSIANI (2001).

2.3. Marcadores do tipo Microssatélites

Os microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) são seqüências compostas, em geral por 1 a 6 pares de bases que são repetidas lado a lado (em tandem) cerca de oito ou mais vezes. Os SSRs representam regiões do genoma, que estão sob alterações mutacionais, geralmente adições ou deleções de um número integral de repetições à taxas muito maiores do que as observadas nas seqüências de DNA não repetitivo, JARNE & LAGODA (1996). A instabilidade dos

microssatélites resulta em locos polimórficos que são extremamente úteis, principalmente, em estudos de mapeamento. Tal polimorfismo aparece quando os alelos diferem quanto ao número de repetições em tandem no segmento amplificado.

O polimorfismo dos marcadores microssatélites é revelado pela PCR - reação em cadeia da polimerase, através da amplificação do DNA genômico total utilizando dois *primers* únicos compostos de sequências curtas de nucleotídeos que flanqueiam e, portanto, definem o loco de microssatélite. Os produtos da amplificação obtidos de diferentes indivíduos podem ser separados em géis de agarose ou poliacrilamida. O valor dos microssatélites como marcadores é atribuído à sua natureza multialélica, herança codominante, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa, cobertura extensiva do genoma e necessidade de quantidades pequenas de DNA para dar início às reações, POWELL et al. (1996).

A presença de microssatélites em seqüências codantes foi relatada por WANG et al. (1994) analisando repetições de microssatélites (mononucleotídicas e tetranucleotídicas) nos bancos de dados de sequências de DNA (Genbank e EMBL) de diversas espécies vegetais.

Os bancos de dados de seqüências expressas (ESTs) têm permitido o desenvolvimento de marcadores microssatélites pela mineração de seqüências repetitivas no próprio banco de dados. Este tipo de estratégia representa uma forma simples, rápida e econômica de desenvolvimento de iniciadores de síntese específica (*primers*) flanqueadores de seqüências repetitivas (EST-SSRs).

Um levantamento conduzido no banco de dados do SUCEST revelou um total de 2005 agrupamentos contendo microssatélites (SSRs). A partir dos agrupamentos identificados, foi desenvolvido um conjunto de EST-SSRs, os quais após serem avaliados em um grupo de clones de cana-de-açúcar revelaram níveis de polimorfismo ligeiramente inferiores àqueles obtidos com microssatélites genômicos desenvolvidos pelo Consórcio de Biotecnologia da Cana-de-Açúcar, PINTO et al. (2004, PINTO et al. (2006).

Os EST-SSRs amplificam regiões conservadas do genoma e, portanto, apresentam uma maior transferibilidade entre espécies correlacionadas podendo ser usados com sucesso no mapeamento comparativo, YU et al. (2004). A alta repetibilidade dos SSRs aliado a natureza poliplóide da cana-de-açúcar faz deste tipo de marcador ideal para o estabelecimento de perfis únicos (*fingerprinting*) para proteção varietal.

Por revelarem os diferentes tipos de alelos de um loco, marcadores microssatélites são considerados co-dominantes, o que significa que em organismos diplóides, para cada loco avaliado pode-se distinguir entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos. Entretanto, em organismos poliplóides como a cana-de-açúcar, apesar deste tipo de marcador revelar todos os diferentes tipos de alelos presentes no loco, não é possível identificar o número de cópias (doses) em que cada alelo se encontra presente. Isto faz com que este marcador seja genotipado com base na presença e ausência de bandas (alelos) da mesma forma que um marcador dominante. Apesar disto, microssatélites são úteis, principalmente em organismos poliplóides, para alocar os grupos de ligação nos respectivos grupos de homologia além de permitirem comparações com os demais mapas disponíveis para a espécie.

Especialmente, em se tratando de SSRs desenvolvidos a partir de ESTs (EST-SSRs) o polimorfismo gerado pode permitir o mapeamento direto de genes expressos. A utilização de EST-SSRs com homologia a genes candidatos (envolvidos em uma determinada via metabólica) na detecção de QTLs podem proporcionar a identificação de marcadores funcionais associados a caracteres de interesse. Esses marcadores são considerados ideais para seleção assistida, já que os mesmos podem ser os responsáveis pela característica em questão, CATO et al. (2001); MA et al. (2004) não havendo perda da associação devido aos eventos de recombinação.

2.4. Mapeamento genético e detecção de marcadores moleculares associados a características de interesse em cana-de-açúcar

A construção de mapas genéticos de ligação, em poliplóides, tornou-se possível pela análise da segregação de marcadores em dose única. Neste método, o marcador em dose única está presente em uma única cópia, em apenas um dos dois genitores envolvidos em um cruzamento, apresentando segregação na progênie na proporção de 1:1, assim como em uma configuração de cruzamento teste, WU et al. (1992). Marcadores em dose única em ambos genitores segregando na progênie na proporção 3:1, embora menos informativos, também podem ser utilizados no mapeamento.

O primeiro mapa publicado para cana-de-açúcar foi derivado do cruzamento entre 'SES 208' (*S. spontaneum*) e seu duplo haplóide 'ADP 85-0068' empregando-se marcadores em dose única provenientes de ensaios de RFLP, DA SILVA et al. (1993) e RAPD, AL-JANABI et al. (1993). Marcadores dos tipos RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction fragment polymorphism*) e AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) foram utilizados na construção de um mapa de ligação entre *S. officinarum* 'LA Purple' e *S. robustum* 'Mol 5829' o qual serviu de base para detectar e mapear regiões genômicas associadas a QTLs referentes a número, diâmetro e peso do colmo, porcentagem (%) de colmos com inflorescência, (%) de colmos infectados com carvão (*Ustilago scitaminea*), (%) de fibra e teor de sacarose. Associações significativas para todos os caracteres avaliados foram detectadas, GUIMARÃES (1999).

Através de análises de marcas individuais (ANOVA e análise de regressão linear), associações significativas ($p < 0.005$) de marcadores AFLP com altura de colmo, diâmetro de colmo, número de perfilhos, brix (% no caldo), fibras (%), POL% na cana (PCC) e tonelagem de cana por hectare (TCH) foram detectadas em uma população de mapeamento derivada do cruzamento entre dois clones

elites do programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira, KIDO (2003).

Em termos de mapeamento genético em cana-de-açúcar, a população proveniente da autofecundação da cultivar R570 tem sido a mais explorada. Nesta população foi encontrado um marcador derivado da sonda CDSR29 associado ao gene de resistência a ferrugem (*Puccinia melanocephala*) segregando na proporção 3:1 (resistência : suscetibilidade), DAUGROIS et al. (1996). A este mesmo mapa foram adicionados marcadores AFLPs permitindo a cobertura aproximada de 33% do genoma (Hoarau et al. 2001) e a detecção de 40 alelos de características quantitativas (QTA's) para os componentes de produção altura da planta, número de colmos, diâmetro de colmos e Brix, HOARAU et al. (2002). Posteriormente, ROSSI et al. (2003) acrescentaram 148 marcadores representando 50 genes análogos de resistência (RGAs) sendo que dois RGAs geraram marcas próximas ao único gene de resistência da ferrugem reportado até o momento em cana-de-açúcar. Marcadores sítios de sequência alvo (STS) desenvolvidos para a enzima fosfoenol piruvato carboxilase (PEPC), a qual permite a fixação do CO₂ atmosférico na via fotossintética das plantas C₄, também foram mapeados na população R570 permitindo a localização de um grupo de genes da PEPC, BESNARD et al. (2003).

Marcadores AFLP e microssatélites genômicos foram utilizados no mapeamento de uma população (F₁) derivada do cruzamento entre IJ76-514 (*S. officinarum*) e uma cultivar comercial Australiana (Q165) proporcionando a formação de 116 grupos de ligação e uma cobertura de 9.058,3 centiMorgans, AITKEN et al. (2005).

Recentemente, marcadores funcionais (EST-SSRs e EST-RFLP) desenvolvidos a partir do Banco de dados do SUCEST foram mapeados em uma progênie bi-parental do cruzamento SP80-180 vs IAC80-4966 do programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira, OLIVEIRA et al. (2007), completando o mapa prévio, constituído exclusivamente por marcadores anônimos, GARCIA et al. (2006). Este trabalho proporcionou a elaboração do

primeiro mapa de cana-de-açúcar, com o maior número de marcadores funcionais, OLIVEIRA et al. (2007) já publicado até o momento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de mapeamento

A população utilizada para a construção do mapa genético é derivada do cruzamento bi-parental entre IACSP95-3018 (genitor feminino) e a cultivar IACSP93-3046 (genitor masculino) realizado no ano de 2004 na estação experimental do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Camamu (BA). Os genitores apresentam altas concentrações de alelos favoráveis para os componentes de produção, sendo que IACSP95-3018 apresenta suscetibilidade à ferrugem marrom, enquanto IACSP93-3046 possui resistência a esta doença. O genitor masculino faz parte das campanhas de cruzamentos do programa de melhoramento e foi lançado como cultivar em 2005. A progênie derivada deste cruzamento está sendo mantida no campo, no Centro de Cana de Ribeirão Preto do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e apresenta variabilidade para os componentes de produção percentual de Brix, perfilhamento e altura de colmos, além de resistência a doenças como, por exemplo, a ferrugem e mosaico.

3.2. Caracterização fenotípica da população de mapeamento para os parâmetros agrotecnológicos.

3.2.1. Delineamento Experimental

Os 220 indivíduos oriundos do cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046 foram avaliados para os parâmetros agrotecnológicos em um ensaio instalado em maio de 2007 na Fazenda Nova Aliança, pertencente a Companhia Açúcareira

Santa Eliza Vale, localizada na Zona Rural da cidade de Sales de Oliveira - SP. Este ensaio consistiu em um experimento em 4 blocos casualizados e cada parcela correspondia com um sulco de plantio de 2 metros (m) de comprimento e espaçamento de 1,5 m entre linhas tendo como tratamentos em cada bloco, os respectivos genitores e os padrões SP81-3250 e RB835486, estes com quatro repetições, além dos 220 indivíduos da progênie conforme o Croqui apresentado na Figura 1.

Os dados referentes à biometria deste ensaio foram coletados em julho de 2008 e agosto de 2009, respectivamente para cana planta e para cana soca. Foram levantados os dados referentes aos componentes de produção (número de colmos, altura e diâmetro), peso do feixe de 10 colmos, além dos parâmetros de qualidade brix, pol%Cana e fibra.

3.2.2. Componentes de produção

Os componentes de produção: número de colmos, diâmetro, altura e peso médio de colmos foram avaliados seguindo os critérios:

- a) Número de colmos: estimado com a contagem dos colmos em um metro central de cada parcela.
- b) Diâmetro do colmo: mensurado em uma amostra de dez colmos, com o paquímetro no meio do entrenó localizado no terço inferior do colmo;
- c) Altura do colmo: medido da base à inserção da folha +3, amostrando-se dez colmos seguidos na linha;
- d) Peso médio do colmo: estimado com balança analítica em um feixe de 10 colmos.

A produtividade de cana-de-açúcar em toneladas por hectare (TCH) foi estimada com base no número de colmos da parcela e no peso do feixe de 10 colmos, sendo:

$$TCH = \frac{Nperf \times Peso \times 6,666}{10}$$

onde: - Nperf: número de colmos por metro

- Peso: Peso do Feixe de 10 colmos

- 6,666: fator espaçamento e expansão para toneladas por hectare

3.2.3. Parâmetros de Qualidade

As medidas referentes aos parâmetros de qualidade (Brix, Pol%Cana e Fibra%) foram obtidas em uma amostra de 10 colmos coletadas de cada indivíduo (clone) em cana planta em julho de 2008 e em cana-soca em agosto de 2009 de acordo com os métodos de análise tecnológica descritos no guia da Consecana (2006). Em relação aos parâmetros de qualidade, Brix refere-se à estimativa de sólidos solúveis totais dissolvidos no sulco do colmo enquanto Pol%Cana é definido como a quantidade de sacarose em 100 ml de uma solução e fibra% refere-se a matéria insolúvel em água presente no colmo.

Pelo Pol%Cana (PC) e a produtividade (TCH) pôde-se obter a estimativa da tonelada de Pol por hectare (TPH), a qual foi calculada pela expressão:

$$TPH = \frac{PC \times TCH}{100}$$

IAC86-2480 (Linha infectora ferrugem)
IAC86-2210 (Linha infectora mosaico)



3.2.4. Análise estatística

As análises dos dados fenotípicos foi conduzida pelo programa SAS (SAS, Institute Inc., NC,USA,1999). A análise de variância foi conduzida para detectar os efeitos entre os blocos, os clones, os pais e os padrões como também para estimar o coeficiente de variação (CV%), erro (através do resíduo quadrático) e à média dos clones, pais e padrões.

O modelo simplificado foi assumido:

$$Y_{ij} = \mu + b_j + g_i + \varepsilon_{ij}$$

onde: Y_{ij} : valor fenotípico observado no tratamento i, avaliado na repetição j;

b_j : efeito do genótipo i

g_i : efeito da repetição j

ε_{ij} : efeitos ambientais e demais efeitos não controlados pelo genótipo i e repetição j

μ : média geral do experimento

Na seqüência, os efeitos de genótipos foram separados em efeitos de clones, de pais e de padrões, com auxílio de variáveis que as identificavam.

Usando o *Proc Varcomp Method = MIVEQUE0*, foram obtidas estimativas da variância de clones (variância genética) e da variância residual (variância ambiental), no caso, usando genótipos clones como efeitos aleatórios.

A herdabilidade no sentido amplo para cada caráter foi estimada através dos componentes de variância. A herdabilidade (h^2) foi obtida pela expressão:

$$h^2 = \frac{V_g}{V_f}$$

onde: - V_g : Variância genética

- V_f : Variância fenotípica, a qual é composta, de forma simplificada pela variância genética mais a ambiental ($V_f = V_g + \frac{V_e}{r}$) onde: V_e : variância ambiental e r : numero de repetições.

3.3. Avaliações com Marcadores Moleculares

3.3.1. Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico total foi obtido de 300 mg de tecido foliar liofilizado e moído utilizando o procedimento de extração com base no método do CTAB, HOISINGTON et al. (1994) com algumas modificações para cana-de-açúcar. O DNA de cada indivíduo foi quantificado na presença de um padrão de DNA do fago λ de quantidades conhecidas em gel de agarose 0.8% (p/v) corado com brometo de etídio.

3.3.2. Marcadores microssatélites

Inicialmente, os locos de microssatélites genômicos (gSSRs) e funcionais (EST-SSRs) foram avaliados quanto ao polimorfismo entre os genitores e uma amostra de 4 indivíduos da progênie. Os locos selecionados, os quais além de apresentarem o maior potencial em gerar marcadores em dose única (MDUs) produziram padrões de bandas de alta qualidade. Por isso avaliados em toda a população de mapeamento.

As reações de PCR foram efetuadas em um volume final de reação de 25 µl contendo 40 ng do DNA molde, 0.2µM de cada par de *primer* (*forward* e *reverse*), 100 µM de cada dNTP, 2.0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, e 0.5 unidades de Taq DNA polimerase. O programa de amplificação constou de uma desnaturação inicial à 94⁰C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, cada ciclo contendo uma etapa de desnaturação à 94⁰C por 30s, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* (*forward* / *reverse*) por 30s, extensão à 73⁰C por 30s, e um ciclo final à 73⁰C por 3 minutos. Os produtos da amplificação foram misturados com tampão formamida (contendo 98% formamida; 10 mM EDTA; 0.025% azul de bromofenol; 0.025% xileno cianol) na proporção (2 tampão :1 amostra) e desnaturados à 95⁰C por 5 minutos. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% utilizando um padrão de peso molecular de 10 pb (pares de bases). As bandas foram reveladas pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por CRESTE et al. (2001).

3.4. Construção do mapa de ligação

3.4.1. Análise da segregação de marcadores em dose única (MDU)

Para a análise da segregação dos marcadores em dose única, os indivíduos da progênie de mapeamento e os genitores foram genotipados com base na presença (1) e ausência (0) do marcador. Para cada marca foi aplicado o teste estatístico qui-quadrado (χ^2) adotando-se nível de significância ($\alpha=0,05$) para avaliar a distorção de segregação em relação às proporções 1:1 e 3:1 com posterior correção de Bonferroni conforme a expressão:

$$\chi^2 = \frac{\sum (f_{obs} - f_{esp})^2}{f_{esp}}$$

onde: χ^2 – qui-quadrado

f_{obs} – frequência observada

f_{esp} – frequência esperada

Assumindo 1 grau de liberdade

Foram avaliadas as segregações em relação às proporções 1:1 (marcador em dose única em apenas um dos genitores) e 3:1 (marcador em dose única em ambos os genitores) para todos os marcadores obtidos com os EST-SSRs e gSSRs avaliados na população de mapeamento.

Para identificar a origem da marca em relação ao genitor, aos marcadores presentes no genitor IACSP95-3018 (genitor feminino) e ausente no genitor IACSP93-3046 (genitor masculino) foi adicionado “D1” no final do nome do marcador, aos marcadores ausentes no genitor IACSP95-3018 (genitor feminino)

e presentes no genitor IACSP93-3046 (genitor masculino), foi adicionado “D2”, e aos marcadores comuns a ambos genitores foi adicionado C.

3.4.2. Análise de ligação entre marcadores MDU

O mapa de ligação foi elaborado utilizando o programa JoinMap adotando-se um LOD mínimo de 3,0, para a ligação entre marcadores, um LOD mínimo de 3,0 para ordenação das marcas e fração máxima de recombinação (r) de 0,45. As distâncias entre marcadores, dadas em centimorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi.

3.5. Análise de marcas simples

A análise de marcas simples foi conduzida com os dados fenotípicos avaliados em cana-planta, em julho de 2008 e em cana soca, em agosto de 2009 no ensaio experimental conduzido na Fazenda Nova Aliança em Sales de Oliveira, SP.

Foram utilizados passos, adaptados com simplificações do que é utilizado por GILMOUR (2007):

- I. Obtenção de valores fenotípicos ajustados para efeitos do delineamento experimental, na tentativa de obter valores tais como se fossem obtidos em parcelas uniformes livres de efeitos de blocos e da ausência de informações (perda de parcelas). Para isso foram usados modelos lineares e o ajuste foi obtido utilizando o Programa SAS.
- II. Seleção de alelos ou marcas associadas (direta ou indiretamente) a cada um dos atributos fenotípicos. Para cada atributo fenotípico, as marcas com

seus valores 0 (ausência) e 1 (presença) foram simultaneamente utilizadas em um modelo de regressão linear múltipla, com seleção do tipo “stepwise”, utilizando o programa SAS. Nessa primeira seleção foram utilizados indivíduos genotipados para os 514 alelos e escolhidos os que respondem por 99% do R^2 (proporção da variação fenotípica explicada pelo marcador). O poder explicativo em termos de R^2 múltiplo foi obtido usando um modelo de regressão linear múltiplo, com os alelos escolhidos para cada atributo fenotípico. Com essa seleção eliminam-se alelos muitos dependentes ou ligados ou “sombra”. Isso minimiza efeitos de falsas associações e a necessidade de correções do tipo Bonferroni e outras (que, no geral são muito conservadoras). Com os alelos ou marcas pré-selecionados há uma boa idéia da influência simultânea do conjunto de alelos.

- III. Com esses alelos pré-selecionados utilizou-se novamente um modelo de regressão linear múltipla, com seleção do tipo “stepwise”, para selecionar os alelos significativos,
- IV. Na seqüência, usando modelos de regressão linear simples, para cada atributo fenotípico em função de cada alelo ou marca, foram determinados os efeitos de marcas simples, ou seja, qual o aumento (+) ou a diminuição (-) fenotípica esperada predita, pela presença do alelo e seu respectivo R^2 simples, sem isolar influências simultâneas de outros alelos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização fenotípica da população de mapeamento para os parâmetros agrotecnológicos.

4.1.1. Componentes de produção

A análise de variância referente aos componentes de produção, assim como a estimativa da variância fenotípica (σ^2_F), genética (σ^2_g), ambiental (σ^2_A), coeficiente de herdabilidade (h^2), médias de cada um dos genitores (IACSP95-3018; IACSP93-3046), entre os genitores ($\bar{X}_{\text{genitores}}$) como da progênie de mapeamento ($\bar{X}_{\text{clones}}$) obtidos em cana planta e cana soca estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Grau de liberdade (gl), quadrado médio e outras estatísticas da análise de variância de cana planta e cana soca para os componentes de produção: diâmetro de colmos (DC), peso médio dos colmos (PC), altura do colmo (AC) e número de colmos (NC).

FV	gl	DC		PC		AC		NC	
		CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS
Blocos	3	0,39**	0,77**	38,26**	37,89**	23042,03**	10802,91**	51,31*	56,39*
Clones	219	0,20**	0,24**	19,44**	11,52**	2049,63**	1360,42**	15,12*	41,18**
Genitores	1	0,41*	0,00025 ^{ns}	43,71**	0,05 ^{ns}	1104,50 ^{ns}	361,54 ^{ns}	12,50 ^{ns}	134,85*
σ^2_F		0,45	0,10	8,18	5,02	1010,52	634,68	12,75	17,53
σ^2_g		0,40	0,05	3,86	2,26	355,40	247,67	0,78	7,69
σ^2_A		0,05	0,05	4,32	2,76	655,12	387,01	11,97	9,84
h^2		0,77	0,80	0,78	0,77	0,68	0,72	0,21	0,76
CV (%)		8,07	8,93	19,21	19,89	12,63	10,56	28,69	25,78
IACSP95-3018		2,97	2,62	14,64	10,48	224,31	195,07	11,06	10,33
IACSP93-3046		2,75	2,62	12,30	10,56	212,56	188,50	12,31	14,50
$\bar{X}_{\text{genitores}}$		2,86	2,62	13,47	10,52	218,44	191,68	11,69	12,48
$\bar{X}_{\text{clones}}$		2,72	2,43	10,97	8,28	203,55	182,92	12,12	12,21
Amplitude		1,98 a	1,76 a	4,55 a	2,20 a	131,50 a	118,25 a	7,00 a	0,09 a
Clones		3,50	3,19	18,83	14,50	282,50	225,50	17,50	21,50

CP: cana planta; CS: cana soca; σ^2_F : variância fenotípica; σ^2_g : variância genética; σ^2_A : variância ambiental; h^2 : herdabilidade sentido amplo; CV: coeficiente de variação; $\bar{X}_{\text{genitores}}$: média dos genitores (IACSP95-3018 e IACSP93-3046); $\bar{X}_{\text{clones}}$: média dos clones; *Significância a nível de 5%; **Significância a nível de 1%; ns: não significativo (Teste F).

Embora entre os genitores, diferenças significativas tenham sido detectadas apenas para os componentes, diâmetro do colmo e peso de colmo em cana planta e número de colmos em cana soca. Diferenças significativas aos níveis de 5% e 1% ($P < 0,05$; $P < 0,01$) foram detectadas entre os indivíduos da progênie (clones) para todos os componentes de produção tanto em cana planta como em cana soca. Tal resultado demonstra a existência de variabilidade genética na progênie de mapeamento a ser utilizada nas análises de associações entre os marcadores moleculares e os componentes de produção.

No geral, as estimativas de herdabilidade no sentido amplo apresentaram valores altos para todos os componentes de produção tanto em cana planta como em cana soca, indicando que grande parte da variação fenotípica observada foi de

natureza genética. Exceção foi observada para o número de colmos (NC) em cana planta cujo valor de herdabilidade foi baixo (0,21) refletindo forte influência do ambiente na avaliação desta característica. De acordo com SINGH et al. (1995), em cana-de-açúcar o componente NC é sensível as flutuações ambientais, apresentando, em geral, baixa herdabilidade comparado ao comprimento e diâmetro do colmo.

A distribuição de freqüência dos indivíduos da população de mapeamento para os componentes de produção diâmetro do colmo, peso do colmo, altura do colmo e numero de colmos em cana planta e cana soca estão apresentadas nas figuras 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

Para diâmetro dos colmos, mensurado em centímetros, os valores das progênies para cana planta variaram entre 1,98 a 3,50 com média equivalente a 2,72 cm; e para cana soca variaram entre 1,76 a 3,19 com média equivalente a 2,43 cm (Tabela 1). Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores médios de 2,97 e 2,75 cm em cana planta e de 2,62 cm para ambos em cana soca (Figura 2).

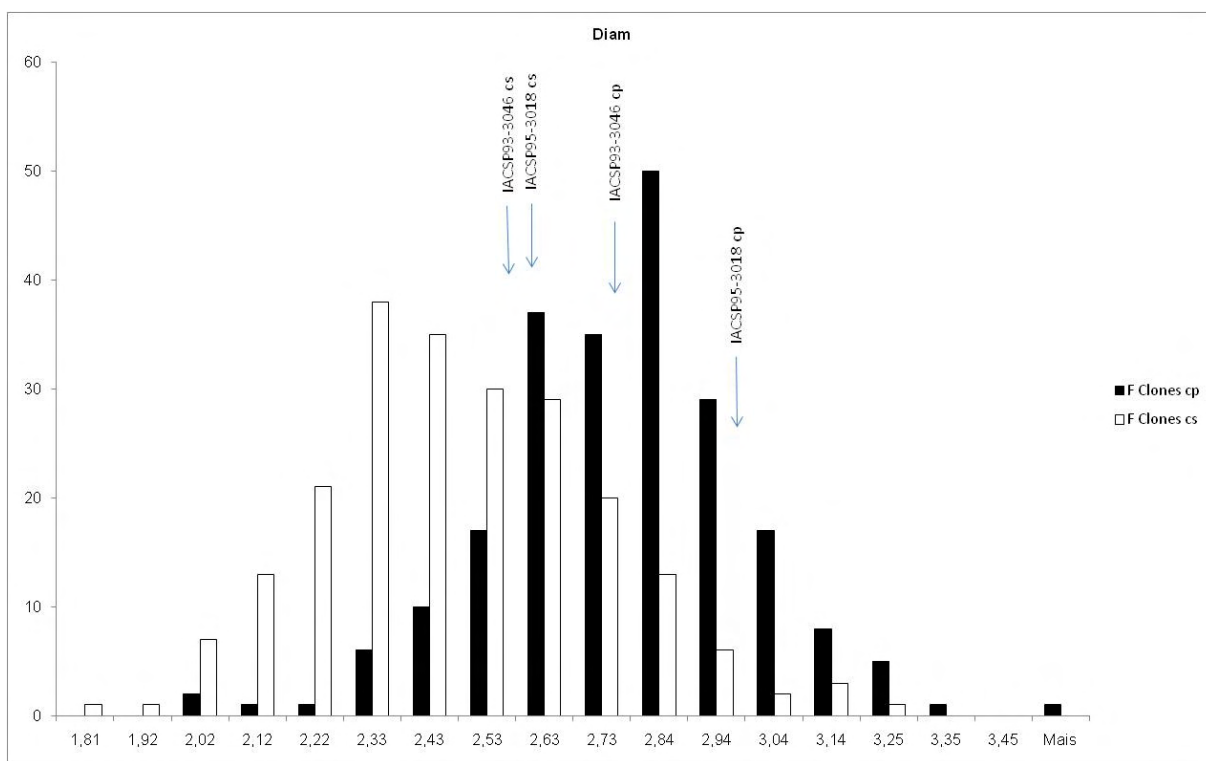


Figura 2. Distribuição de frequência do componente de produção diâmetro do colmo em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

Para peso médio dos colmos, estimado com base no peso de um feixe composto por 10 canas, os valores da progênie em cana planta variaram entre 4,55 a 18,83 kg com média equivalente a 10,97 kg; e em cana soca os valores variaram entre 2,20 a 14,50 kg com média equivalente a 8,28 kg (Tabela 1). Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores de 14,64 e 12,30 kg em cana planta e cana soca valores de 10,48 e 10,56 kg (Figura 3).

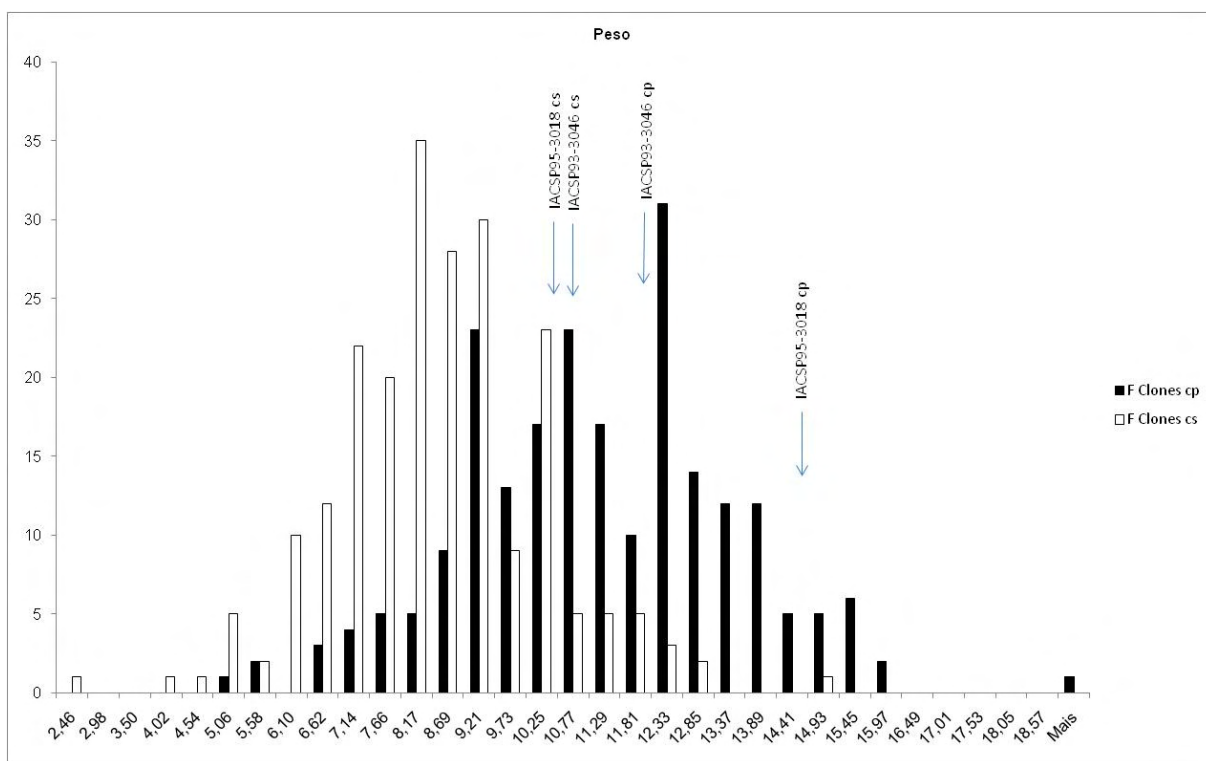


Figura 3. Distribuição de frequência do componente de produção peso do colmo em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

Em relação ao componente, altura dos colmos (mensurado em centímetros), os valores da progênie em cana planta variaram entre 131,50 a 282,50 cm com média equivalente a 203,55 cm e em cana soca entre 118,25 a 225,50 cm com média equivalente a 182,92 cm (Tabela 1). Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores de 224,31 e 212,56 cm em cana planta e valores de 195,07 e 188,50 cm para cana soca (Figura 4).

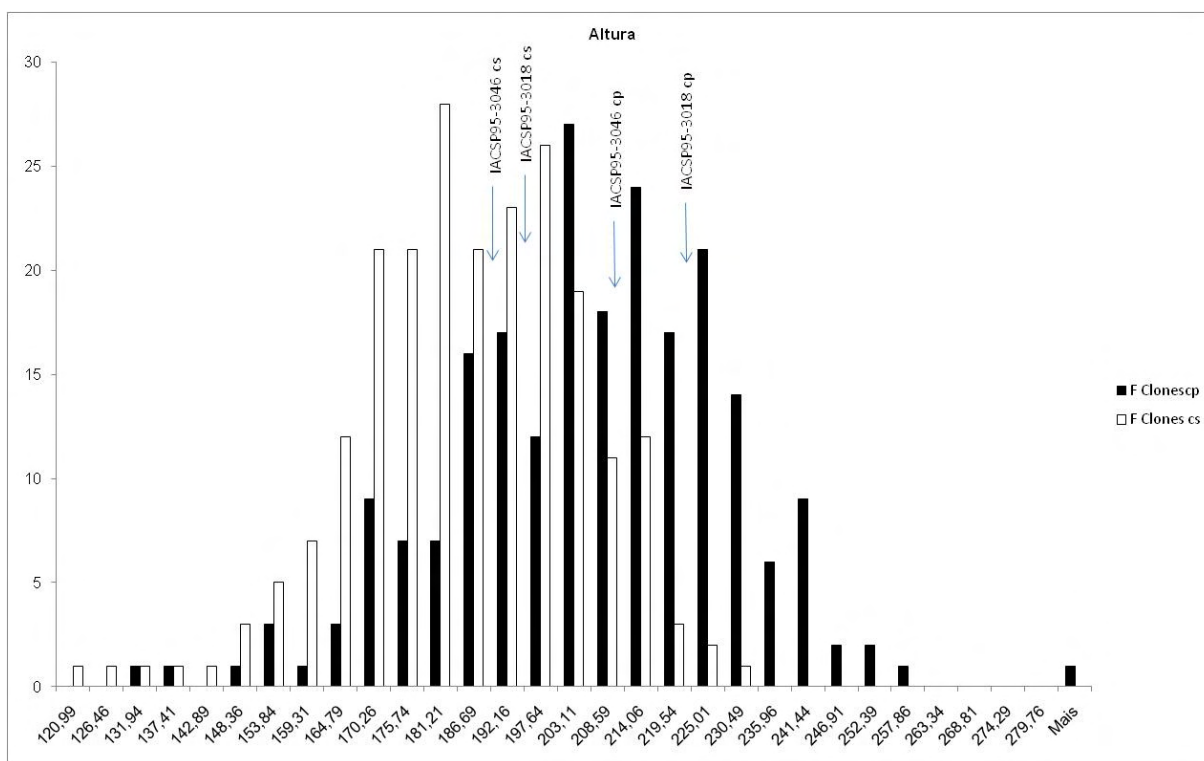


Figura 4. Distribuição de freqüência do componente de produção altura do colmo em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

Os valores médios obtidos para número de colmos entre os indivíduos da progênie de mapeamento para cana planta variaram de 7 a 17,50 colmos m^{-1} com média de 12,12; e para cana soca de 0,09 a 21,50 colmos m^{-1} com média de 12,21 (Tabela 1). Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores para cana planta de 11,06 e 12,31 colmos m^{-1} e cana soca de 10,33 e 14,50 colmos m^{-1} (Figura 5).

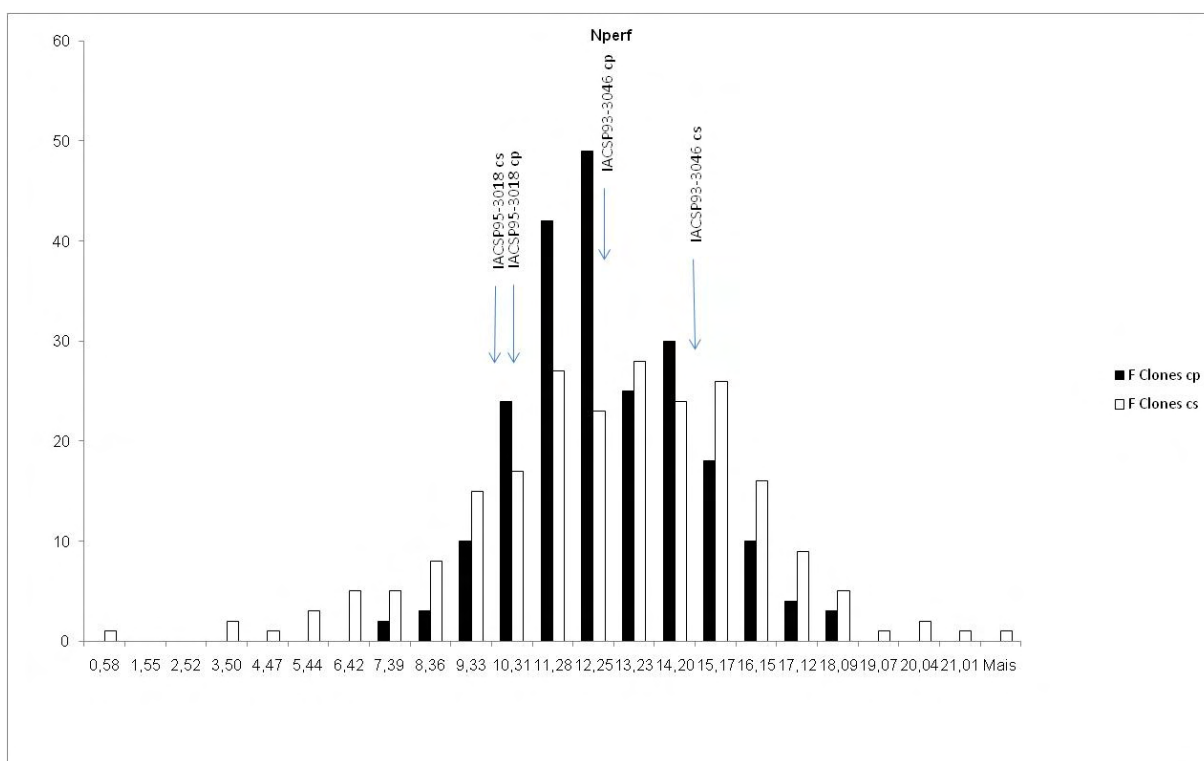


Figura 5. Distribuição de frequência do componente de produção número de colmo em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

Para todos os componentes de produção, a distribuição obedeceu a uma curva normal (Figura 2, Figura 3, Figura 4 e Figura 5) observando na progênie, tanto indivíduos com valores inferiores como superiores, isto é, segregantes extremos, aos genitores. Pela distribuição de frequência, verifica-se também que, no geral, houve uma redução dos valores obtidos para todos os componentes de produção em cana soca em relação à cana planta.

4.1.2. Parâmetros de qualidade

A análise de variância de cana planta e cana soca referente aos parâmetros de qualidade (Brix, Pol%Cana, Fibra%) assim como a estimativa da variância fenotípica (σ^2_F), genética (σ^2_g), ambiental (σ^2_A), coeficiente de herdabilidade (h^2), médias de cada um dos genitores (IACSP95-3018; IACSP93-3046), entre os genitores ($\bar{X}_{\text{genitores}}$) como da progênie de mapeamento ($\bar{X}_{\text{clones}}$) obtidos em cana planta e cana soca estão apresentados na Tabela 2.

Conforme a análise de variância (Tabela 2), diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade foram detectadas entre os indivíduos da progênie (clones) para Brix, Pol%Cana e Fibra embora entre os genitores, não foram detectadas diferenças significativas entre os caracteres estudados, tanto para cana planta como para cana soca.

Tabela 2. Grau de liberdade (gl), quadrado médio e outras estatísticas da análise de variância para os parâmetros de qualidade Brix, Pol%Cana e fibra em cana planta e cana soca.

FV	gl	Brix		Pol%Cana		Fibra	
		CP	CS	CP	CS	CP	CS
Blocos	3	23,78**	23,37**	12,84**	7,67*	1,17 ^{ns}	13,08**
Clones	219	1,38**	1,92**	1,36**	1,74**	1,53**	1,75**
Genitores	1	0,42 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,00422 ^{ns}	2,11 ^{ns}	3,79 ^{ns}	0,90 ^{ns}
σ^2_F		0,99	1,35	1,03	1,24	1,17	1,11
σ^2_g		0,42	0,59	0,34	0,52	0,40	0,66
σ^2_A		0,57	0,76	0,69	0,72	0,77	0,45
h^2		0,59	0,61	0,49	0,59	0,51	0,75
CV (%)		3,64	4,16	5,41	5,29	7,17	5,25
IACSP95-3018		20,75	21,81	15,78	17,33	12,33	12,08
IACSP93-3046		21,08	21,58	15,75	16,56	13,30	12,54
$\bar{X}_{\text{genitores}}$		20,91	21,69	15,76	16,92	12,81	12,33
$\bar{X}_{\text{clones}}$		20,79	21,06	15,61	16,03	12,84	12,88
Amplitude		18,30 a	17,84 a	13,01 a	12,08 a	10,78 a	10,31 a
Clones		23,30	23,33	17,85	18,02	15,75	15,52

CP: cana planta; CS: cana soca; σ^2_F : variância fenotípica; σ^2_g : variância genética; σ^2_A : variância ambiental, h^2 herdabilidade amplo; CV: coeficiente de variação; $\bar{X}_{\text{clones}}$: média de clones; $\bar{X}_{\text{genitores}}$: média dos genitores (IACSP95-3018 e IACSP93-3046). *Significância a nível de 5%; **Significância a nível de 1%; ns: não significativo; (Teste F).

Os coeficientes de herdabilidade para Brix (0,59), Pol%Cana (0,49), Fibra (0,51) em cana planta foram concordantes com os relatados para estes caracteres na literatura. Entretanto, KIDO (2003) obteve coeficientes de herdabilidade respectivamente, de 82% e 84% para Pol%Cana e Fibra, referentes a cana planta (primeiro corte) no ensaio de mapeamento do cruzamento SP80-180 x SP80-4966. Os mesmos caracteres avaliados em cana soca apresentaram coeficientes de herdabilidade para Brix, Pol%Cana e Fibra, respectivamente de 61%, 59% e 75%.

As distribuições de frequências para os parâmetros de qualidade estão apresentadas nas figuras 6, 7 e 8.

Para o Brix, os valores das progênes em cana planta variaram entre 18,30% a 23,30% com média equivalente a 20,79% enquanto os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram valores, respectivamente de 20,75 e 21,08%. Em cana soca os valores variaram entre 17,84% a 23,33% com média equivalente a 21,69% enquanto os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram valores, respectivamente de 21,81% e 21,58% (Tabela 2, Figura 6).

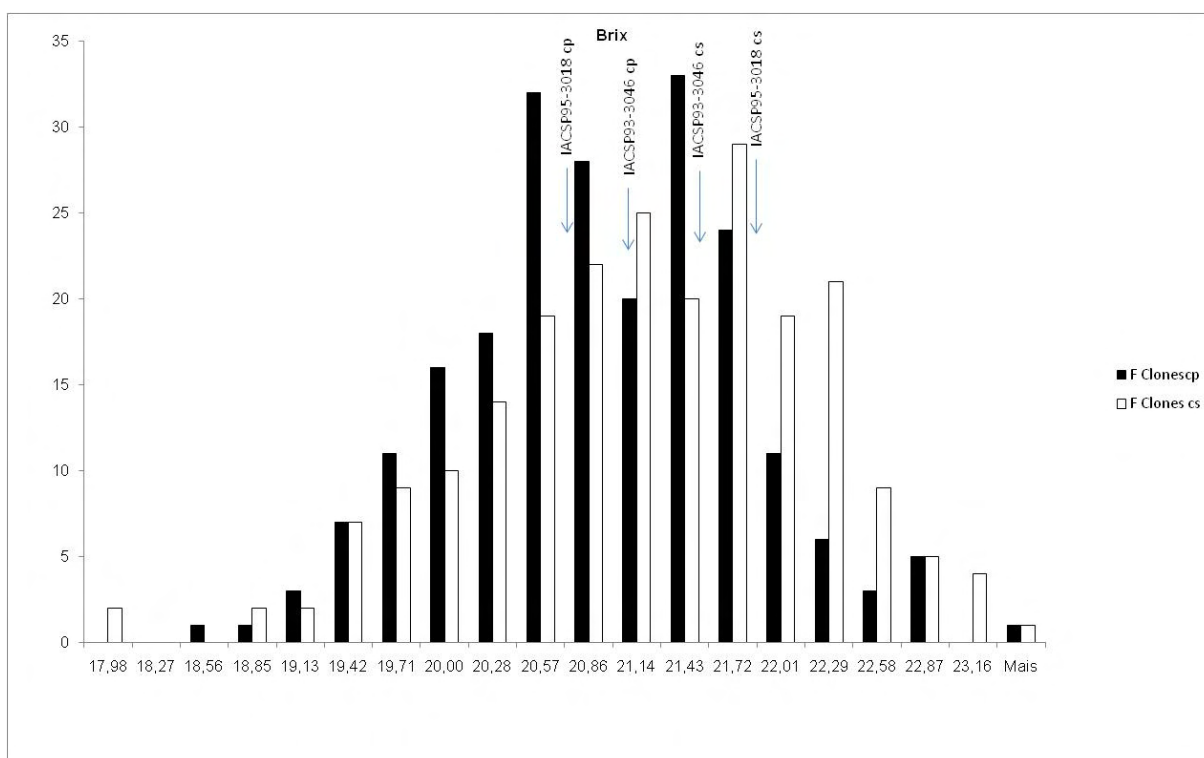


Figura 6. Distribuição de frequência do parâmetro de qualidade Brix em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

Para a Pol%Cana, os valores das progênes em cana planta variaram entre 13,01% a 17,85% com média equivalente a 15,61%. Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores médios de 15,78 e 15,75% em cana planta, enquanto em cana soca os valores da progênie variaram entre 12,08% a 18,02% com média equivalente a 16,03%. Os genitores IACSP95-

3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores médios de 17,33% e 16,56% (Tabela 2, Figura 7).

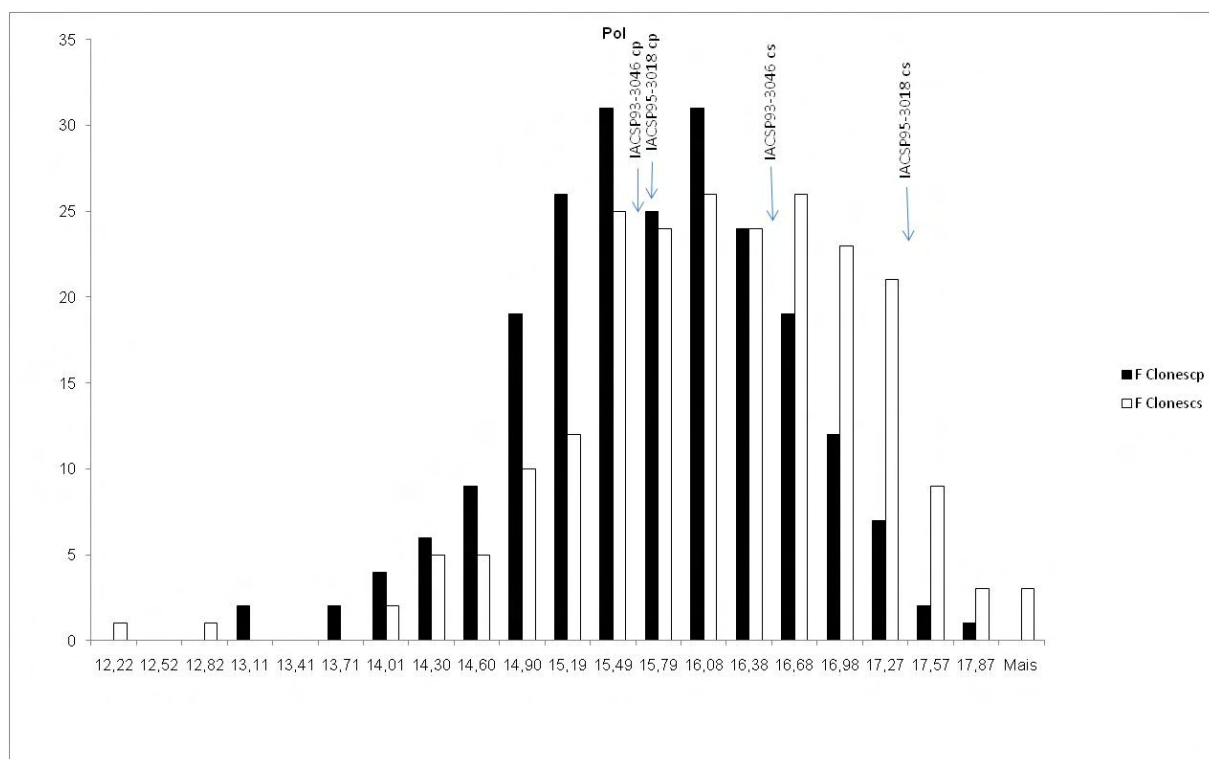


Figura 7. Distribuição de frequência do parâmetro de qualidade Pol%Cana em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

O valor menor de Pol%Cana observado na progênie (12,08 %) foi inferior ao valor de Pol%Cana mínimo, satisfatório para industrialização em diferentes cultivares de cana, o qual é de 13,00% (Silva, 1996).

Para a Fibra, os valores das progênies em cana planta variaram entre 10,78% a 15,75% com média equivalente a 12,84%. Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores médios de 12,33% e 13,30%. Em cana soca os valores da progênie variaram entre 10,31% a 15,52% com média equivalente a 12,88%. Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores médios de 12,08% e 12,54%. Os valores de fibra obtidos na progênie estão dentro dos limites recomendados para seleção

nos programas de melhoramento correspondendo entre os valores de 10 a 14% (Silva, 1996) (Tabela 2, Figura 8).

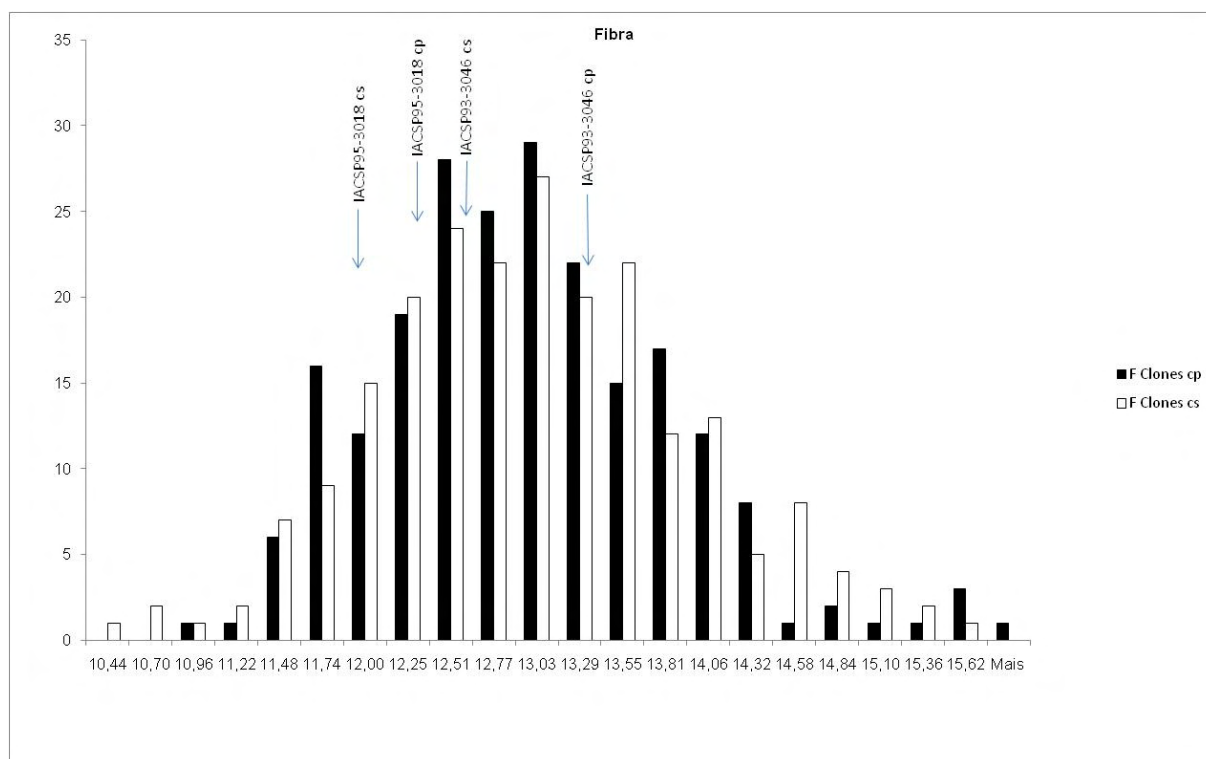


Figura 8. Distribuição de freqüência do parâmetro de qualidade Fibra em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

A análise de variância referente ao TCH e, conseqüentemente TPH, assim como a estimativa da variância fenotípica (σ^2_F), genética (σ^2_g), ambiental (σ^2_A), coeficiente de herdabilidade (h^2), médias de cada um dos genitores (IACSP95-3018; IACSP93-3046), entre os genitores ($\bar{X}_{\text{genitores}}$) como da progênie de mapeamento ($\bar{X}_{\text{clones}}$) obtidos em cana planta e cana soca estão apresentados na Tabela 3.

Conforme a análise de variância (Tabela 3), diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade foram detectadas entre os indivíduos da progênie (clones) para TCH em cana planta e cana soca. Diferença significativa foi

encontrada entre os indivíduos da progênie (clones) para TPH com dados obtidos de cana soca.

Tabela 3. Grau de liberdade (gl), quadrado médio e outras estatísticas da análise de variância de cana planta e cana soca para TCH e TPH.

FV	gl	TCH		TPH	
		CP	CS	CP	CS
Blocos	3	7622,06*	4062,53**	647,48**	59,65 ^{ns}
Clones	219	1755,03**	1681,55**	36,77 ^{ns}	36,36**
Genitores	1	393,79 ^{ns}	6559,35*	46,79 ^{ns}	185,62*
σ^2_F		1252,49	801,60	33,71	25,40
σ^2_g		173,89	292,46	3,23	10,86
σ^2_A		1078,60	509,14	30,48	14,54
h^2		0,39	0,70	0,18	0,60
CV (%)		37,25	33,65	41,31	35,40
IACSP95-3018		108,08	72,61	14,35	10,43
IACSP93-3046		101,06	101,82	17,77	17,52
$\bar{X}_{\text{genitores}}$		104,57	87,69	16,06	14,21
$\bar{X}_{\text{clones}}$		88,82	68,28	13,61	10,91
Amplitude clones		27,06 a	5,83 a	2,49 a	0,89 a
		148,79	121,39	31,83	27,21

TCH: toneladas de cana por hectare; TPH: toneladas de pol por hectare; cp: cana planta; cs: cana soca; σ^2_F : variância fenotípica; σ^2_g : variância genética; σ^2_A : variância ambiental, h^2 herdabilidade amplo; CV: coeficiente de variação; $\bar{X}_{\text{clones}}$: média de clones; $\bar{X}_{\text{genitores}}$: média dos genitores (IACSP95-3018 e IACSP93-3046); *Significância a nível de 5%, **Significância a nível de 1%; ns: não significativo; (Teste F).

O valor elevado (41,31) do coeficiente de variação para TPH não permitiu a detecção de diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, para os indivíduos da progênie (clones).

Para TCH e, conseqüentemente TPH, os valores de herdabilidade foram baixos, respectivamente, 39% (0,39) e 18% (0,18) em cana planta em virtude do valor alto do CV (37,25% e 41,31%) respectivamente. Tal valor, em parte, pode ser atribuído às condições climáticas atípicas do ano de condução do ensaio, com períodos de estiagem bem pronunciadas. Entretanto, em cana soca, diferenças significativas a nível de 1% foram detectadas entre os indivíduos da população de mapeamento (Tabela 3).

Os valores médios obtidos para a produtividade, expressos em termos de tonelada de cana por hectare (TCH), entre os indivíduos da progênie de mapeamento para cana planta variaram de 27,06 a 148,79 t ha⁻¹ com média de 88,82 t ha⁻¹. Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores de 108,08 e 101,06 t ha⁻¹. Em cana soca os valores médios obtidos entre os indivíduos da progênie variaram entre 5,83 a 121,39 t ha⁻¹ com média de 68,28 t ha⁻¹, e os genitores valores de 72,61 t ha⁻¹ e 101,82 t ha⁻¹ respectivamente para IACSP95-3018 e IACSP93-3046 (Tabela 3, Figura 9).

Estes valores médios obtidos para produtividade tanto em cana planta como em cana soca estão de acordo com os dados observados por PINTO et al (2009), em uma população de 100 progênies derivados do cruzamento bi-parental entre SP80-180 x SP80-4966.

As distribuições de frequências para Toneladas de Cana por Hectare (TCH) e Toneladas de Pol por Hectare (TPH) estão apresentadas nas figuras 9 e 10 respectivamente.

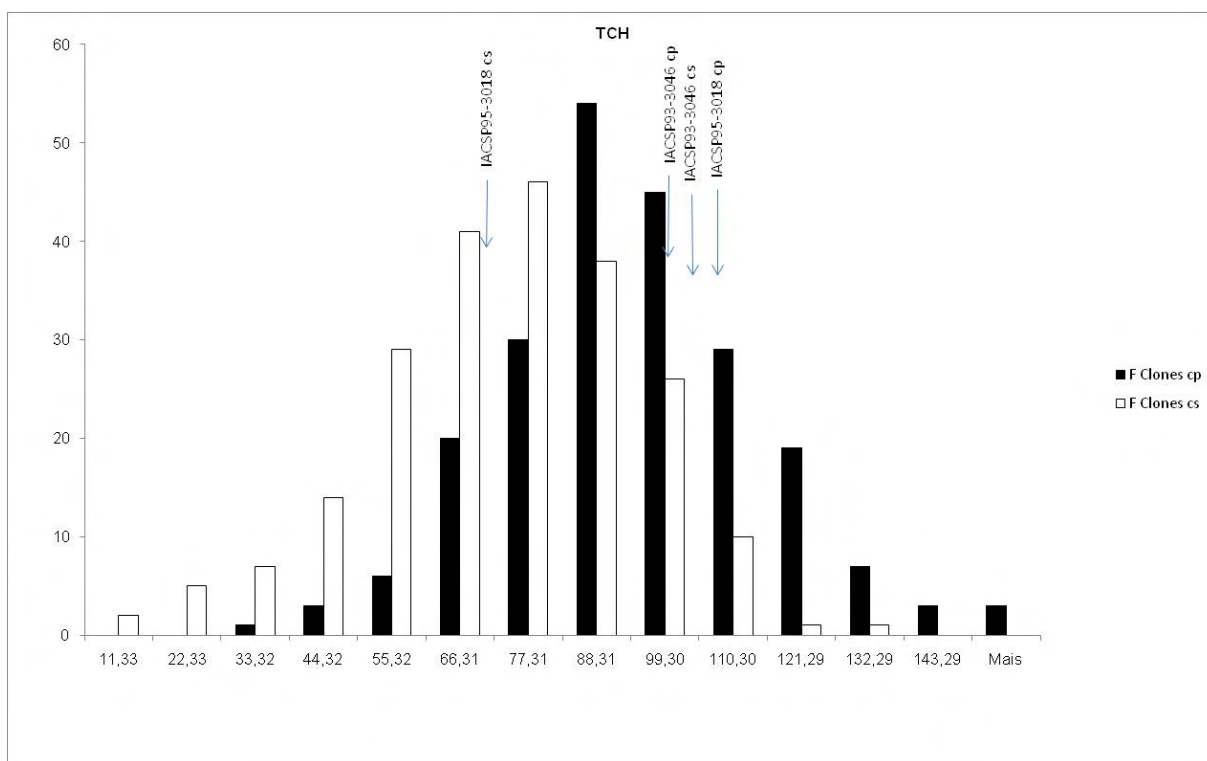


Figura 9. Distribuição de freqüência da produtividade (TCH) em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

A tonelada de pol por hectare (TPH) é o parâmetro utilizado para a seleção de clones durante as fases do programa de melhoramento de cana, uma vez que considera tanto a produtividade quanto o teor de açúcar do material. Em relação ao parâmetro toneladas de Pol por hectare, os valores médios obtidos em cana planta para os indivíduos da progênie variaram de 2,49 a 31,83 t pol ha⁻¹ com média 13,61 t pol ha⁻¹. Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores de 14,35 e 17,77 t pol ha⁻¹. Em relação aos valores médios obtidos em cana soca para os indivíduos da progênie estes variaram de 0,89 a 27,21 t pol ha⁻¹ com média 10,91 t pol ha⁻¹. Os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046 apresentaram, respectivamente, valores de 10,43 e 17,52 t pol ha⁻¹ (Tabela 3, Figura 10).

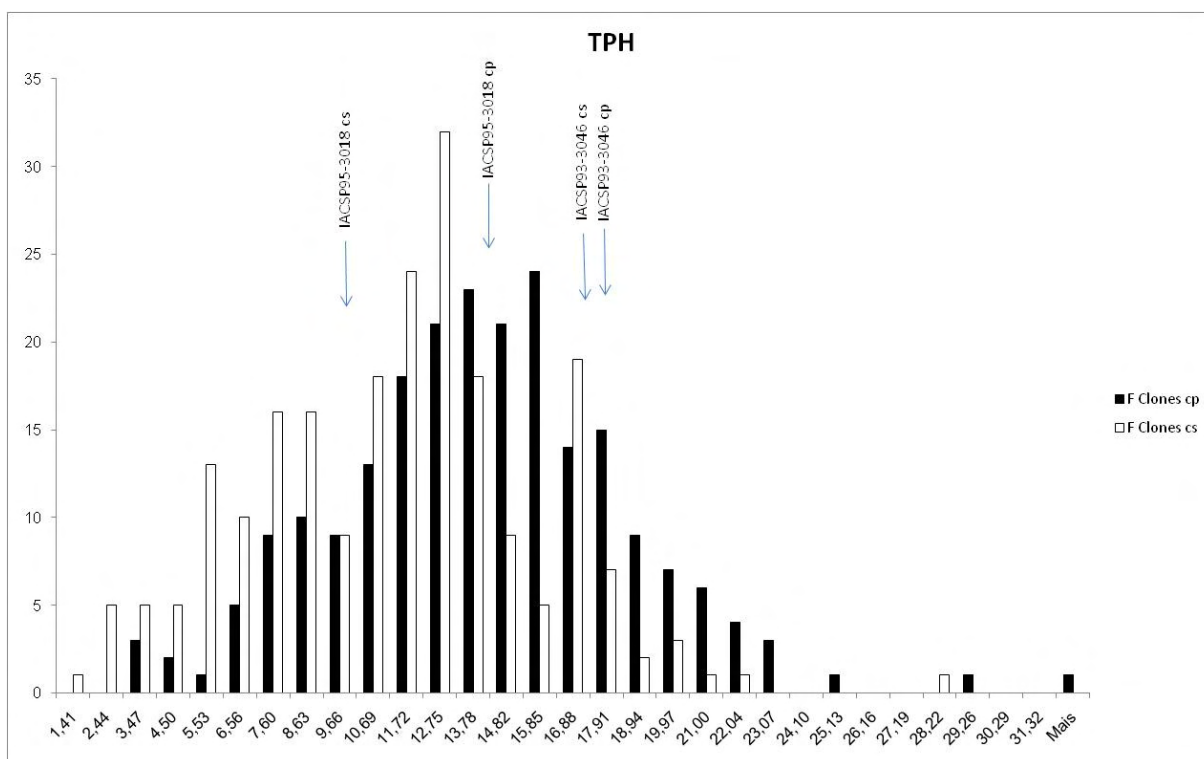


Figura 10. Distribuição de frequência para TPH (acima) em 220 indivíduos derivados do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046.

cp: cana planta; cs: cana soca

Assim como os componentes de produção, os parâmetros de qualidade (Brix, Pol%Cana, Fibra%), a produtividade (TCH) e a toneladas de Pol por hectare (TPH) mostraram distribuição contínua e a presença de segregantes extremos.

Na Tabela 4 são apresentados alguns parâmetros biométricos e de qualidade das principais populações de mapeamento disponíveis na literatura até o momento.

Tabela 4. Valores referentes as médias de progênies (X_{pop}), médias dos respectivos genitores e amplitude (Amp) obtidos para os caracteres número de colmos (NC), diâmetro de colmos (DC), altura (Alt), Brix, Pol, Fibra e TCH em diferentes populações de mapeamento de cana-de-açúcar.

Pop	N	Caracteres							Citação
		NC m ⁻¹	DC (cm)	Alt (m)	Brix %	Pol %	Fibra %	TCH	
La Purple x Mol 5829	100	X_{pop}	24,20	1,93	-	-	7,69	17,11	Guimarães (1999)
		Amp	-	-	-	-	-	-	
		X_{LAP}	7,75	3,11	-	-	10,41	8,89	
		X_{Mol}	27,10	1,20	-	-	2,71	22,29	
R570	295	X_{pop}	-	-	-	-	-	-	Hoarau (2002)
		Amp	11-38	2,1-3,5	2,0-3,2	12-22	-	-	
SP80-180 x SP80-4966	100	X_{pop}	9	2,2	2,7	17	13,2	11,4	Kido (2003)
IACSP95-3018 x IACSP93-3046	220	$X_{pop\ cp}$	12,12	2,72	2,03	20,79	15,61	12,84	88,82
		$X_{pop\ cs}$	12,21	2,43	1,82	21,06	16,03	12,88	68,28

X_{LAP} : média La Purple; X_{Mol} : média Mol 5829; (-) não consta informação.

De forma geral os valores dos parâmetros biométricos e de qualidade obtidos para a progênie do cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046 se assemelham aos observados nas demais populações de mapeamento. Entretanto, nota-se que os valores observados para o cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046 se aproximam mais daqueles observados na população do cruzamento entre SP80-180 x SP80-4966, na qual os genitores são clones elites do Programa de Melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira. A progênie de mapeamento utilizada por GUIMARÃES (1999) é oriunda do cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* (La Purple) e seu suposto ancestral *S. robustum* (Mol 5829), nos quais, os genitores, por se tratarem de genótipos considerados selvagens, são mais contrastantes quanto aos caracteres avaliados. Por outro lado, genótipos elites oriundos de programas de melhoramento, embora não tão contrastantes,

apresentam uma maior concentração de alelos favoráveis uma vez que passaram por processo de seleção.

4.2. Avaliação do polimorfismo de marcadores gSSRs e EST-SSRs entre os genitores da população de mapeamento

O polimorfismo observado com marcadores do tipo microssatélite, em geral, resulta do ganho ou perda de um motivo na sequência repetitiva. Os pares de *primers* que flanqueiam esta região repetitiva, por sua vez definem o loco de microssatélite (SSRs). Desta forma, os diferentes marcadores observados após a amplificação via reação de PCR com um par de *primers* SSRs são assumidos como alelos provenientes de uma mesmo loco de SSRs, JARNE & LAGODA (1996).

Cento e vinte EST-SSRs e 42 gSSRs foram avaliados entre os genitores (IACSP95-3018 e IACSP93-3046) e uma amostra de quatro indivíduos da população (geração F1) quanto ao polimorfismo, para a seleção dos melhores marcadores a serem avaliados na população de mapeamento.

4.2.1. Microssatelites funcionais (EST-SSRs)

Dos 120 pares de *primers* EST-SSRs avaliados quanto ao polimorfismo, 68 (57%) geraram padrões de bandas de alta qualidade e foram selecionados para serem avaliados na população de mapeamento. Os 68 EST-SSRs detectaram, no total, 386 alelos sendo que o número de alelos por loco variou de 1 (SCB49) a 16 (CV38) com média de 5,7 alelos por loco (Tabela 5, Figura 11). O tamanho dos alelos, em pares de bases, variou de 88 pb (CV 29) a 327 pb (SCB 43).

Dos 386 alelos genotipados, 180 (46,6%) apresentaram-se monomórficos entre os genitores e a amostra de 4 indivíduos utilizados no teste de polimorfismo. Dos 206 (53,4%) alelos restantes, 143 (69%) mostraram-se polimórficos entre os genitores, sendo que 65 (31%) foram encontrados no genitor feminino (IACSP95-3018) e 78 (38%) no genitor masculino (IACSP93-3046). Sessenta e três alelos (31%) apesar de monomórficos entre os genitores apresentaram segregação na amostra avaliada.

Tabela 5. Número de marcas obtidas (alelos) para cada EST-SSRs avaliado e sua provável segregação como (1:1 ou 3:1) na amostra utilizada.

EST-SSRs	Tamanho esperado	Tamanho obtido	Nº de marcas (alelos) avaliados	(1:1)	(3:1)	Marca (alelos) monomórfica
SCA 07	201	225 – 213	4			4
SCA 17	212	180 – 173	5	2	0	3
SCA 26	183	185 – 168	5	2	0	3
SCA 31	204	222 – 202	7	2	2	3
SCA 44	153	207 – 163	3	1	0	2
SCA 47	262	266 – 227	4	2	1	1
SCA 48	254	254 – 211	7	4	0	3
SCA 53	186	n	8	2	4	2
SCA 61	232	246 – 221	5	3	0	2
SCB 01	193	164 – 156	5	1	4	0
SCB 02	164	160 – 155	2	1	0	1
SCB 06	176	174 – 145	6	4	0	2
SCB 07	291	286 – 193	10	5	3	2
SCB 14	297	279 – 292	4	0	2	2
SCB 16	234	297 – 287	3	1	0	2
SCB 23	103	108 – 99	3	0	0	3
SCB 25	191	196 – 191	3	1	1	1
SCB 27	213	214 – 201	4	1	1	2
SCB 40	155	175 – 157	5	2	1	2
SCB 41	162	164 – 137	5	2	0	3
SCB 43	330	327 – 260	9	2	2	5
SCB 49	454	359	1	1	0	0
SCB 55	116	121 – 116	3	1	1	1
SCB 56	236	n	7	0	0	7
SCB 58	179	194 – 173	7	5	1	1
SCB 60	198	192 – 157	4	2	1	1
SCB 65	221	232 – 212	5	3	0	2
SCB 82	263	264 – 253	4	1	1	2
SCB 100	268	261 – 234	9	1	1	7
SCB 118	110	166	4	1	1	2

SCB 130	124	129 – 91	10	4	3	3
SCB 145	234	234 – 224	3	1	0	2
SCB 148	168	169 – 156	3	1	0	2
SCB 174	209	140 – 121	7	1	2	4
SCB 189	204	n	5	1	0	4
SCB 207	149	154 – 141	8	4	2	2
SCB 208	194	223 – 151	14	4	4	6
SCB 213	158	292 – 264	5	4	0	1
SCB 226	195	208 – 166	6	2	0	4
SCB 246	142	159 – 147	7	2	1	4
SCB 262	258	269 – 255	4	2	1	1
SCB 263	186	188 – 181	4	1	1	2
SCB 268	150	159 – 146	5	2	0	3
SCB 282	166	160 – 150	4	0	0	4
SCB 285	170	192 – 172	7	5	0	2
SCB 288	173	212 – 206	3	2	0	1
SCB 291	177	183 – 171	5	2	0	3
SCB 292	181	193 – 160	13	6	1	6
SCB 297	192	196 – 177	10	4	1	5
SCB 298	127	130 – 120	2	1	0	1
SCB 300	196	209 – 196	7	2	1	4
SCB 303	197	199 – 196	2	0	0	2
SCB 307	207	208 – 181	6	2	2	2
SCB 309	208	209 – 186	3	0	1	2
SCB 310	209	212 – 203	3	2	0	1
SCB 311	211	192 – 172	7	1	2	4
SCB 312	215	272 – 201	8	4	1	3
SCC 01	298	n	9	5	1	3
SCC 30	161	165 – 154	3	2	0	1
SCC 33	129	139 – 127	3	1	1	1
SCC 35	181	204 – 149	8	2	0	6
SCC 36	236	238 – 220	5	3	0	2
SCC 38	142	146 – 135	4	1	1	2
SCC 45	131	144 – 124	4	2	0	2
SCC 47	148	153 – 141	3	1	0	2
CV 29		134 – 88	9	6	1	2
CV 37		194 – 112	10	5	1	4
CV 38			16	2	8	6
Total			386	143	63	180

Alguns marcadores que se mostraram monomórficos entre os genitores e também na amostra de quatro indivíduos avaliada no teste de polimorfismo foram polimórficos quando abertos em todos os indivíduos da população de

mapeamento. Em geral, o loco de microssatélite (o qual é definido por um par de *primers*) em um organismo poliplóide amplifica todos os tipos de alelos presentes no respectivo loco. Desta forma, para um mesmo loco, pode ser observado:

- a) alelos polimórficos entre os genitores,
- b) monomórficos entre os genitores, porém com segregação na amostra avaliada
- c) monomórficos entre os genitores e sem polimorfismo nos indivíduos amostrados. Este loco, quando aberto na população de mapeamento poderá apresentar polimorfismo para os alelos monomórficos entre os genitores e que não foram polimórficos na amostra utilizada no teste de polimorfismo.

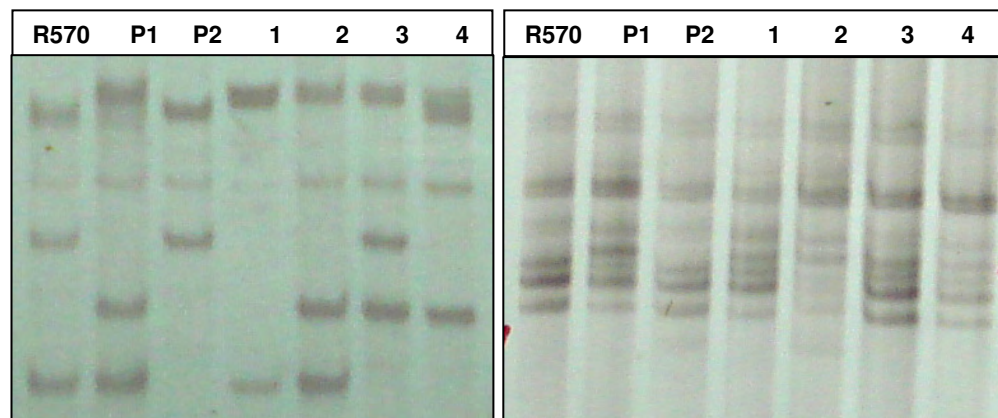


Figura 11. Avaliação do polimorfismo entre os genitores e amostra da população de mapeamento para os EST-SSRs: a) SCC30 e b) SCB56, respectivamente.

4.2.2. Microssatélites genômicos (gSSRs)

Locos de microssatélites genômicos (gSSRs) são, em geral, altamente polimórficos. Uma das principais razões é o fato de que, por se encontrarem em regiões não codificantes do genoma, são poucos influenciados pela seleção.

Dos 42 gSSRs avaliados entre os genitores e 4 indivíduos da progênie, 36 (71%) foram selecionados para serem avaliados na população de mapeamento. Para estes 42 gSSRs, o número total de alelos obtidos entre os genitores foi de 246 variando de 1 (SMC1055HA) a 16 (Cir25), com uma média de 5,85 (Figura 12, Tabela 7). Os alelos variaram de 73 pb (SMC1235FL) a 389 pb (SMC415MS).

Dos 248 alelos genotipados, 68 (29%) apresentaram-se monomórficos entre os genitores e nos indivíduos do teste de polimorfismo, enquanto 180 (71%) apresentaram-se monomórficos ou polimórficos entre os genitores, porém com segregação na amostra avaliada. Dos 180 alelos, 116 (64%) foram polimórficos entre os genitores, sendo 56 (31%) alelos exclusivos do genitor feminino (IACSP95-3018), 60 (33%) do genitor masculino (IACSP93-3046) e 64 (36%) de ambos os genitores.

Tabela 6. Número de marcas obtidas (alelos) para cada gSSRs selecionado e sua provável segregação (1:1 ou 3:1) na amostra utilizada.

gSSRs	Tamanho esperado	Tamanho obtido	Nº de marcas (alelos) avaliados	(1:1)	(3:1)	Marca (alelos) monomórfica
SMC119CG	119	103 - 174	5	3	2	0
SMC232MS	157	206 - 147	2	1	0	1
SMC236CG	210	167 - 215	5	2	3	0
SMC280CS	238	258 - 301	8	4	3	1
SMC319CG*	183	145 - 173	7	4	0	3
SMC415MS	338	389 - 309	8	3	2	3
SMC448MS	187	111 - 212	9	0	4	5
SMC477CG	168	95 - 245	6	3	2	1
SMC687CS	203	184 - 279	4	1	2	1
SMC863CG	296	271 - 392	8	1	4	3
SMC1011HA	276	122 - 385	4	0	0	4
SMC1047HA	166	121 - 157	10	6	2	2
SMC1055HA*	224	195	1	1	0	0
SMC1235FL*	88	73 - 85	4	0	4	0
SMC2017FL	229	216 - 264	7	5	1	1
SMC2039FL	275	260 - 303	5	3	1	1
SMC2055FL*	318	310 - 485	8	1	3	4
SMC21AS	133	102 - 117	7	3	0	4
SMC31CUC	225	129 - 183	5	3	0	2
SMC36BUQ	118		3	3	0	0
SMC843	201		5	1	1	3
Cir 01	227	139 -198	5	3	1	1
Cir 04	289	246 - 275	5	4	0	1

Cir 12	279	228 - 287	8	3	3	2
Cir 14	240	213 - 253	4	2	1	1
Cir 18	215	170 - 221	7	4	1	2
Cir 21	181	131 - 149	3	3	0	0
Cir 23	281	197 - 246	5	4	0	1
Cir 24	265	242 - 251	4	2	0	2
Cir 25*	300	269 - 451	16	6	9	1
Cir 26	134	111 - 130	7	2	1	4
Cir 28*	419	299 - 359	10	4	4	2
Cir 31	215	151 - 257	6	2	1	3
Cir 32	211	160 - 248	10	8	1	1
Cir 35	173		6	4	1	1
Cir 36	166	147 - 174	7	7	0	0
Cir 50	263	247 - 370	2	0	2	0
Cir 51	272	227 - 256	5	2	2	1
Cir 55	333	297 - 320	2	2	0	0
Cir 56	184	113 - 150	5	3	1	1
Cir 67	142	82 - 155	5	3	1	1
Cir 74	226	216 - 227	5	0	1	4
Total	-	-	248	116	64	68

* primers que não foram selecionados para serem abertos na população de mapeamento por não apresentarem padrões de bandas interpretáveis

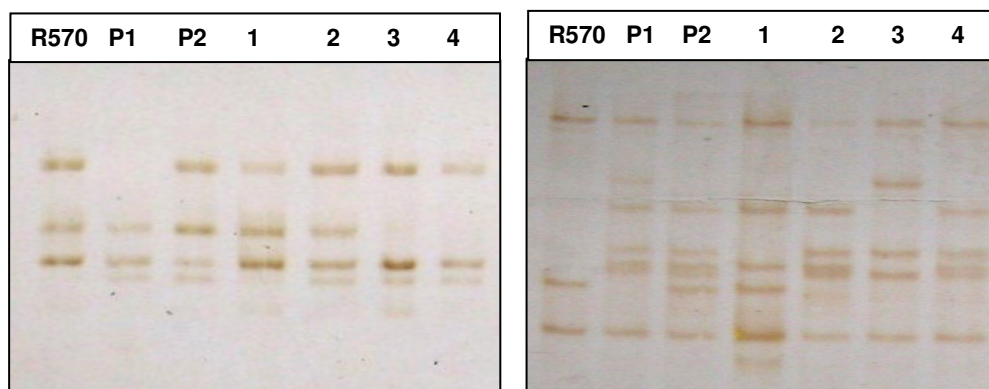


Figura 12. Avaliação do polimorfismo entre os genitores e amostra da população de mapeamento para os gSSRs: a) SMC31CUC e b) SMC1047HA, respectivamente.

Em estudo realizado por PINTO et al (2006) em uma população oriunda do cruzamento de duas cultivares de cana-de-açúcar (SP80-180 x SP80-4966) ambas pertencentes ao programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), foram utilizados 50 locos de gSSRs para avaliação de

polimorfismo. Esses locos produziram 474 alelos polimórficos, desses apenas 44 (9%) apresentaram marcadores monomórficos.

4.3. Construção do mapa de ligação

Os 68 EST-SSRs e 42 gSSRs avaliados na população de mapeamento produziram um total de 514 marcadores, dos quais, 275 se encontraram em dose única (segregações 1:1 e 3:1). Estes marcadores foram posteriormente utilizados para a construção do mapa de ligação.

Quanto à origem das marcas, foram encontrados 110 (21%) marcadores do tipo D1, sendo que 77 mostraram segregação 1:1; obteve-se ainda 134 (26%) marcadores do tipo D2, dos quais, 90 apresentaram segregação 1:1 e 270 marcadores (53%) do tipo C, dos quais 108 apresentaram segregação na proporção 3:1 (Tabela 7).

Tabela 7. Relação de marcadores em dose única quanto a sua origem.

Origem	EST-SSRs	gSSRs	MDUs total
D1	50	27	77
D2	49	41	90
C	65	43	108
Total	164	111	275

D1: proveniente do genitor feminino IACSP95-3018; D2: proveniente do genitor masculino IACSP93-3046; C: proveniente de ambos genitores

Em relação aos marcadores do tipo C, deve-se frisar que, apesar de menos informativos, esses marcadores por serem comuns a ambos os genitores servem como pontes entre os seus genomas, identificando regiões de homologia entre eles, MALIEPAARD et al. (1997); WU et al. (2002).

GARCIA et al 2006 utilizando 149 EST-SSRs, na população oriunda do cruzamento SP80-180 x SP80-4966, obtiveram 576 bandas polimórficas, das

quais 332 foram identificadas como marcadores em dose única em apenas um dos genitores e 183 em dose única em ambos os genitores (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre os marcadores em dose única (MDU) obtidos nas populações SP80-180 x SP80-4966 e IACSP95-3018 x IACSP93-3046.

População	EST-SSRs	Marcas Polimórficas	(1:1)	(3:1)	Autor
SP80-180 x SP80-4966	149	576	332	183	*
IACSP95-3018 x IACSP93-3046	68	325	144	181	¹

*Gacia et al 2006; ¹Daniel Carvalho Leite

4.3.1. Análises de ligação entre marcadores em dose única

Os 275 MDUs obtidos foram utilizados na construção do mapa de ligação. Destes, 175 (64%) apresentaram-se ligados, dando origem a 58 grupos de ligação.

O mapa apresentou uma cobertura de 1525 centiMorgans, com uma distância média entre as marcas de 8,71 cM. O tamanho dos grupos de ligação (GL) variou de 1 cM (GL-28) a 72 cM (GL-1). Com exceção de sete grupos de ligação (9, 15, 23, 24, 27, 39 e 55), os grupos de ligação foram agrupados em 9 grupos de homologia (GH), da seguinte forma (Figura 13):

GH-I (1, 2, 11, 16, 20, 21, 32, 36, 38 e 47),

GH-II (3, 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 17, 18, 22, 35, 45, 46, 48, 50, 56 e 57),

GH-III (6, 12, 31, 33, 42 e 43),

GH-IV (19 e 53),

GH-V (25, 28, 40, 44, 54 e 58),

GH-VI (26 e 37,

GH-VII (29 e 51),

GH-VIII (30, 41 e 52),

GH-IX (34 e 49)

Comparando o mapa aqui obtido com os mapas derivados de cruzamentos bi-parentais envolvendo cultivars e/ou clones elites (Tabela 9), fica evidente que o mapa do cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046 é parcial, sendo necessário a inclusão de novos marcadores. De fato, GARCIA et al. (2006), obteve 131 grupos de ligação dispostos em 12 grupos de homologia enquanto AITKEN et al. (2005) obteve 136 grupos de ligação dispostos em 8 grupos de homologia ambos trabalhando com cultivars de cana-de-açúcar.

Tabela 9. Comparação entre os mapas de ligação dos cruzamentos IACSP95-3018 x IACSP93-3046, SP80-180 x SP80-4966 e JJ76-514 x Q165.

População	GL	GH	Referência
IACSP95-3018 x IACSP93-3046	58	9	
SP80-180 x SP80-4966	131	12	Garcia et al 2006
JJ76-514 x Q165	136	8	Aitken et al 2005

Analisando a origem dos 175 MDUs verificou-se que 53 (30%) são do tipo D1, 59 (34%) do tipo D2 e 63 (36%) do tipo C (Tabela 10). A presença de marcadores do tipo “C” favorece a ligação em um mesmo grupo de ligação de marcadores do tipo D1 e D2, identificando regiões de homologia entre os genitores.

Tabela 10. Relação de Marcadores em dose única conforme sua origem, em relação à análise de ligação.

MDUs Ligados	EST-SSRs	gSSRs	Total
D1	36	17	53
D2	27	32	59
C	39	24	63
Total	102	73	175

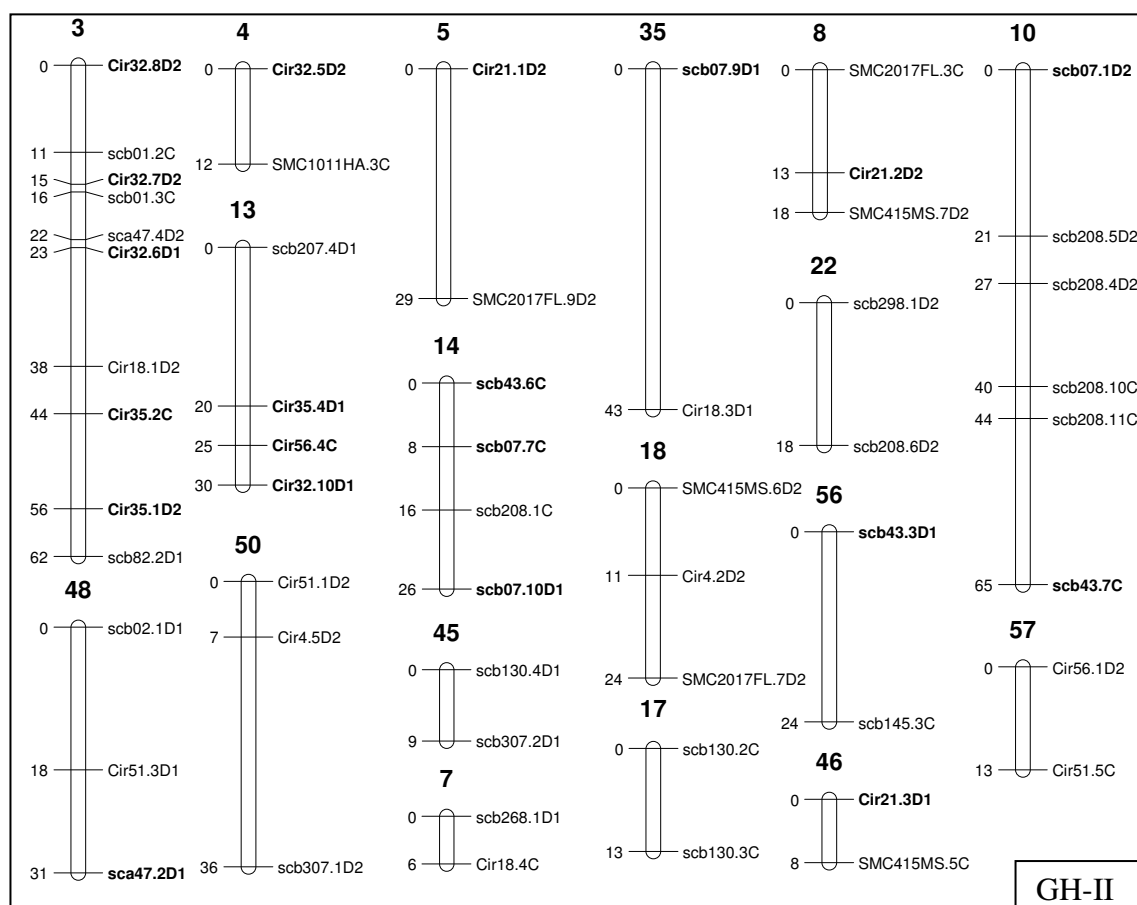
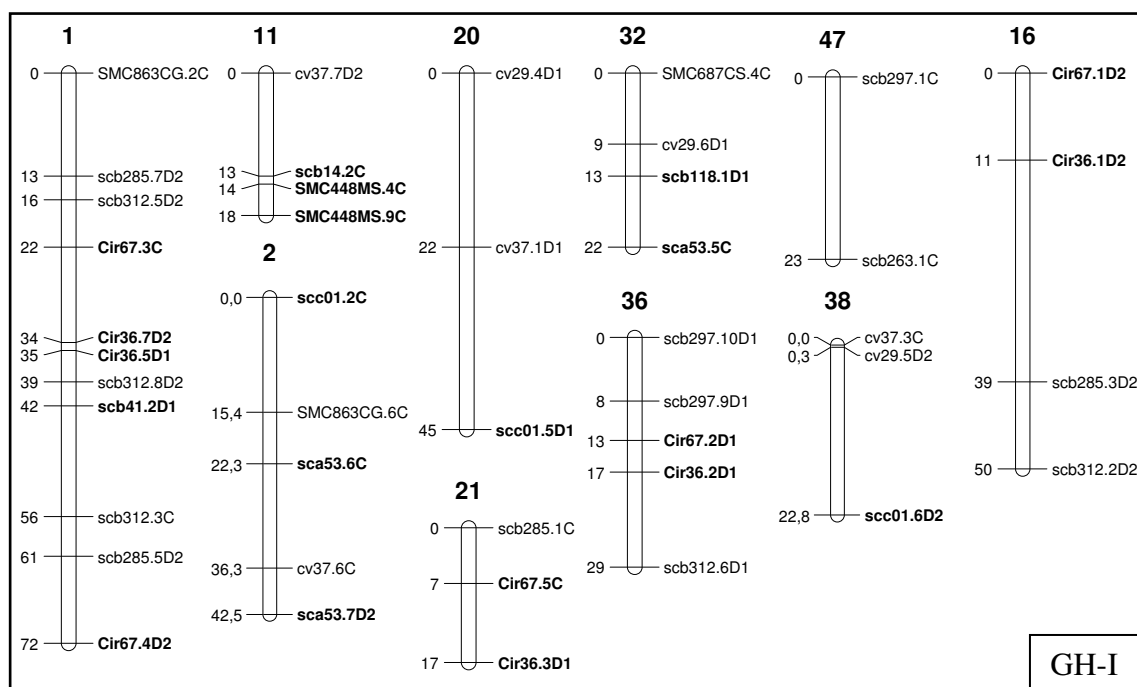


Figura 13. Mapa de ligação obtido para o cruzamento entre IACSP95-3018 e IACSP93-3046

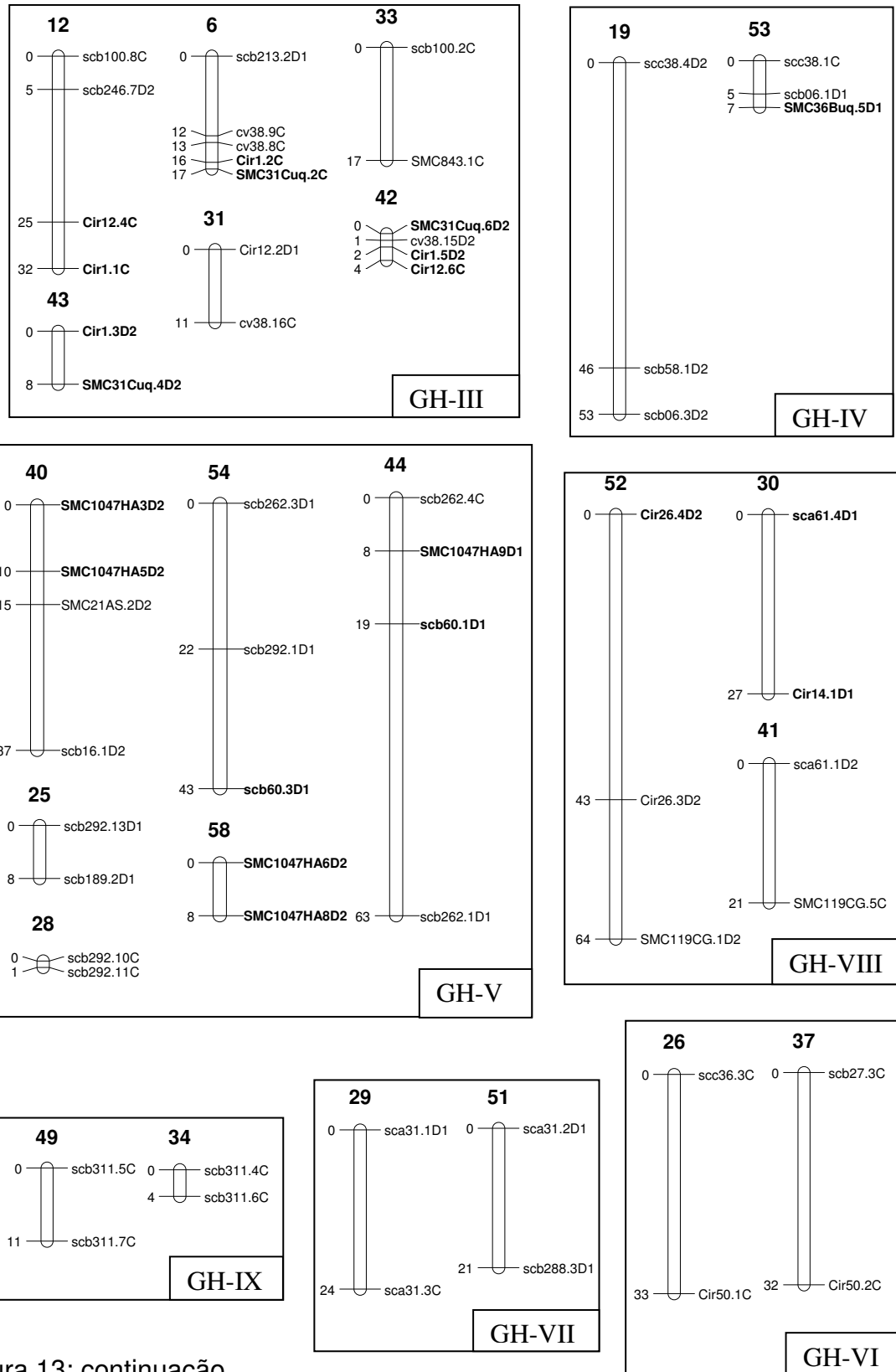


Figura 13: continuação

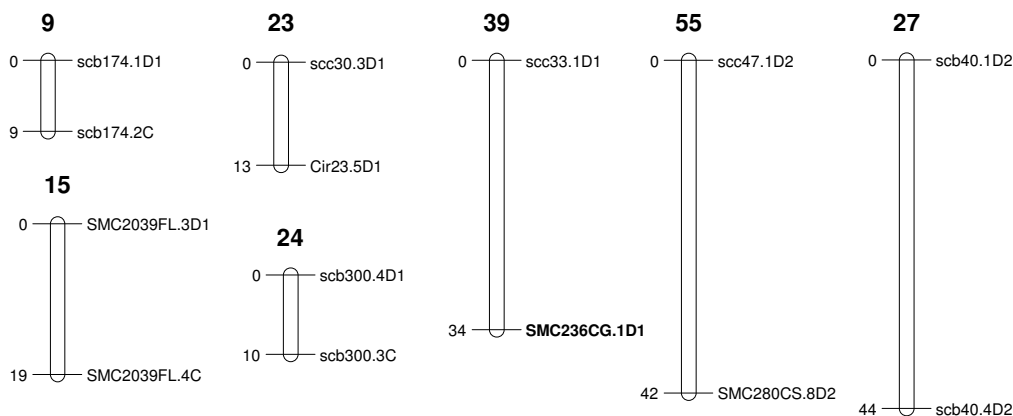


Figura 13: continuação

Marcadores do tipo microssatélites permitem a comparação entre mapas. Os marcadores que estão em destaque (negrito), são derivados de locos de microssatélites que também produziram marcadores que foram ligados em um mesmo grupo de ligação no mapa publicado por OLIVEIRA et al. (2007). Embora tais marcadores, provavelmente, representem alelos diferentes, os locos foram mapeados no mesmo grupo de ligação em mapas diferentes. Estes grupos de ligação, de certa forma validam a localização destes locos de microssatélites, uma vez que foram encontrados no mesmo grupo de ligação ou de homologia, obtidos com base em cruzamentos diferentes.

4.4. Análise de marcas simples

A análise de marcas simples para detectar QTLs, LIU (1998), embora com menos poder informativo do que outras abordagens como o mapeamento por intervalo, LANDER & BOTSTEIN (1989) e mapeamento por intervalo composto, ZENG (1994), permitiu a obtenção de associações entre marcadores e QTLs para os componentes de produção (altura, peso, diâmetro e número de colmos),

parâmetros de qualidade (Brix, Pol%Cana e Fibra) bem com produtividade (TCH e TPH).

Pela análise de marcas simples, foram detectadas 69 associações entre marcadores e as medidas fenotípicas obtidas em cana planta e cana soca. Destas 69 associações, 32 foram detectadas em cana planta (46%) e 37 (54%) em cana soca e apenas 6 (9%) em ambos os ciclos (cana planta e cana soca). Estas associações envolveram 47 locos de microssatélites (pares de *primers*), sendo 17 (36%) gSSRs e 30 (64%) EST-SSRs (Tabela 12, Tabela 13 e Tabela 14).

No geral, para todas as associações detectadas entre marcadores e características fenotípicas avaliadas, os efeitos observados dos marcadores foram pequenos. De acordo com AITKEN et al (2008), em cana-de-açúcar, a presença de vários alelos em um mesmo loco, em um indivíduo (própria condição de poliploidia) colabora para a detecção de efeitos de menor magnitude.

Em cana-de-açúcar a utilização de marcadores moleculares funcionais provenientes de etiquetas de seqüências expressas (ESTs), é uma das estratégias que permite o mapeamento direto de genes de interesse, THAMARUS et al (2002); SCHLOSS et al (2002); ROSSI et al (2003); OLIVEIRA et al (2007). Esta abordagem é interessante, uma vez que permite investigar a relação entre a homologia do gene ou proteína, da qual o marcador foi derivado com a característica fenotípica na qual foi detectada a associação. Na Tabela 11 encontram se as homologias dos EST-SSRs que produziram marcadores associados a características fenotípicas nas análises de marcas simples.

Tabela 11. Relação dos EST-SSRs com suas respectivas homologias.

Primer	Homologia
EST-SCA44	Ubiquitin-specific protease
EST-SCA47	amino acid aminotransferase protein
EST-SCA53	Indeterminate spikelet 1
EST-SCA61	Root specific protein ZRP3
EST-SCB06	Phosphatase-2C (PP2C)
EST-SCB07	Phosphofructo-1-kinase
EST-SCB100	abscisic acid and stress inducible protein
EST-SCB130	Non-Phototropic hypocotyl 4 (NPH4) protein
EST-SCB14	RNA binding protein RZ-1
EST-SCB145	alfa -galactosidase
EST-SCB148	beta- amylase
EST-SCB174	dnaK-type molecular chaperone
EST-SCB189	ubiquitin-specific
EST-SCB207	putative receptor-like protein kinase
EST-SCB208	mnba_maize dna-binding protein mnb1a
EST-SCB213	unknown protein [Arabidopsis thaliana]
EST-SCB268	strong similarity to unknown protein
EST-SCB27	putative protein
EST-SCB285	putative tyrosine phosphatase
EST-SCB292	
EST-SCB297	tyrosine specific protein phosphatase-like
EST-SCB300	fator de transcrição SCARECROW
EST-SCB312	probable auxin transport protein auxin transport protein REH1
EST-SCB40	Lamin
EST-SCB56	Putative RNA-binding protein
EST-SCB58	Myb-like protein
EST-SCC36	Ca ² transporting ATPase-like protein
EST-SCC45	Response regulator gene

4.4.1. Componentes de produção e produtividade

Com o primeiro processo “stepwise”, visando selecionar marcas capazes de representar 99% do R^2 , resultaram na seleção de 15 a 25 marcas por atributo. Os indivíduos utilizados nessa seleção, restringiram-se aos que tinham sido genotipados para todas as 514 marcas. Os respectivos R^2 globais para as marcas selecionadas mostraram-se, predominantemente, entre 10 e 20%. Com o segundo

processo “stepwise”, usando apenas as marcas da primeira seleção, os R^2 parciais e os efeitos de marcas simples são dados nas Tabelas 12 a 14.

Para as avaliações fenotípicas referentes aos componentes de produção (diâmetro, altura, peso e número de colmos) e para a produtividade dada em toneladas de cana-de-açúcar por hectare (TCH) foram encontradas 38 associações marcador/característica. Destas, 20 (53%) foram encontradas em cana planta enquanto 18 (47%) foram provenientes dos dados de cana soca e apenas 2 (5%) permaneceram associadas em ambos os ciclos (cana planta e cana soca). Do total de associações encontradas para os componentes de produção, 9 (24%) foram para diâmetro, 6 (16%) para altura, 8 (21%) para peso do colmo e 10 (26%) para número de colmos.

Para o total de marcadores associados ao diâmetro, 4 (44%) foram encontrados em cana planta (3 com efeito negativo) e 5 (56%) em cana soca (1 com efeito positivo). O marcador EST-SCB174.5C derivado de um EST com homologia a uma proteína de choque térmico (Tabela 12) apresentou associação para a característica de diâmetro do colmo com efeito negativo tanto em cana planta quanto em cana soca.

Em cana planta, os dois (33%) marcadores associados com a altura do colmo mostraram efeito positivo, enquanto das 4 (67%) associações encontradas em cana soca, 3 mostraram efeito negativo, contribuindo para redução na altura. Embora para altura do colmo não foram observados marcadores presentes tanto em cana planta como em cana soca, dois marcadores derivados do EST-SCB208 de homologia a uma proteína de ligação ao DNA (DNA-binding protein MNB1) mostraram associação com altura do colmo em cana planta (EST-SCB208.12D1) e soca (EST-SCB208.14C), o que talvez possa sugerir o envolvimento do loco EST-SCB208 com a altura.

Para o total de marcadores associados ao peso do colmo, 5 (63%) foram encontrados em cana planta, dos quais 2 apresentaram efeito negativo nesta característica e 3 (37%) foram encontrados em cana soca, todos de efeito negativo.

Em relação ao número de colmos, 4 dos 10 marcadores associados para esta característica mostraram efeito negativo colaborando para a redução no perfilhamento. O marcador EST-SCB312.5D2, derivado do genitor IACSP93-3046 (D2) teve um efeito positivo no número de colmos tanto em cana planta quanto em cana soca, sendo responsável por 3,38% e 2,34% da variação fenotípica observada para esta característica, respectivamente, em cana planta e soca (Tabela 12). Este marcador apresenta homologia a uma proteína REH1 transportadora de auxina. Tal associação mostra-se interessante, visto que a alongação das plantas e, conseqüentemente, a altura, é um processo complexo mediado por vários hormônios vegetais incluindo auxinas brassinoesteróides e giberelinas, MULTANI et al (2003). Em arroz, XU et al (2005) mostraram que a proteína REH1 transportadora da auxina desempenha papel importante na emergência de raízes adventícias e no perfilhamento.

Em relação à produtividade (TCH) foram encontradas 5 associações entre marcadores e QTLs putativos com um total de 4 (80%) com efeito negativo. O marcador CIR31.6C apresentou associação para TCH em cana soca (Tabela 13) como também para fibra em cana planta e cana soca (Tabela 14), apresentando efeito negativo em ambas características. No total, todos os marcadores identificados para TCH foram responsáveis por 5,94% e 4,77% da variação fenotípica observada para esta característica, respectivamente em cana planta e cana soca.

Tabela 12. Análise de marcas simples para os componentes de produção (diâmetro, altura, peso e numero de colmos) avaliados em cana planta e cana soca, com os respectivos efeitos e os coeficientes de determinação parcial e total expresseo em porcentagem R^2 (%).

Marcas	Diâmetro do colmo (cm)				Altura do colmo (cm)				Peso do colmo (Kg)				Numero de colmo (m)			
	Cana Planta		Cana Soca		Cana Planta		Cana Soca		Cana Planta		Cana Soca		Cana Planta		Cana Soca	
	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2
CIR67.2D1	0,07	1,87														
CV38.7C	-0,04	1,49														
EST-SCB174.7C	-0,06	1,4														
EST-SCB174.5C	-0,9	1,37	-0,12	1,97												
EST-SCB189.1C			-0,1	3,05												
EST-SCB07.4C			0,1	2,55												
CIR51.5C			-0,05	1,83												
SMC280CS.6C			0,15	2,28												
EST-SCC45.2D2					7,13	3,57										
EST-SCB208.12D1					5,21	2,62										
SMC448MS.6C							-2,21	3,47								
EST-SCB300.3C							-5,94	3,12								
SMC280CS.8D2							2,45	2,42								
EST-SCB208.14C							-4,93	1,58								
EST-SCA53.8C									0,9	3,18						
CIR12.1D1									0,59	2,89						
SMC280CS.4D1									-0,59	1,92						
EST-SCB130.8C									4,08	1,7						
EST-SCB58.2D2									-0,52	1,34						
EST-SCC36.1D2											-0,63	3,68				
SMC863CG.8C											-1,16	2,72				
EST-SCB292.4C											-1,57	2,54				
EST-SCB06.1D1													-0,35	4,09		

Tabela 12continuação

Marcas	Diâmetro do colmo (cm)				Altura do colmo (cm)				Peso do colmo (Kg)				Numero de colmo (m)			
	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca
	Efeito	R ²	Efeito	R ²	Efeito	R ²	Efeito	R ²	Efeito	R ²	Efeito	R ²	Efeito	R ²	Efeito	R ²
CIR32.2D1													0,58	4,32		
EST-SCB312.5D2													0,66	3,38	1,28	2,34
EST-SCB14.3C													-0,83	3,54		
SMC477CG.2D1													0,61	2,08		
CIR36.1D2													-0,57	1,87		
EST-SCB207.6C															1,65	4,71
EST-SCA61.5C															-1,44	2,45
CIR12.8C															1,82	1,46
Total R ²	6,13		11,7		6,19		10,6		11		8,94		19,3		11	
Nº de associações	4	5		2	4	5		3		6		4				
Marcadores comuns entre os caracteres	1	1	0	0	0	0		0		1		1				
Marcadores específicos	3	4	2	2	4	5		3		5		3				

Tabela 13. Análise de marcas simples para produtividade de cana (TCH) e produtividade de açúcar por hectare (TPH) avaliados em cana planta e cana soca, com os respectivos efeitos e os coeficientes de determinação parcial e total expreso em porcentagem R^2 (%).

Marcas	TCH				TPH			
	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca	Cana Planta	Cana Soca
	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2
CIR31.6C			-11,96	2,96				
CIR35.3D1	-6,41	2,82						
EST-SCA44.1C	-7,54	1,87						
EST-SCB40.4D2	-1,18	1,25						
CV37.2D1			5,92	1,81				
EST-SCA61.1D2					-1,36	5,39		
EST-SCB148.2C					1,92	5,12		
SMC119CG.5C					0,87	3,5		
EST-SCB27.1D1					-0,98	3,54		
EST-SCB268.5C					2,61	2,09		
EST-SCA53.4C							-2,74	6,8
EST-SCB300.4D1							-0,92	2,8
CIR18.3D1							1,54	2,26
EST-SCB285.2D2							-1,45	1,17
Total R^2		5,94		4,77		19,6		13
Nº de associações	3		2		5		4	
Nº marcadores comuns entre os dois ciclos	0		0		0		0	
Nº marcadores específicos	3		2		5		4	

4.4.2. Parâmetros de qualidade

Para os parâmetros de qualidade foram encontrados 5 (16%) marcadores associados a QTLs putativos para Brix, 8 (26%) para Pol e 9 (29%) para fibra. Dos marcadores associados à QTLs para Brix, apenas um foi detectado em cana planta e 4 em cana soca. O marcador EST-SCB213.2D1C foi associado a um QTL de efeito negativo tanto para Brix (redução de -0,32 Brix%Caldo) como para fibra (redução de -0,15 % fibra) em cana soca. Para Pol%Cana, dos 3 marcadores detectados, o marcador EST-SCB100.4C com homologia à proteína do ácido abscísico mostrou efeito positivo (aumento de 0,35 Pol%Cana) no Pol além de contribuir com 1,49% da variação fenotípica observada para esta característica. Em arroz, TANG et. al (2009) observaram efeitos nas interações entre a sacarose e o ácido abscísico (ABA) na atividade e expressão da sacarose sintase (SUS) nos grãos. A sacarose sintase é uma enzima envolvida na quebra da sacarose em uridina difosfoglucoose (UDPG) e frutose.

Em relação a fibra, o marcador CIR31.6C derivado de um microsatélite genômico encontrado em cana planta, também foi detectado em cana soca, ambos com efeito negativo e explicando, respectivamente 2,38% e 2,08% da variação fenotípica para esta característica em cana planta e soca. Em cana soca, a maioria dos marcadores detectados mostraram efeito negativo nesta característica, colaborando para uma redução no conteúdo de fibra (Tabela 14).

Considerando, que o TPH (toneladas de açúcar por hectare) resultante da combinação entre TCH e Pol%Cana: $TPH = (TCH \times Pol) / 100$, é um dos parâmetros importantes na seleção de clones, foram investigados também possíveis associações entre esta característica e os marcadores avaliados neste trabalho.

Para TPH, foram detectados 5 marcadores em cana planta e 4 em cana soca. Os marcadores associados a esta característica mostraram homologia à proteína ZRP3 específica de raiz (EST-SCA61), beta amilase (EST-SCB148), a uma proteína putativa (EST-SCB27), proteína desconhecida (EST-SCB268), ao gene da espiguetta 1 indeterminada em milho (EST-SCA53), a proteína MNB1A de

ligação ao DNA (EST-SCB300) e a tirosina fosfatase putativa (EST-SCB285). Dentre estes, destacam-se o marcador EST-SCB148.2C de efeito positivo no TPH e com homologia à enzima beta amilase, a qual é responsável pela quebra do amido em açúcar.

Tabela 14. Análise de marcas simples para os parâmetros de qualidade (brix, pol e fibra) avaliados em cana planta e cana soca, com os respectivos efeitos e os coeficientes de determinação parcial e total expresso em percentagem R^2 (%).

Marcas	Brix						Pol						Fibra					
	Cana Planta			Cana Soca			Cana Planta			Cana Soca			Cana Planta			Cana Soca		
	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2	Efeito	R^2
CV38.11C	0,19	1,47																
EST-SCB312.3C			0,46	3,96														
EST-SCB213.2D1			-0,32	1,67												-0,15	1,44	
SMC415MS.5C			-0,2	1,77														
SMC1047HA.7D2			0,19	1,24														
EST-SCB208.10C					0,14	1,77												
EST-SCB100.4C					0,35	1,49												
CIR36.3D1					-0,09	1,5												
CIR36.5D1										-0,24	3,65							
SMC119CG.4C										0,32	2,01							
CIR32.5D2										-0,19	1,42							
CIR32.8D2										-0,25	1,5							
SMC232MS.1D1										-0,27	1,22							
EST-SCB56.6C												0,71	3,11					
CIR31.6C										-0,32	2,38	-0,19	2,08					
EST-SCA47.2D1										-0,19	1,95					-0,27	2	
SMC236CG.1D1																-0,21	1,53	
EST-SCB297.9D1																-0,22	1,49	
EST-SCB145.1D2																		
EST-SCB285.7D2																0,17	1,29	
Total R^2		1,47		8,64		1,59		9,8				7,44		9,83				
Nº de associações	1		4		3		5		3		6							
Nº marcadores comuns entre os dois ciclos	0		0		0		0		1		1							
Nº marcadores específicos	1		4		3		5		2		4							

5. CONCLUSÃO

A população oriunda do cruzamento bi-parental entre o clone elite IACSP95-3018 x cultivar IACSP93-3046 mostra variabilidade suficiente tanto para os caracteres agronômicos (componentes de produção, produtividade e parâmetros de qualidade) quanto em relação ao polimorfismo ao nível dos marcadores moleculares (gSSRs e EST-SSRs). Portanto, a população poderá ser explorada para a detecção e mapeamento de QTLs envolvidos com os caracteres acima mencionados. Com os dados fenotípicos e genotípicos foi possível detectar prováveis QTLs tanto de efeito negativo como de efeito positivo, embora de baixa magnitude devido, em parte, a própria condição de poliploidia da cana-de-açúcar. O mapa obtido é parcial, o que significa que novos marcadores deverão ser incorporados para permitir uma maior cobertura do genoma e posterior mapeamento dos QTLs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, K.S., HERMANN, S., KARNO, K., Bonnett, G.D. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, v.117, 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*, v.110, 789-801, 2005.

AL-JANABI S.M., HONEYCUTT, R.J., MCCLELLAND, M., SOBRAL, B.W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L, 'SES 208'. *Genetics*, v.134, p.1249-1260, 1993.

ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): origin, classification, characteristics, and descriptions of representative clones. Washington: USA, 1958. 307 p. (Agriculture Handbook, 122).

BADALOO, M.G.H. & RAMDOYAL, K. Variation and inheritance of quantitative traits in commercial x *S. spontaneum* L. crosses. AMAS. Food and agricultural Research Council, Réduit, Mauritius, p.169-178, 2003.

BESNARD, G., PINÇON, G., D'HONT, A.D, HOARAU, J.Y., CADET, F., OFFMANN, B. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene

family in sugarcane (*Saccharum* spp.). Theoretical and Applied Genetics, v.107, p.470-478, 2003.

BRESSIANI, J. A. Seleção seqüencial em cana-de-açúcar. Piracicaba : 2001. 159p. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

CAIRO, N. O livro da can-de-açucar. 2 ed. Curitiba, 1924. p. 161.

CALIJA V., HIGGINS, A., J., JACKSON, P., A., BIELIG, L., M., COOMANS, D. An operations research approach to the problem of the sugarcane selection. Annals of Operations Research, v.108, p.123-142, 2001.

CALMON, P. O açúcar, sua historia e influencia na civilização brasileira. Rio de Janeiro: I.A.A., 1935. p. 7-12 (Anuário Açucareiro).

CATO, S.A., GARDNER, R.C., KENT, J., RICHARDSON, T.E. A rapid PCR-method for genetically mapping ESTs. Theoretical and Applied Genetics, v.102, p.296-306, 2001.

CORRÊA, M.A. Sinopse histórica do açúcar em São Paulo. Rio de Janeiro: I.A.A., 1935. p. 153-163 (Anuário Açucareiro).

CRESTE, S., TULMANN NETO, A. AND FIGUEIRA, A . 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver satining. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 299-306.

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

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 RFLP marker in sugarcane cultivar R570. *Theor Appl Genet*, v.92, p.1059-1064, 1996.

EDWARDS, M.D.; HELENTJARIS, T.; WRIGHT, S.; STUBER, C.W. 1992. Molecular-marker-facilitated Investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozymes and restriction fragment length polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.*,v.83, p.765-774.

FERNANDES, A.C. Cálculos na Agroindústria da Cana-de-Açúcar. Manual. 193p. 2000.

GARCIA, A.A.F., KIDO, E.A., MEZA, A.N., SOUZA, SOUZA, H.M.B., PINTO, L.R., PASTINA, M.M., LEITE, C.S., DA SILVA, J.A.G., ULIAN, E.C., FIGUEIRA, A.V.O., SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112 p. 298-314, 2006.

GILMOUR, A.R. Mixed model regression mapping for QTL detection in experimental crosses. *Computational Statistics & Data Analysis*, v.51, p. 3749-3764, 2007 (ISSN 0167-9473).

GUIMARÃES, C. T., HONEYCUTT, R. J., SILLS, G. R., SOBRAL, B.W.S. Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. *Ex. Grassl. Genetics and Molecular Biology*, v.22: 125-132, 1999.

HOARAU, J. Y., GRIVET, L., OFFMANN, B., D'HONT, A., RISTERUCCI, A. M., ROQUES, D., GLASZMANN, J. C., GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v.103, 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. *Theor Appl Genet*, v.105, p.1027-1037, 2002.

HOGARTH, D. Genetics of sugarcane. In: Heinz, D.J. *Sugar Improvement Through Breeding*. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. p.255-271.

HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M. AND GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. México: CYMMYT, 1994.51p.

JARNE, P., LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE*, v.11, n.10, p.424-429, 1996.

JESWIET, J. Beschrijving der soorten van het swikerriet. Elf de bijdrage. Bijdrage tot de systematick van het geslacht *Saccharum*. *Meded Proefst. Java - Suikerind*: p.391-404, 1925.

JORDAN DR, CASU RE, BESSE P, CARROL BC, BERDING N, MCINTYRE CL.. Markers associated with stalk number and suckering in sugarcane colocate with tillering and rizhomatousness QTL in sorghum. *Genome*, v.47, p. 988-993, 2004.

KIDO, E.A. Mapeamento de marcadores moleculares AFLP em população derivada de clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e suas associações

com caracteres agronômicos. Piracicaba, 2003. 164p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

LANDER, ES., BOTSTEIN, D. (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics*, v.121, p. 185-199.

LIMA, G.A. Cultura da Cana-de-açúcar. Fortaleza: Typ. Oficial do Ceara, 1984. p. 159.

LIPPMAN, E.D. Von. Historia do açúcar. Tradução de Rodolfo Coutinho. Rio de Janeiro: Instituto do açúcar e do álcool, 1942. T.2, pt 10, p. 12-31.

LIU, BH. (1998) Statistical genomics. CRC Press, New York, 611p.

LOPES, C.H. Glossário de termos técnicos para a indústria sucro-alcooleira. Piracicaba: Instituto do Açúcar e do álcool/Planalsucar, 1986. 32p.

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*, v.108, p.851-863, 2004.

MALIEPAARD C, JANSEN J, VAN OOIJEN JW. Linkage analyses in a full-sib family of outbreeding plant species: overview and consequences of application. *Genetic Research*, v. 70, p. 237-250, 1997.

OLIVEIRA, K.M., MARCONI, T., PINTO, L.R., GARCIA, A.F., E.C. ULIAN, FIGUEIRA, A.V.O., A.P.DE SOUZA. Functional genetic linkage map based on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. *Molecular Breeding*, v. 20, 189-208, 2007.

PINTO, L.R., A. A. F. GARCIA , M. M. PASTINA, L. H. M. TEIXEIRA, J. A. BRESSIANI, E. C. ULIAN, M. A. P. BIDOIA, A. P. DE SOUZA. Analysis of genomic and functional RFLP derived markers associated with sucrose content, fiber and yield QTLs in a sugarcane (*Saccharum spp.*) commercial cross. *Euphytica*, 2009.

PINTO, L.R., K. M. OLIVEIRA , T. MARCONI , A. A. F. GARCIA , E. C. ULIAN, A. P. DE SOUZA Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. *Plant Breeding*, v. 125, 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 data base (SUCEST) for simple sequence repeats. *Genome*, v. 47, p.795-804, 2004.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, v.1, n.7, p.215-221, 1996.

ROACH, B.T.; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane In: Copersucar International Sugarcane Breeding Woorkshop, 1987. Piracicaba: Copersucar, 1987. p. 1-31.

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

SAS (1999) SAS Institute Inc. Procedures guide, version 6, 3rd edn. Sas Institute Inc, Cary, North Carolina, USA.

SCHLOSS, S., MITCHELL, S., WHITE, G., KUKATLA, R., BOWERS, J., PATERSON, A., KRESOVICH, S. (2002) Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 912-920.

SILVA, M.A. Época de amostragem na seleção e qualidade tecnológica de clones de cana-de-açúcar. Botucatu, 1996. 159p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

SINGH, R.K., SINGH S., SINGH, G.P. Genetic variability and yield relationships in adult sugarcane seedlings. *Sugar Cane*, n.1, p18-21, 1995.

TAMARUS, K.A., GROOM, K., MURRELL, J., BYRNE, M., MORAN, G.F. (2002) A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for Wood, fibre, and floral traits. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 379-387.

TANG, TANG; XIE, HONG; WANG, YUXIA; L, BING; LIANG, JIANSHEG The effect of sucrose and abscisic acid interaction on sucrose synthase and its relationship to grain filling of rice (*Oryza sativa* L.) Journal of Experimental Botany, Volume 60, Number 9, 20 July 2009 , pp. 2641-2652(12) Oxford University Press.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, v.88, p.1-6, 1994.

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

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

YU, J. K., LA ROTA, M., KANTETY, R.V., SORRELLS, M.E. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Mol Gen Genomics*, v. 271, p.742-751, 2004

ZENG, ZB. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, v. 136, p. 1457-1466.