

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

**MAPEAMENTO GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP,
MICROSSATÉLITES GENÔMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A
PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

Melina Cristina Mancini
Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Março de 2010

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

**MAPEAMENTO GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP,
MICROSSATÉLITES GENÔMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A
PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

Melina Cristina Mancini

Orientador: Prof. Dr. Dilermando Perecin

Co-orientadora: Dr 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

Março de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MELINA CRISTINA MANCINI – Nasceu em 18 de junho de 1983, no município de Araraquara- São Paulo. Em novembro de 2006 concluiu a graduação em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura e em novembro de 2008, obteve o título de Bacharel em Ciências Biológicas, ambas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, São Paulo. Realizou estágio curricular para a Monografia no Departamento de Produção Vegetal da mesma Universidade.

A meus pais Solange e José Carlos;

À minha irmã Thalita;

Pelo amor incondicional e pelo incomensurável apoio.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu força e persistência para seguir meu caminho.

A Universidade Estadual Paulista – UNESP/FCAV – pela oportunidade oferecida de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Dilermando Perecin, pela orientação, confiança, apoio e oportunidade em realizar este trabalho.

A Dr. Luciana Rossini Pinto, pela co-orientação. Muito obrigada pelo ensinamento, incentivo e pela grande contribuição no meu crescimento científico.

A todos os mestres da UNESP/FCAV pelo conhecimento transmitido e pela amizade adquirida.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro no projeto.

A todos os funcionários do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas pela valiosa ajuda durante a condução do experimento.

Aos meus amigos do laboratório Thais, Flávia, Cibele e Daniel pelo agradável convívio e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Adriana Ibrahim, Claudia Demétrio, Fernanda Paganelli, Jacqueline Paiva, Juliana De Antonio, Marcelo Costa e Viviane Morita pela constante amizade.

A minha família que me deu carinho, compreensão, incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Classificação botânica da cana-de-açúcar.....	3
2.2 Aspectos relacionados ao melhoramento genético da cana-de-açúcar.....	4
2.3 Marcadores moleculares.....	7
Marcadores moleculares baseados em AFLP.....	8
Marcadores moleculares baseados em microsatélites.....	10
2.4 mapeamento genético em cana-de-açúcar.....	12
2.5 Detecção e mapeamento de QTLs.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 População de mapeamento.....	20
3.2 Avaliações fenotípicas.....	21
3.2.1 Análise dos dados.....	22
3.3 Avaliações com Marcadores Moleculares.....	23
3.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	23
3.3.2 Marcadores microsatélites.....	23
3.3.3 Avaliação com marcadores AFLP.....	24
3.3.4 Análise da segregação de marcadores.....	25
3.3.5 Construção do mapa de ligação.....	25
3.3.6 Análise de marcas simples.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Análise dos dados fenotípicos.....	27
4.1.1 Herdabilidade.....	31
4.1.2 Correlação entre características.....	32

4.2 Análise de segregação dos marcadores moleculares.....	34
4.3 Mapa de ligação.....	39
4.4 Identificação funcional dos ESTs.....	46
4.5 Análise de marcas simples e localização dos QTAs (<i>Quantitative Trait Allele</i>) no mapa de ligação.....	48
4.5.1 Diâmetro do colmo.....	54
4.5.2 Peso do colmo.....	58
4.5.3 Altura do colmo.....	60
4.5.4 Número de perfilhos.....	61
4.5.5 TCH.....	62
4.5.6 Fibra.....	63
4.5.7 Brix.....	64
4.5.8 Pol%Cana.....	65
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8. ANEXO.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mapas de ligação publicados para cana-de-açúcar	13
Tabela 2. Detecção de QTLs para cana-de-açúcar	18 e 19
Tabela 3. Quadrados médios da análise de variância para diâmetro, peso, altura, número de perfilhos (NC), TCH, Fibra, Brix e Pol%Cana dos 220 clones em cana planta (P) e cana soca (S), e significância pelo Teste F	28
Tabela 4. Estimativas dos componentes de variância ($\hat{\sigma}_g^2$) e ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$) e herdabilidade (h^2) no sentido amplo dos parâmetros diâmetro, peso, altura do colmo, número de perfilhos, TCH, calculados para quatro repetições e Brix, Fibra e Pol%Cana, calculado para duas repetições, dos 220 clones de cana-de-açúcar.....	32
Tabela 5. Estimativas de correlações fenotípicas, sendo que as que envolvem características de produção (diâmetro, peso, altura do colmo, número de perfilhos e TCH) foram calculadas com quatro repetições, e as que envolvem parâmetros de qualidade (Fibra, Brix e Pol%Cana) foram calculadas considerando apenas duas repetições. Acima da diagonal estão as correlações para cana planta, abaixo as para cana soca e na diagonal as entre anos	33
Tabela 6. Segregações referentes as 15 combinações de AFLP, 35 SSRs genômicos e 71 EST-SSRs nos 220 clones de cana-de-açúcar derivados do cruzamento entre IACSP95-3018 e IACSP93-3046, baseadas no teste qui-quadrado a $p < 0,05$	35
Tabela 7. Relação de marcadores do cruzamento IACSP95-3018 com IACSP93-3046 em dose única quanto ao seu tipo	44
Tabela 8. Mapas de ligação presentes na literatura, com os respectivos GL, GH e cobertura total do genoma	46
Tabela 9. Relação dos EST-SSRs mapeados, localização nos grupos de homologia (GH) e de ligação (GL) e respectiva homologia	47
Tabela 10. Efeito de marcas simples e de associações ($R^2\%$) parciais e	

múltiplas (R^2 total) para as características diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana em cana planta e cana soca para marcadores do tipo AFLP	49 e 50
Tabela 11. Efeito de marcas simples e de associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para as características diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana em cana planta e cana soca para marcadores do tipo SSRs genômicos	51
Tabela 12. Efeito de marcas simples e de associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para as características diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana em cana planta e cana soca para marcadores do tipo EST-SSRs	52 e 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Freqüência de distribuição dos valores fenotípicos para diâmetro, peso, altura, número de perfilhos, TCH, Fibra, Brix e Pol%Cana dos 220 clones de cana-de-açúcar em cana planta e cana soca. P1: IACSP95-3018; P2: IACSP93-3046	30
Figura 2. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre Fibra e Pol%Cana em cana planta e cana soca.	34
Figura 3. Polimorfismo obtido com: A) microssatélite EST-SCB 27 e B) combinação ACT/CTG. Esquerda para direita: V) variante somaclonal do genitor IACSP93-3046, P1) genitor IACSP95-3018, P2) genitor IACSP93-3046 e amostra de indivíduos da população de mapeamento ...	34
Figura 4. Distribuição da freqüência de segregação das 185 e 198 marcas presentes no genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046, respectivamente, entre as 15 combinações seletivas de AFLP, os 35 SSRs genômicos e os 71 EST-SSRs avaliados nos 220 clones de cana-de-açúcar	38
Figura 5. Distribuição da freqüência de segregação das 327 marcas presentes em ambos os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046, entre as 15 combinações de AFLP, os 35 SSRs genômicos e os 71 EST-SSRs nos 220 clones de cana-de-açúcar	39
Figura 6. Mapa de ligação de cana-de-açúcar obtido para o cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046. Os números superiores referem-se ao grupo de ligação (GL) que pertencem as marcas. Os números à esquerda são as distâncias em centiMorgans (cM) entre as marcas. Os nomes das marcas estão à direita, seguidos pela sigla D1 (presente no IACSP95-3018), D2 (presente no IACSP93-3046) ou C (presente em ambos os genitores). Os GL foram reagrupados com base na presença de alelos derivados de um mesmo microssatélite (loco definido pelo par de <i>primers</i> que flanqueia o microssatélite) formando assim os grupos de homologia (GH), I ao X	40, 41, 42, 43 e 44
Figura 7. Freqüência de distribuição dos efeitos médios positivos e	

negativos dos QTAs identificados no cruzamento para diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana, medidos entre cana planta e cana soca	56, 57 e 58
Figura 8. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e peso do colmo em cana planta e cana soca	85
Figura 9. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e altura do colmo em cana planta e cana soca	85
Figura 10. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e número de colmo em cana planta e cana soca	86
Figura 11. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e TCH em cana planta e cana soca	86
Figura 12. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e Fibra em cana planta e cana soca	87
Figura 13. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e Brix em cana planta e cana soca	87
Figura 14. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e Pol%Cana em cana planta e cana soca	88
Figura 15. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e altura do colmo em cana planta e cana soca	88
Figura 16. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e número de colmos em cana planta e cana soca	89
Figura 17. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e TCH em cana planta e cana soca	89

Figura 18. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e Fibra em cana planta e cana soca	90
Figura 19. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e Brix em cana planta e cana soca.	90
Figura 20. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e Pol%Cana em cana planta e cana soca	91
Figura 21. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e número de colmos em cana planta e cana soca	91
Figura 22. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e TCH em cana planta e cana soca	92
Figura 23. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e Fibra em cana planta e cana soca	92
Figura 24. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e Brix em cana planta e cana soca	93
Figura 25. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e Pol%Cana em cana planta e cana soca	93
Figura 26. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e TCH em cana planta e cana soca	94
Figura 27. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e Fibra em cana planta e cana soca	94
Figura 28. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e Brix em cana planta e cana soca	95
Figura 29. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220	

clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e Pol%Cana em cana planta e cana soca	95
Figura 30. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre TCH e Fibra em cana planta e cana soca	96
Figura 31. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre TCH e Brix em cana planta e cana soca.	96
Figura 32. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre TCH e Pol%Cana em cana planta e cana soca	97
Figura 33. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre Fibra e Brix em cana planta e cana soca.	97
Figura 34. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre Brix e Pol%Cana em cana planta e cana soca	98

**MAPEAMENTO GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP,
MICROSSATÉLITES GENÔMICOS E FUNCIONAIS ASSOCIADOS A
PARÂMETROS AGROINDUSTRIAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi construir um mapa de ligação e identificar marcadores associados aos componentes de produção (diâmetro, peso, altura, número de perfilhos e TCH) e parâmetros de qualidade (Fibra, Brix e Pol%Cana), em uma progênie derivada cruzamento entre o clone IACSP95-3018 e a cultivar IACSP93-3046, desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Cana IAC. Para tanto, foram utilizados marcadores moleculares do tipo AFLP e microssatélites genômicos e derivados de ESTs. A progênie mostrou grande variabilidade genética tanto para os componentes de produção quanto aos parâmetros de qualidade. O mapa de ligação foi composto por 231 marcadores segregando em dose única, distribuídos em 72 grupos de ligação (GL) que deram origem a dez grupos de homologia, com cobertura de 2436 centiMorgans (cM) e distância média entre marcadores de 10,55 cM, com distribuição irregular ao longo do cromossomo. O comprimento dos GLs variou de 1 a 96 cM. Os marcadores em dose única foram utilizados na análise de marcas simples para a identificação de prováveis QTLs associados às características fenotípicas obtidas em cana planta e cana soca. Um total de 155 associações marcador/característica foi encontrado a $p < 0,05$ para as oito características avaliadas e 84 foram mapeadas em 34 GLs, sendo que apenas 16 foram observadas nos dois anos da cultura para a mesma característica.

Palavras chave: Melhoramento genético, análise de segregação, marcadores moleculares

**GENETIC MAPPING AND IDENTIFICATION OF AFLP, GENOMIC AND
FUNCTIONAL MICROSATELLITES ASSOCIATED TO TECHNOLOGICAL
PARAMETERS IN SUGARCANE**

SUMMARY - The objective of this study was to construct a linkage map and identify markers associated with yield components (diameter, weight, height, stalk number and productivity) and quality parameters (Brix, Fiber and Pol%Cana), in a progeny derived from a cross of the elite clone IACSP95-3018 and the variety IACSP93-3046, both developed from the IAC Sugarcane Breeding Program. We used molecular markers AFLP and genomic and derived from ESTs microsatellites. The progeny showed high genetic variability for both yield components and quality parameters. The genetic map was composed by 231 single markers dose, distributed onto 72 linkage groups (LG) which resulted in ten homology groups, with coverage 2436 centiMorgans (cM) and average distance between markers of 10.55, with irregular distribution along the chromosome. The length of the LG ranging from 1 to 96 cM. Single marker trait association analysis was performed with the single dose markers to identify putative QTLs associated with the phenotypic measures obtained at cane plant and ratoon cane. A total of 155 marker/trait association was detected at $p < 0.05$ for the eight traits evaluated and 84 were mapped in 34LGs, and only 16 were observed in both cycles for the same trait.

Key words: Genetic breeding, segregation analysis, markers molecular

1. INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar exerce uma grande influência econômica para o Brasil. Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Produto Interno Bruto (PIB) em 2008 foi de 2,9 trilhões de reais, sendo que a agropecuária participa com 163,5 bilhões de reais (5,66%), e a cana-de-açúcar com 86 bilhões (3,6%). O seu desempenho é bastante favorável, estados dependentes dessa cultura aparecem com os valores do PIB aumentados. No acumulado de 2008, o aumento de 5,8% no PIB da agropecuária foi influenciado em 19,2% pela cultura (IBGE, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. A quantidade de cana-de-açúcar processada pelas usinas brasileiras (milhões de toneladas), produção de açúcar (milhões de toneladas) e álcool (milhões de litros) na safra de 1992/1993 saltou de aproximadamente 176, 7 e 10 para 505 e 27 e 25 na atual safra 2008/2009, respectivamente, na região Centro-Sul. Esse aumento representou um crescimento de 93,5%, 143% e 75% em 16 safras para essas características. Já na região Nordeste, adotando os mesmos parâmetros e as mesmas safras o salto notado foi de aproximadamente 47, 3 e 1,5 para 64, 4 e 2,5. Em 16 safras houve um aumento percentual de 17, 17 e 33 para produção de cana-de-açúcar, açúcar e álcool, respectivamente (UNICA, 2009).

A principal estratégia para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar é o uso de variedades melhoradas geneticamente, mas o alto nível de ploidia aliado a aneuploidia (HOARAU et al., 2001) dificultam o melhoramento genético. O processo de obtenção de nova variedade é longo e laborioso, exigindo cerca de 12 a 15 anos para sua obtenção (LANDELL et al., 1999).

A fim de diminuir o tempo despendido para obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar, os marcadores moleculares se tornam valiosas ferramentas. A partir

deles, pode-se mapear e identificar características agronômicas de interesse, assim como praticar a seleção assistida (CAIXETA et al., 2009), a qual consiste na seleção indireta de genótipos superiores por marcadores moleculares.

Atualmente existem diversos tipos de marcadores moleculares, tais como AFLP (VOS et al., 1995), microssatélites genômicos, que são provenientes de bibliotecas genômicas e os microssatélites ESTs (Expressed Sequence Tag), provenientes de banco de dados de sequências expressas, do projeto SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tag). Os marcadores obtidos a partir de sequências expressas, ESTs, nos permitem a construção de mapas funcionais, já que utilizam genes cuja função é conhecida.

O mapeamento genético de organismos poliplóides só tornou-se possível através da análise de segregação dos marcadores em dose única (MDUs), descrita por WU et al (1992). A partir dos mapas de ligação é possível conhecer a organização do genoma e identificar os marcadores que estão ligados a características que são agronomicamente importantes, permitindo uma maior clareza sobre a influência (positiva ou negativa) que os genes exercem sobre estas características e possivelmente detectar prováveis QTLs (Quantitative trait loci).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo construir um mapa de ligação e identificar marcadores associados a características de interesse agrônomico em progênie do cruzamento entre duas cultivares de cana-de-açúcar, utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP e microssatélites genômicos e derivados de ESTs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação botânica da cana-de-açúcar

A classificação taxonômica descrita por CRONQUIST (1981) determina que a cana-de-açúcar pertence à divisão *Magnoliophyta*, classe *Liliopsita*, ordem *Cyperales*, família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae*, subtribo *Saccharinae*, gênero *Saccharum*, contendo seis espécies: *Saccharum officinarum* ($2n=80$), *S. barberi* ($2n=81-124$), *S. robustum* ($2n=60-250$), *S. spontaneum* ($2n=40-128$), *S. sinensis* ($2n=111-120$) e *S. edule* ($2n=60-80$).

MURKHERJEE (1957) em estudos realizados em geobotânica definiu o “Complexo *Saccharum*” que foi aprimorado posteriormente por DANIELS et al. (1975). Nestes estudos foram constatados que os gêneros *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Narenga* e *Miscanthus* formavam um grupo de intercruzamento muito próximo, estando possivelmente envolvidos na origem da cana-de-açúcar.

A origem da variabilidade genética da cana-de-açúcar pode ser dividida em três pontos: cultivares tradicionais, selvagens e modernas. As cultivares tradicionais pertencem a espécie *S. officinarum*, que acumulam altos níveis de sacarose, colmos grossos e com teor de fibra adequado à moagem. Já as cultivares selvagens englobam as espécies *S. spontaneum* e *S. robustum* que são praticamente desprovidas de sacarose, seus colmos são finos e fibrosos, com abundante perfilhamento. As cultivares modernas são derivadas de hibridações entre espécies tradicionais e selvagens, seguidas por vários retrocruzamentos com *S. officinarum*, processo denominado de “nobilização”, para recorrer à característica agrônômica de alta produção de açúcar (STEVENSON, 1965). Aproximadamente 80% do seu genoma é contribuição da *S. officinarum*, enquanto 10 a 15% são contribuições da espécie selvagem *S. spontaneum*

e apenas 5 a 10% são provenientes de recombinações cromossômicas (D'HONT et al., 1996), comprovando a estreita base genética das cultivares modernas.

Quase todos as cultivares tradicionais desapareceram do cultivo, mas permanecem como importantes genitores das cultivares modernas e como potencial fonte de características para futuro melhoramento.

2.2 Aspectos relacionados ao melhoramento genético da cana-de-açúcar

O melhoramento convencional da cana-de-açúcar inicia-se pela obtenção de variabilidade genética adequada para a seleção, a qual é obtida pela hibridação entre dois (cruzamentos bi-parentais) ou mais clones (policruzamentos). Em geral, as populações utilizadas para seleção são derivadas do cruzamento de variedades comerciais ou clones pré-comerciais. Os programas de melhoramento de plantas buscam utilizar em seus cruzamentos indivíduos que sejam divergentes, com bons atributos agronômicos e resistentes às principais doenças, objetivando assim, aumentar a variabilidade genética da geração segregante, aumentando a probabilidade de identificar indivíduos superiores (CRUZ et al., 2004).

Como a cana-de-açúcar é uma espécie alógama, poliplóide e de propagação vegetativa, os clones envolvidos nos cruzamentos são altamente heterozigóticos, o que proporciona variabilidade genética na primeira geração de cruzamento (geração F₁). Devido à propagação vegetativa, há uma fixação do potencial genético individual do clone, não havendo uma alteração genética ao longo das gerações (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Os indivíduos originários de sementes sexuadas (*seedlings*), obtidos na fase de geração de variabilidade, são avaliados para um grande número de caracteres. Cada clone é representado por uma única planta (poucos colmos em uma touceira) repetido apenas uma vez em um único ambiente. Nesta fase, é efetua-se seleção individual para

caracteres de baixa herdabilidade com eliminação dos indivíduos (clones) cujos caracteres estão abaixo dos níveis exigidos. Aqueles selecionados são multiplicados via clonagem através dos colmos, o que permite a transmissão integral do genótipo e sua avaliação em experimentos com repetições. O número de clones a ser avaliado diminui ao longo do processo seletivo, aumentando de forma gradativa o número de repetições, locais de avaliação e o tamanho das parcelas, ou seja, da precisão experimental, de forma que nas avaliações finais, a precisão experimental é alta suficiente para identificar e selecionar o genótipo superior (SOUZA JÚNIOR, 1989; SOUZA JÚNIOR, 1995; BRESSIANI, 2001). Desse modo, a obtenção de uma variedade de cana-de-açúcar exige longo tempo, normalmente 12 a 15 anos, desde a escolha dos parentais até o plantio em escala comercial (LANDELL et al., 1999).

Em relação aos principais caracteres envolvidos no melhoramento da cana-de-açúcar, a produção de açúcar por hectare (TAH ou TPH) constitui a mais importante. A produção de açúcar por hectare envolve os componentes: tonelagem de cana por hectare (TCH) e teor de açúcar da cana (POL da cana). O componente TCH é subdividido em número de colmos por hectare e peso por colmo o qual é composto pelo diâmetro, altura e densidade. A brotação rápida, vigorosa e prolongada da soqueira, a tolerância ao frio e a seca, hábito ereto e a ausência de florescimento dos colmos, tipo e teor de fibra e adaptabilidade à colheita mecânica também são características desejáveis na cultura. Outro ponto importante, diz respeito à resistência a doenças, a qual constitui o principal fator de substituição das variedades (BRESSIANI, 2001).

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 peso/peso 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. Por outro lado, baixos conteúdos de fibra estão associados ao aumento do acamamento e quebramento. 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 variedades com altos níveis de Pol e valores adequados de Fibra. Atualmente, há um interesse crescente no aumento da produção do bagaço para a cogeração 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 & CROSS (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.

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).

O conhecimento das relações entre os componentes de produção de açúcar pode aumentar a eficiência de seleção para produção de açúcar (AITKEN et al., 2008). Recentemente, um aumento na produção de açúcar tem sido atingido principalmente pelo aumento dos componentes de produção da cana-de-açúcar do que propriamente pelo teor de açúcar da cana-de-açúcar (JACKSON, 2005).

2.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM & SANTOS, 2004). Dentre suas aplicações no melhoramento vegetal, está a seleção assistida de características de importância agrônômica. Uma vez mapeadas e identificadas, tais características podem ser selecionadas indiretamente por marcadores moleculares diretamente ligados a elas através da seleção assistida por marcadores (SAM). A identificação da ligação entre marcador e a característica de interesse é um pré requisito para a aplicação da SAM (DEMEKE et al., 1997; MOHAN et al., 1997; MILACH, 1998; GRUPTA et al., 1999; MORGANTE & SALAMINI, 2003; CHARCOSSET & MOREAU, 2004, PINTO et al., 2009).

Considerando que um programa de melhoramento de cana-de-açúcar leva no mínimo 10 anos para lançar uma nova cultivar, os marcadores moleculares podem representar uma importante ferramenta já que reduzem o tempo de lançamento de novas cultivares com características agrônômicas desejáveis (PINTO et al., 2009).

2.3.1 Marcadores moleculares baseados em AFLP

Os marcadores gerados pela análise de polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), descrita por VOS et al. (1995), associam a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

O DNA genômico total da planta é clivado por enzimas de restrição, originando um número extremamente elevado de fragmentos. Esses fragmentos são conseguidos a partir da digestão do DNA total com duas enzimas de restrição: uma de corte raro, com sítio de restrição contendo seis a oito bases (*EcoRI*: um corte a cada 2- 2,5 kb em *Arabidopsis sp*) e uma de corte freqüente, com sítio de restrição contendo quatro bases (*MseI*: um corte a cada 300-400 pb em *Arabidopsis sp*) (LISCUM & OELLER, 2000).

O uso de duas enzimas de restrição para a digestão do genoma resulta em três tipos de fragmentos de DNA: aqueles onde as duas extremidades foram clivadas somente com a enzima de corte freqüente, os que foram clivados apenas pela enzima de corte raro e os que sofreram a ação das duas enzimas. VOS et al. (1995) constataram que 90% dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição eram os que continham as duas extremidade clivadas pela enzima de corte freqüente (*MseI*), mas os fragmentos predominantemente amplificados são aqueles que foram clivados pelas duas enzimas de restrição. Este fato é explicado porque o primer- *MseI*, complementar ao sítio de restrição da *MseI*, apresenta uma temperatura de anelamento menor, fazendo com que a amplificação desses fragmentos sejam menos eficientes. Além disso, os fragmentos *MseI*- *MseI* ou *EcoRI*-*EcoRI*, possuem regiões invertidas em suas extremidades, o que pode ocasionar um pareamento das mesmas, criando uma competição com o primer (VOS et al., 1995; CAIXETA et al., 2009).

Uma vez feita a digestão, oligonucleotídeos (25-30 pb) adaptadores são ligados às extremidades de cada fragmento. Esse passo faz-se necessário para que não haja uma restauração no sítio original da enzima, devido à mudança de base na sequência do adaptador, impedindo a ocorrência de uma nova clivagem depois que a ligação tenha sido concluída. Esta estratégia de reação simultânea permite que a digestão e a ligação ocorram no mesmo tubo (CAIXETA et al., 2009; BLEARS et al., 1998).

A seguir uma amplificação seletiva é realizada com dois iniciadores complementares a ambos os adaptadores. Um complementar ao adaptador da enzima de corte raro seguido de um ou três nucleotídeos aleatório na extremidade 3' e outro complementar ao adaptador da enzima de corte freqüente acrescido por um ou três nucleotídeos na extremidade 3'. O uso desses dois iniciadores seletivos reduz a quantidade de fragmentos de DNA, já que apenas os que contém os nucleotídeos seletivos flanqueando o sítio de restrição serão amplificados (CAIXETA et al., 2009; BLEARS et al., 1998).

Embora haja a possibilidade de utilizar diferentes quantidades de nucleotídeos seletivos VOS et al. (1995) demonstraram a necessidade de utilização de três bases seletivas para obtenção de padrão de bandas desejável e também constataram que a cada base seletiva adicionada o número de fragmentos amplificados é reduzido em aproximadamente quatro vezes. Entretanto, eles observaram que a amplificação realizada diretamente com iniciadores contendo três nucleotídeos seletivos resultava em produtos com amplificações não específica, o que causava um grande arraste no gel. A fim de liquidar esse problema, desenvolveram uma estratégia baseada em duas amplificações. A primeira, denominada de pré-amplificação, utiliza iniciadores com um ou nenhum nucleotídeo seletivo. Esses produtos pré-amplificados são utilizados como DNA molde para a segunda reação de amplificação realizada com três nucleotídeos seletivos (VOS et al., 1995).

Por fim, os fragmentos amplificados são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante de alta resolução, sendo que o polimorfismo é identificado pela presença ou ausência de bandas.

A técnica AFLP tem as vantagens de ser relativamente barata, fácil, rápida e também analisar o genoma completo da espécie o que lhe confere a capacidade de gerar centenas de marcadores genéticos informativos. Porém apresenta a desvantagem de ser dominante, não possibilitando a identificação de indivíduos heterozigóticos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MUELLER & WOLFENBARGER, 1999).

2.3.2 Marcadores moleculares baseados em microssatélites

O DNA microssatélite também conhecido como *Simple Sequence Repeat* (SSR), consiste de pequenas sequências de DNA, com um a quatro nucleotídeos repetidos em tandem, cerca de oito vezes ou mais. Em genomas de eucariotos, estas sequências simples são muito freqüentes e distribuídas ao acaso, além de constituírem locos genéticos altamente polimórficos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites são muito atrativos aos melhoristas vegetais, pois eles combinam várias vantagens, como: 1) natureza codominante e multialélica; 2) altamente polimórficos, permitindo discriminações precisas, mesmo de indivíduos altamente relacionados; 3) distribuição abundante e uniforme em todo o genoma de plantas; 4) podem ser analisados pela PCR; 5) a genotipagem por SSR pode ser semi-automatizada em ensaios multiplex, utilizando-se iniciadores marcados por fluorescência; 6) a informação do marcador, baseada nas seqüências dos iniciadores, pode ser facilmente publicada e trocada entre laboratórios, melhorando os esforços cooperativos em pesquisa e desenvolvimento (BRONDANI et al., 1998).

Existem dois tipos de marcadores microssatéltes: os tradicionais que são provenientes de bibliotecas genômicas, denominados de SSRs genômicos, e os que são oriundos de banco de dados de sequências expressas (*Expressed Sequence Tags*) e portanto, denominados de EST-SSRs.

Os microssatélites genômicos são obtidos a partir da clivagem total do DNA genômico. Os fragmentos são selecionados quanto ao tamanho (300-700 pb) e ligados

a um vetor. O conjunto vetor-inserto é transformado, e milhares de clones recombinantes são produzidos e selecionados por hidridizações com sondas, selecionando aqueles que contenham microssatélites. Os insertos das colônias positivas são seqüenciados e analisados para confirmar a presença dos microssatélites. Por fim, iniciadores flanqueando os microssatélites são desenhados (CAIXETA et al., 2009).

Os EST-SSRs são derivados de sequências expressas (ESTs) armazenadas em bancos de dados, e que representam sequências transcritas do genoma. Elas apresentam homologia a genes envolvidos em diferentes vias metabólicas das plantas como, por exemplo os genes responsáveis pelo desenvolvimento, estresse biótico e abiótico, regulação gênica e proteínas essenciais (ARRUDA, 2001). Por serem derivados de regiões codificantes do genoma, os EST-SSRs são mais conservados que as sequências não-codificantes (TEMNYKH et al., 2001; MORGANTE et al., 2002), apresentando menores polimorfismos e maiores chances de marcarem características de interesse.

O desenvolvimento dos EST-SSRs é feito através da mineração de sequências contendo microssatélites de dentro de bancos de dados.. Esta estratégia dispensa o seqüenciamento de DNA sendo uma forma simples, rápida e econômica de obter iniciadores flanqueando as regiões microssatélites, comparado ao SSRs obtidos das bibliotecas de DNA genômico (ZANE et al., 2002).

Um total de 2005 clusters contendo microssatélites foram encontrados no SUCEST (*Sugarcane EST*), que é o maior e mais completo banco de dados de sequências expressas para cana-de-açúcar. A maioria destes clusters mostrou homologia a algumas proteínas, incluindo proteínas que se ligam ao RNA e DNA, proteínas relacionadas à defesa e regulação, entre outras (PINTO et al., 2004).

Devido à abrangência de regiões conservadas, atualmente, os EST-SSRs, são bastante utilizados em estudos de transferibilidade. Esse processo faz com que os marcadores SSRs apresentem um grande potencial no mapeamento comparativo (YU et al., 2004) bem como na clonagem de genes específicos e no estabelecimento de perfis únicos '*fingerprint*' para proteção varietal.

Os microssatélites têm sido úteis para integração de mapas genéticos e mapas físicos e tem provido os melhoristas e geneticistas com uma ferramenta eficiente para associar variação genética e fenotípica (GUPTA & VARSHNEY, 2000).

2.4 Mapeamento genético em cana-de-açúcar

A construção de um mapa de ligação depende da estrutura genética, tamanho e complexidade da população a ser mapeada. Devido à complexidade, ao grande tamanho e alto nível de poliploidia do genoma da cana-de-açúcar, o seu mapeamento é muito complicado e laborioso, em comparação ao mapeamento de espécies diplóides. No mapeamento da cana-de-açúcar, há necessidade de utilizar maior número de marcadores moleculares e progênies maiores (EDEMÉ et al., 2006) devido a existência de mais de dois alelos para um mesmo loco, com presença de alelos segregando individualmente em números variados, além da aneuploidia (HORAU et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

O mapeamento genético em organismos poliplóides tornou-se possível através da análise da segregação de marcadores em dose única (MDU). 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 (WU et al., 1992). Marcadores em dose única em ambos os genitores segregando na progênie na proporção 3:1, embora menos informativos, também podem ser utilizados no mapeamento.

Os primeiros mapas genéticos em cana-de-açúcar foram construídos para se conhecer a organização do seu genoma, bem como buscar tipo de populações que aumentem o surgimento das doses únicas. Esse fato pode ser confirmado observando o pequeno tamanho das progênies que foram utilizadas nos trabalhos de AL-JANABI et al. (1993) e GRIVET et al. (1996) (Tabela 1). Embora essas populações fossem pequenas, elas atendiam a proposta feita por WU et al. (1992), sendo que para detectar

Tabela 1. Mapas de ligação publicados para cana-de-açúcar.

População de mapeamento	Tamanho da progênie	Tipo de marcador	Dose		Marcas ligadas	Grupo de ligação	Cobertura do mapa (cM)	Referência
			DS 1:1 e 3:1	DD				
ADP068 x SES208	88	RAPD	208	-	176	42	1500	AL-JANABI et al., 1993
R570	77	RFLP, Isoenzimas	505	-	408	96	2008	GRIVET et al., 1996
R570	295	AFLP	939	-	887	120	5849	HOARAU et al., 2001
IJ76-514 x Q165	227	AFLP, RAF, SSR	1003	123	1074	136	9058,3	AITKEN et al., 2005
R570 ¹ x MQ76-53 ²	198	AFLP, SSR, RFLP	1057	-	424 ¹ 536 ²	86 ¹ 105 ²	3144 ¹ 4329 ²	RABOIN et al., 2006
SP80-180 x SP80-4966	100	RFLP, SSR, RFLP	1118	-	357	131	2602,4	GARCIA et al., 2006
IJ76-514 x Q165	227	AFLP, SSR	240	234	534	123	4906,4	AITKEN et al., 2007
SP80-180 x SP80-4966	100	AFLP, gSSRs, EST-SSRs, EST-RFLP, gRFLP	1669	-	664	192	6261,1	OLIVEIRA et al., 2007
La Striped ¹ x SES 147B ¹	100	AFLP, SRAP, TRAP	247 ¹ 221 ²	33 ¹ 43 ²	146 ¹ 121 ²	49 ¹ 45 ²	1732 ¹ 1491 ²	ALWALA et al., 2008

DS: dose simples, DD: dose dupla, cM: centiMorgans.

marcadores em dose única a população de mapeamento utilizada deveria ser maior que 75 indivíduos.

A tabela 1 mostra alguns dos mapas genéticos publicados para cana-de-açúcar, com os respectivos cruzamentos, tamanho da progênie, tipo de marcadores utilizados, dose analisada (simples ou dupla), número de marcas ligadas, grupos de ligação formados e a cobertura do mapa obtido, em centiMorgans.

No mapeamento genético da cana-de-açúcar três estratégias são utilizadas para obter maior número de locos informativos. A primeira delas é a utilização de um dos genitores duplo-haplóide. Neste caso, a maioria dos locos estão em homozigose e quando cruzado com um genitor heterozigoto, a progênie segregará na proporção de 1:1, como um cruzamento teste. Esta estratégia foi utilizada por AL-JANABI et al. (1993) e DA SILVA et al. (1993). A segunda é a utilização da autofecundação, aproveitando-se das doses únicas 3:1, utilizadas nos trabalhos de GRIVET et al. (1996) e HOARAU et al. (2001) para a construção do mapa da variedade R570. A última estratégia consiste em realizar cruzamentos interespecíficos, tais como as populações de mapeamento geradas a partir do cruzamento entre *S. spontaneum* ('IND 81-146' e 'PIN 84-1') com *S. officinarum* ('Green German' e 'Muntok Java'), realizados por MING et al. (2002) e também na introgressão de genes, apresentada por AITKEN et al. (2005), RABOIN et al. (2006), EDEMÉ et al. (2006), AITKEN et al. (2007) e ALWALA et al. (2008). Todas as estratégias citadas maximizam o surgimento dos marcadores em dose única que poderiam segregar na progênie, o que é imprescindível na construção de mapas de ligação.

Cruzamentos bi-parentais envolvendo variedades comerciais ou clones elites de cana-de-açúcar também têm sido utilizados para a construção de mapas de ligação (GARCIA et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2007). A utilização de clones elites assim como de variedades envolvidas nas campanhas de cruzamento dos programas de melhoramento podem permitir a identificação de alelos favoráveis, uma vez que os genitores envolvidos nos cruzamentos já passaram por processos de seleção. O primeiro mapa funcional em cana-de-açúcar foi publicado por OLIVEIRA et al. (2007) utilizando população derivada do cruzamento entre dois clones elites. Esse tipo de mapa pode facilitar a identificação de marcadores

associados as características de interesse agrônômico, tornando peça fundamental na detecção dos QTLs.

Marcadores em dose única estão presentes em altas frequências no genoma da cana, aproximadamente 70% a 84% (AITKEN et al., 2005; DA SILVA et al., 2005). Entretanto, mapeando somente essas doses, os mapas de ligação publicados até o presente momento, ainda apresentam uma cobertura limitada do genoma, sendo que em média cerca de 16% a 30% das marcas ainda continuam não ligadas, isto é, estão segregando em outras doses (AITKEN et al., 2005; DA SILVA et al., 2005). O mapa mais saturado publicado até o momento em cana-de-açúcar foi feito por AITKEN et al. (2005) que representa cerca de metade do seu genoma, seguido pelo mapa feito por HOARAU et al. (2001), com cobertura aproximada de um terço do genoma.

A utilização de marcadores que estão presentes em mais de uma cópia em apenas um dos genitores (multidoses) podem aumentar a cobertura do mapa em regiões do genoma que apresentam baixo nível de marcadores em dose única, fazendo com que o número de marcadores não ligados diminua, assim como demonstrado por AITKEN et al. (2007) e EDEMÉ et al. (2006).

AITKEN et al. (2007) incorporando os marcadores em doses duplas em seu mapa de ligação teve um aumento no número de grupos de ligação de 47 para 123 e, conseqüentemente, a cobertura do mapa de 2441 cM, somente utilizando marcadores em doses simples, passou para 4906 cM com ambas as doses.

EDEMÉ et al. (2006), além de utilizarem os marcadores em dose única, 1:1 (simplex), utilizaram também aqueles que segregam em dose dupla, 3:1, 11:3 e 7:2 (duplex, presente em duas cópias em um dos genitores), em dose tripla, 13:1, 15:1 e 11:1 (triplex, presente em três cópias em um dos genitores) e em dose quádrupla, 64:1 e 69:1 (quadriplex, presente em quatro cópias em um dos genitores), sendo que 78% segregaram nos modelos Mendelianos propostos e 22% apresentaram distorção de ligação.

2.5 Detecção e mapeamento de QTLs

A maioria das características de interesse agrônomo em plantas são controladas por vários genes. Nesse caso, os fenótipos resultantes apresentam uma variação contínua ao invés de classes fenotípicas discretas. Os genes ou locos cromossômicos que controlam essas características quantitativas são denominados de QTL (*Quantitative Trait Loci*) (FACONER & MACKAY, 1996).

O mapeamento de QTLs envolvidos na manifestação de diversos caracteres de interesse se dá com base entre as relações fenotípicas e genotípicas (através de marcadores moleculares), podendo estar associado a um efeito positivo ou negativo na característica.

Entretanto, os testes estatísticos são viesados, porque existe uma confusão entre efeito de QTL e a distância do marcador, resultando em um baixo poder de detectar quando as marcas não estão completamente cobertas pelo genoma ou quando uma pequena amostra é considerada (DOERGE et al., 1997; DOERGE, 2002). Existem vários softwares que são capazes de detectar QTLs em cana-de-açúcar, entre eles, o MAPMAKER/QTL e o SAS usados por MING et al. (2001) e MING et al. (2002), bem como o QTL Cartografer, usado por AITKEN et al. (2008).

O mapeamento de QTLs é de suma importância uma vez que pode aumentar o conhecimento das relações existentes entre a influência dos genes com a produção de açúcar e as características relacionadas, facilitando a determinação e manipulação dessas características para o desenvolvimento de variedades superiores de cana-de-açúcar (MING et al., 2002).

Os caracteres quantitativos são altamente influenciados pelo ambiente e expressam distintos graus da interação genótipo x ambiente, isto é, aquele(s) genótipo(s) que tem um desempenho diferenciado em distintos ambientes (FACONER & MACKAY, 1996). Por isso é importante estudar as características quantitativas em diferentes ambientes (anos), pois se um QTL é detectado para

ambos, a chance dele estar ligado ao valor genotípico do indivíduo é maior do que estar expressando apenas o fenótipo, apresentando maiores possibilidades de ligação com a característica avaliada e utilização na seleção assistida. Estudos de detecção de QTLs em distintos anos foram feitos por HOARAU et al. (2002), AITKEN et al. (2006), AITKEN et al. (2008) e PINTO et al. (2009) (Tabela 2).

A tabela 2 apresenta alguns resultados publicados de mapeamento de QTLs em cana-de-açúcar, identificando o tipo de progênie que foi utilizado bem como os marcadores moleculares, as características relacionadas com os respectivos níveis de significância, o efeito que as marcas detectadas apresentam sobre as variações fenotípicas das características e o coeficiente de regressão (R^2), como sendo a porcentagem da variação fenotípica atribuída ao QTL.

O fato dos efeitos dos QTLs serem baixos é atribuído a condição de poliploidia da cana-de-açúcar, sendo que a presença de vários alelos exercendo influência sobre a mesma característica resulta em vários alelos com baixo efeito individual (AITKEN et al, 2008).

Tabela 2. Detecção de QTLs para cana-de-açúcar.

População de mapeamento	Tipo de marcador	Característica avaliada	QTL	Efeito	R ²	Referência			
Green German x IND81-146	RFLP	Conteúdo de açúcar	14***	-23,40 a 20,0	65,5%	MING et al. (2001)			
	RFLP	Conteúdo de açúcar	22***	-9 a 18,8	68,3%	MING et al. (2001)			
Green German x IND81-146	RFLP	Produção de açúcar	3***	-0,46 a 0,55	14,4%	MING et al. (2002)			
		Pol	2***	-1,27 a 0,92	18,5%				
		Peso do colmo	10***	-4,45 a 2,66	62,7%				
		Número de colmos	2***	-5,05 a 7,38	13,9%				
		Fibra	19***	-1,61 a 2,67	60,6%				
		Cinzas	7***	-1,05 a 1,04	39,1%				
PIN84-1 x Muntok Java	RFLP	Produção de açúcar	7***	0,08 a 0,14	30,2%	MING et al. (2002)			
		Pol	12	-0,57 a 0,98	39,9%				
		Peso do colmo	24***	-1,91 a 2,36	71,6%				
		Número de colmos	1***	0,08	6,1%				
		Fibra	1***	-1,28	7,0%				
		Cinzas	13***	-0,78 a 0,71	41,4%				
R570	AFLP	Diâmetro do colmo	29*	-0,109 a 0,087	1 a 4%	HOARAU et al. (2002)			
			(31*)	(-0,095a 0,0113)	(1 a 7%)				
		Altura do colmo	22*	-8,74 a 10,76	1 a 5%				
			(25*)	(-8,96 a 12,18)	(2 a 6%)				
		Número de colmos	24*	-1,76 a 2,38	1 a 7%				
			(31*)	(-2,96 a 2,61)	(2 a 5%)				
		Brix	10*	-0,41 a 0,54	1 a 4%				
			(12*)	(-0,42 a 0,51)	(2 a 5%)				
		IJ76-514 x Q165 ^A	AFLP e SSR	Brix	21*		-0,38 a 0,44	2 a 5%	AITKEN et al. (2006)
					(22*)		(-0,39 a 0,45)	(3 a 6%)	
Pol	20*			-2,12 a 2,12	5 a 2%				
IJ76-514 x Q165 ^{A1}	AFLP e SSR	Peso do colmo	(18*)	(-1,78 a 2,31)	(2 a 6%)	AITKEN et al. (2008)			
			22*	-0,88 a 0,72	2 a 9%				
			(22*)	(-0,35 a 0,37)	(2 a 5%)				
		23*	-1,53 a 1,23	2 a 7%					
		Diâmetro do colmo	(20*)	(-1,48 a 1,42)	(2 a 6%)				

Tabela 2. Continuação

	Número de colmos	11* (15*)	-1,28 a 1,04 (-1,02 a 1,27)		2 a 9% (2 a 4%)
	Altura do colmo	16* (13*)	-12,28 a 11,92 (-9,41 a 10,11)		2 a 6% (2 a 7%)
	TCH	22* (11*)	-13,72 a 12,78 (-7,71 a 8,19)		2 a 7% (2 a 4%)
	Fibra	15* (12*)	-1,04 a 0,76 (-0,90 a 0,90)		3,99 a 10,9% (3,88 a 9,8%)
	TCH	11* (18*)	-31,29 a 12,67 (-32,29 a 12,62)		4,12 a 18,12% (4,14 a 7,85%)
	Pol	19* (15*)	-1,28 a 0,71 (-0,76 a 0,81)		4,48 a 8,89% (3,98 a 12,60%)
	TPH	13* (17*)	-3,48 a 2,17 (-3,19 a 2,09)		4,36 a 20,1% (4,03 a 9,82%)
SP80-180 x SP80-4966	RFLP, EST				PINTO et al. (2009)

Nível de significância entre a associação da marca com a característica avaliada: *p<0,05, ***p<0,03; entre parênteses estão os valores de ano diferente da cultura de cana-de-açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População de mapeamento

A população de mapeamento foi constituída de 200 indivíduos tomados ao acaso de uma progênie derivada de um cruzamento bi-parental entre o clone elite 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). O clone IACSP95-3018 é bastante utilizado como genitor em programas de melhoramento e apresenta suscetibilidade à ferrugem, enquanto a cultivar IACSP93-3046 apresenta altos níveis de sacarose, bom perfilhamento, colmos eretos sendo recomendada para colheita mecanizada e com resistência à ferrugem.

O experimento foi conduzido na fazenda Nova Aliança no município de Salles Oliveira-SP, nos anos agrícolas de 2007/08 e 2008/09. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada bloco foi formado por quatro linhas de 118 metros, espaçadas 1,5 metros e as parcelas de dois metros lineares alocadas nessas linhas. Os blocos foram formados com os 220 clones, mais quatro repetições das duas variedades utilizadas como padrões, SP81-3250 e RB835486, e dos dois genitores. Cada bloco teve como bordadura a IAC86-2480 (infectora da ferrugem marrom) além de mais uma bordadura no experimento todo com a IAC86-2210 (infectora do mosaico). A progênie apresenta variabilidade para os componentes de produção percentual de Brix, perfilhamento e altura de colmos e também para resistência a doenças como, por exemplo, a ferrugem.

3.2 Avaliações fenotípicas

Depois de decorrido 12 meses do plantio em ambos os anos (cana planta e cana soca), amostras de 10 canas-de-açúcar foram coletadas de cada clone e genitores e avaliadas para os componentes de produção e os parâmetros de qualidade. Foram estimados, para as quatro repetições nos dois anos, os componentes de produção:

- a) diâmetro do colmo, amostrando-se dez colmos seguidos na linha, mensurado com paquímetro no meio do entrenó localizado no comprimento médio do colmo;
- b) peso dados em kilos (kg) do feixe constituído de 10 colmos
- c) altura do colmo, medido da base à inserção da folha +3, estimado nos mesmos dez colmos;
- d) número de colmos estimado com a contagem dos colmos no sulco de 2m
- e) TCH (Toneladas de cana por hectare) valor estimado com base no número de colmos da parcela (NC) e no peso do feixe de 10 colmos (P), através da equação

$$\text{TCH} = \text{NC} \times \text{P} \times 0,667$$

Os parâmetros de qualidade, Fibra, Brix e Pol%Cana também foram mensurados de amostras de 10 canas-de-açúcar coletadas de cada clone e genitores, de acordo com os métodos descritos no guia CONSECANA (2006). Devido aos altos custos que essas análises requerem, somente dois dos quatro blocos foram avaliados. Brix refere a estimativa do total de sólidos solúveis que estão presentes no caldo, enquanto Pol%Cana é definido como a quantidade de sacarose presente em 100ml da solução e Fibra refere-se a matéria insolúvel em água que está presente no colmo.

3.2.1 Análise dos dados

As dez características avaliadas foram submetidos a análise de variância pelo programa estatístico SAS (SAS, 1990) e comparado os níveis de significância entre blocos, entre os clones, entre genitores. Também foi calculado o coeficiente de variação do experimento (CV%), o erro, através do resíduo do quadrado médio, bem como a média dos genitores e dos clones.

A análise de variância foi calculada para cada característica de cada ano da cultura, baseada no modelo abaixo:

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

Onde, μ , b_j , g_i e ε_{ij} são a média geral, efeito de bloco, efeito do genótipo e efeito do erro, respectivamente. Os efeitos de genótipos foram separados em efeitos de clones, de genitores e de padrões, com auxílio de variáveis que as identificavam.

Herdabilidade no sentido amplo (h^2) para cada característica em cada ano foi determinada por (FALCONER & MACKAY, 1996)

$$\hat{h}^2 = \hat{\sigma}_g^2 / \hat{\sigma}_p^2,$$

Onde, $\hat{\sigma}_g^2$ = variância genotípica e $\hat{\sigma}_p^2$ = variância fenotípica, sendo que esta é determinada por:

$$\hat{\sigma}_p^2 = \hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_e^2 / r,$$

Onde, $\hat{\sigma}_e^2$ = variância do erro e r = número de repetições.

A correlação fenotípica entre as características X e Y, foi determinada por:

$$\text{Cor}(x,y) = (\text{Cov}(x,y) / (V(x) \cdot V(y))^{1/2} ,$$

Onde, $\text{Cov}(x,y)$ = componentes da covariância entre os caracteres X e Y; $V(x)$ e $V(y)$ = variância dos caracteres X e Y, respectivamente.

Todas as análises estatísticas dos dados fenotípicos foram calculadas através do programa estatístico SAS (1990).

3.3 Avaliações com Marcadores Moleculares

3.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico total foi extraído utilizando o internódio +1 da cana-de-açúcar (primórdios foliares), conforme o método de AL-JANABI et al. (1999). 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

Foram utilizados 35 microssatélites genômicos (gSSRs) (CORDEIRO et al., 2000) previamente mapeados na população do Centro de Tecnologia Canavieira (SOUZA, 2003) e 71 microssatélites funcionais provenientes das etiquetas de seqüências expressas (EST-SSRs) do banco de dados do SUCEST, os quais vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG/UNICAMP). Grande parte destes EST-SSRs apresentam homologia a genes de interesse.

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 94^oC por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, cada ciclo contendo uma etapa de desnaturação à 94^oC por 30s, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* (*forward/reverse*) por 30s, extensão à 73^oC por 30s, e um ciclo final à 73^oC 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% xilene cianol) na proporção (2 tampão:1 amostra) e desnaturados à 95^oC por 5 minutos. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante a 5% utilizando ladder de 10 bp como marcador de peso molecular. As bandas foram reveladas pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por CRESTE et al. (2001).

3.3.3 Avaliação com marcadores AFLP

Os marcadores AFLPs foram obtidos segundo o método de Vos et al. (1995). Para a obtenção dos marcadores AFLP, 300ng de DNA genômico foram digeridos duplamente com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* e os fragmentos obtidos ligados a adaptadores específicos. Os produtos da digestão ligação foram diluídos 6 vezes em água miliQ antes da pré-amplificação com primers de uma base seletiva. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos 10 vezes em água miliQ e utilizados nas reações da amplificação seletiva compostas por combinações de primers (*EcoRI/MseI*) de três bases seletivas (AAC/CAA, AAC/CAC, AAC/CAT, AAG/CAG, AAG/CAT, ACC/CTC, ACG/CAG, ACG/CTT, ACT/CAG, ACT/CAT, ACT/CTG, ACT/CTT, AGA/CTG, AGC/CAG, AGC/CTC). Aos produtos amplificados foram adicionados tampão formamida a 98% (v/v) contendo 10 mM EDTA, 0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 0,025% (p/v) de xileno cianol (2:1). Após desnaturação à 90^oC por 4 minutos foram separados em gel de poli(acrilamida) desnaturante a 6% e

revelados pela coloração com prata segundo protocolo descrito por CRESTE et al. (2001).

3.3.4 Análise da segregação de marcadores

A partir dos resultados observados nos géis, procedeu-se análise da segregação dos marcadores, sendo que os indivíduos da progênie de mapeamento e os genitores foram genotipados com base na presença (1) e ausência (0) do marcador. A cada marcador foi aplicado o teste estatístico qui-quadrado (χ^2) para avaliar a distorção de segregação em relação às proporções dos marcadores em dose única (MDU) 1:1 (presente em apenas um dos genitores) e 3:1 (presente em ambos os genitores) ao nível de significância $p < 0,05$, seguida da correção de Bonferroni. Também foi testada a segregação para as doses duplas (11:3, presente duas vezes em um dos genitores) e triplas (13:1, presente três vezes em um dos genitores).

3.3.5 Construção do mapa de ligação

O mapa de ligação foi construído utilizando o programa JoinMap (VAN OOIJEN & VOORRIPS, 2001). Adotou-se um LOD mínimo de 3 ,para a ligação entre marcadores e ordenação das marcas e fração máxima de recombinação (r) de 0,40. As distâncias entre marcadores, dadas em centimorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi.

3.3.6 Análise de marcas simples

A análise de marcas simples e simultâneas foi calculada pelo SAS (1990) pela análise de marcas simples entre os marcadores em dose única (MDUs) e o valor fenotípico atribuído a cada clone individualmente, através de associações múltiplas e simples, seguindo a descrição feita por GILMOUR (2007) com algumas adaptações.

Foi realizada uma primeira análise de regressão linear múltipla envolvendo todos os MDUs. Foi adotado como padrão de seleção a saída da primeira marca com contribuição para a variação da característica, desta forma, eliminou as marcas que eram muito dependentes ou ligadas, obtendo o poder explicativo (R^2) múltiplo de cada característica.

A partir das marcas pré-selecionadas, usando modelos de regressão linear simples, foram determinados os efeitos de marca simples de cada característica para cada marca, ou seja, o aumento ou a diminuição fenotípica esperada predita, pela presença da marca e seu respectivo (R^2) simples, sem isolar influências simultâneas de outras marcas.

4. RESULTADOS

4.1 Análises dos dados fenotípicos

Os resultados gerais das análises de variâncias realizados entre os genitores e clones em cana planta e cana soca estão resumidos na tabela 3. Foi detectada uma forte influência de bloco ($p < 0,01$) em todas as características, exceto para número de perfilhos ($p < 0,05$) e fibra (não significativo), ambos em cana planta. Esses resultados indicam que alguns blocos podem ter melhores condições que outros.

O efeito encontrado entre clones foi altamente significativo ($p < 0,01$) para todas as características analisadas, tanto para cana planta como para cana soca, exceto para número de perfilhos dos clones ($p < 0,05$), expressando a existência de grande variabilidade entre a progênie para essas características.

Houve uma pequena diferença significativa entre os genitores ($p < 0,05$) para diâmetro, peso e fibra (cana planta) e número de perfilhos e TCH (cana soca), para as restantes, foram considerados estatisticamente iguais, isso porque os genitores usados foram altamente selecionados para produção de açúcar.

No geral, os coeficientes de variação obtidos mostram uma boa precisão experimental e controle da variação ambiental em cana planta e cana soca. Para características que não sofrem a influência do estande do campo, Fibra, Brix e Pol%Cana, o ideal é que os valores se apresentem ao redor de 5%, com adição de 2% (PERECIN et al., 2004). Os resultados encontrados no presente trabalho atendem a recomendação descrita, com alta precisão experimental, mostrando os valores de 5,27 para Fibra em cana soca, 3,62 e 4,18 para Brix e 5,41 e 5,32 para Pol%Cana, em cana planta e cana soca, respectivamente. Somente Fibra em cana planta (7,14) apresenta o valor um pouco acima do considerado ideal.

Tabela 3. Quadrados médios da análise de variância para diâmetro, peso, altura, número de perfilhos (NC), TCH, Fibra, Brix e Pol%Cana dos 220 clones em cana planta (P) e cana soca (S), e significância pelo Teste F.

	Diâmetro		Peso		Altura		NC		TCH		Fibra		Brix		Pol%Cana	
	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S
Bloco	0,39**	0,76**	38,26**	37,88**	23042,03**	10802,91**	51,31*	56,39*	7622,06*	4062,53**	1,13 ^{NS}	13,08**	41,19**	23,37**	18,38**	7,67*
Clones	0,20**	0,24**	19,44**	11,52**	2049,63**	1360,41**	15,12*	41,18**	1755,03**	1681,55**	1,81**	1,74**	2,49**	1,91**	1,90**	1,74**
Genitores	0,41*	0	43,71*	0,04 ^{NS}	1104,50 ^{NS}	361,54 ^{NS}	12,50 ^{NS}	134,84*	393,79 ^{NS}	6559,35*	4,51*	0,90 ^{NS}	0,74 ^{NS}	0,14 ^{NS}	0,01 ^{NS}	2,10 ^{NS}
CV	8,07	8,89	19,21	19,89	12,63	10,56	28,69	25,78	37,25	33,64	7,14	5,27	3,62	4,18	5,41	5,32
QMres	0,05	0,05	4,54	2,80	668,25	376,93	12,06	9,69	1116,01	531,39	0,84	0,46	0,57	0,78	0,71	0,73
M Genitores	2,86	2,62	13,47	10,52	218,43	191,92	11,68	12,41	104,57	87,27	12,82	12,29	20,91	21,68	15,76	16,93
M Clones	2,72	2,46	10,97	8,28	203,55	182,92	12,12	12,21	88,82	68,28	12,84	12,88	20,82	21,07	15,62	16,03

*Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$), **significativo ao nível de 1% ($p < 0,01$), ^{NS} não significativo.

M genitores: médias dos genitores; M clones: médias dos clones.

Para as outras características, isto é, as que são dependentes do estande do campo, valores de até 12% do coeficiente de variação indicam uma alta precisão experimental (PERECIN et al., 2004), sendo que apenas diâmetro em cana planta e cana soca (8,07 e 8,89) e altura em cana soca (10,56) se enquadram nos valores recomendados. Outra classificação feita por PIMENTEL GOMES (1985) enquadra a faixa de variação da ordem de 10 a 20%, como apresentando ainda uma boa precisão experimental, classificando peso (19,21 e 19,89, cana planta e cana soca) e altura (12,63 cana planta) como boas referências de condução experimental. As características número de perfilhos (28,69 e 25,78) e TCH (37,25 e 33,64), cana planta e cana soca, respectivamente, apresentam valores de baixa precisão experimental, concluindo que grande parte da sua variação é atribuída ao ambiente.

A média geral das características estudadas entre genitores e clones não apresentaram grande diferenças. Ao compará-las pode constatar-se que houve uma pequena depressão nos valores dos genitores para os clones. Isto se atribui à depressão endogâmica que ocorre no cruzamento entre plantas alógamas, observadas pela diminuição das médias dos valores fenotípicos. Além disso, os genitores que foram utilizados no cruzamento para obtenção dos clones, apresentam alto padrão de qualidade e, na meiose, quando ocorre a recombinação alélica, alguns genes favoráveis podem não serem transmitidos às progênes, havendo um pequeno decréscimo nas médias de suas características fenotípicas.

A freqüência de distribuição dos valores fenotípicos dos clones e os valores fenotípicos médios dos genitores em cana planta e em cana soca podem ser observadas na figura 1. Com exceção do diâmetro do colmo, os valores fenotípicos dos genitores para todas as características avaliadas, tanto em cana planta como em cana soca, mostraram-se diferentes, contribuindo para a variação fenotípica observada entre os clones. A variação dos valores fenotípicos dos clones (amplitude) foi maior do que a diferença encontrada entre os genitores para todas as características e para os dois ciclos avaliados, evidenciando a ocorrência de segregação transgressiva da progênie.

As distribuições fenotípicas aliadas às médias obtidas entre os clones indicam um maior desempenho das progênes derivadas de cana planta para diâmetro, peso e altura do colmo e TCH, podendo ser notado pela distribuição à direita dos gráficos

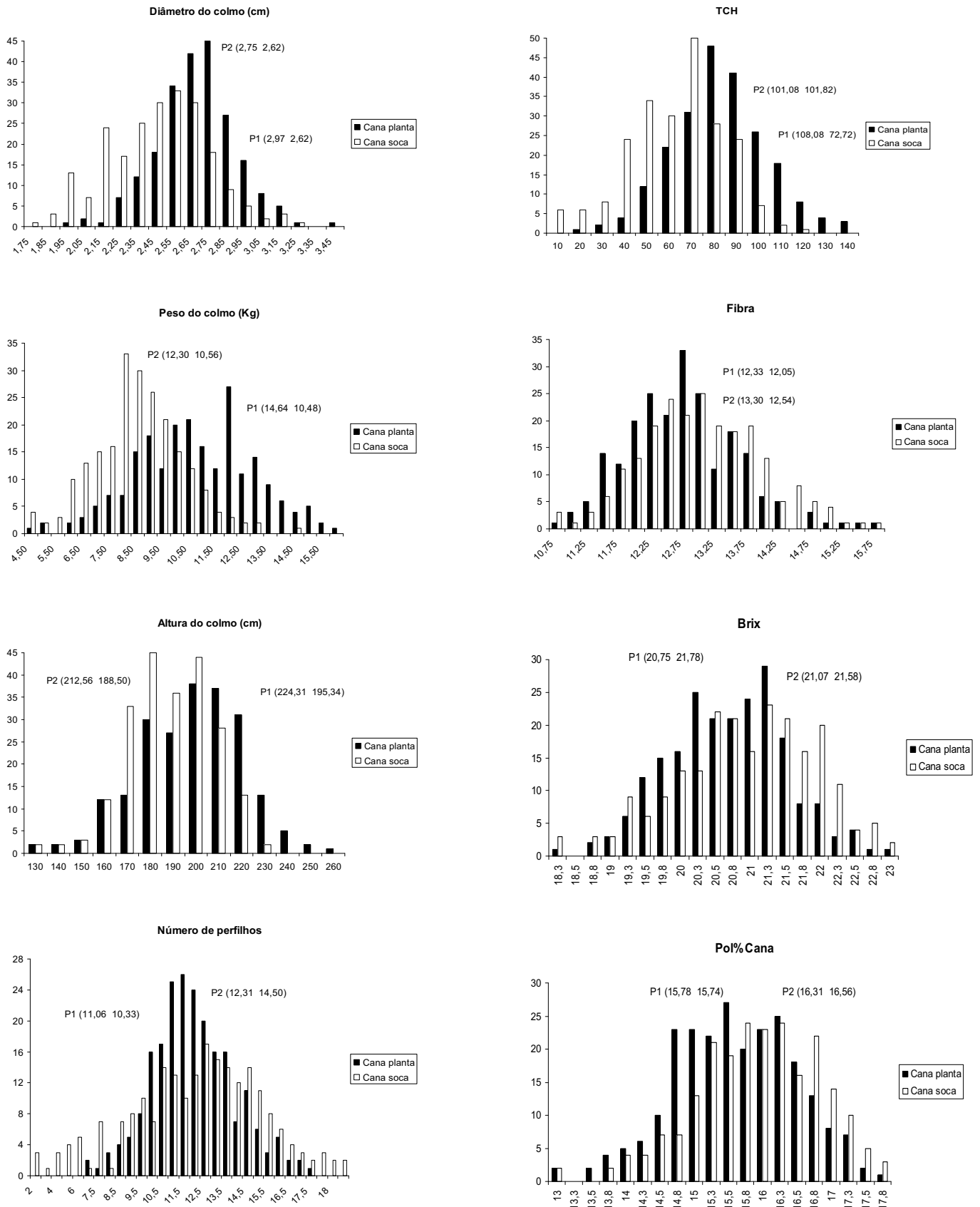


Figura 1. Frequência de distribuição dos valores fenotípicos para diâmetro, peso, altura, número de perfilhos, TCH, Fibra, Brix e Pol%Cana dos 220 clones de cana-de-açúcar em cana planta e cana soca. P1: IACSP95-3018; P2: IACSP93-3046.

e dos maiores valores das médias dos clones. Essas condições que afetaram positivamente o vigor da planta foram mais desfavoráveis para o seu amadurecimento, constatado pelo menor desempenho entre os clones para Brix e Pol%Cana em relação à cana soca, e confirmado pelo posicionamento dos gráficos à esquerda, bem como pelos menores valores médios dos clones. Resultados semelhantes foram relatados por HOARAU et al. (2002) que também encontraram oposição entre vigor e amadurecimento da planta em diferentes ciclos da cultura de cana-de-açúcar. Em ambas as situações há indicativas que as variações dessas características se devem ao efeito da interação do genótipo com o ambiente.

4.1.1 Herdabilidade

A herdabilidade no sentido amplo encontrada entre os 220 clones de cana-de-açúcar para todas as características avaliadas variou de 0,24 (número de perfilhos) a 0,78 (peso do colmo) em cana planta e de 0,59 (Pol%Cana) a 0,80 (diâmetro do colmo) em cana soca, indicando que estas são as partes da variação fenotípica atribuídas ao genótipo.

De acordo com a classificação descrita por RESENDE (2002) a herdabilidade pode ser considerada como de baixa magnitude quando $h^2 < 0,15$, média magnitude entre $0,15 < h^2 < 0,50$ e alta magnitude com $h^2 > 0,50$. Conforme a Tabela 4, apenas as características número de perfilhos (0,24) e TCH (0,39), ambas em cana planta, apresentaram baixa herdabilidade, refletindo uma grande interferência do ambiente na variação de suas características, confirmado pelo alto valor do coeficiente de variação.

Observa-se também que as demais herdabilidades foram consideradas de moderadas a altas, possivelmente indicando um bom controle ambiental. Esses moderados valores evidenciam que as características avaliadas apresentam uma expressiva herança genética, mas que ainda são sensíveis a variação do ambiente. Valores de herdabilidade moderados a altos também foram reportados para diâmetro e altura do colmo e número de perfilhos (HOARAU et al., 2002, AITKEN et

al., 2008), peso do colmo (AITKEN et al., 2008), TCH e fibra (PINTO et al., 2009) e Brix e Pol%Cana (BADALOO & RAMDOYAL, 2003, AITKEN et al., 2006), todos apresentando em comum as progênies derivadas de um cruzamento bi-parental.

Tabela 4. Estimativas dos componentes de variância ($\hat{\sigma}_g^2$) e ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$) e herdabilidade (h^2) no sentido amplo dos parâmetros diâmetro, peso, altura do colmo, número de perfilhos, TCH, calculados para quatro repetições e Brix, Fibra e Pol%Cana, calculado para duas repetições, dos 220 clones de cana-de-açúcar.

	Cana planta			Cana soca		
	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	h^2	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	h^2
Diâmetro do colmo	0,04	0,05	0,77	0,05	0,05	0,80
Peso do colmo	3,86	4,32	0,78	2,25	2,76	0,77
Altura do colmo	355,40	655,12	0,68	247,66	387,01	0,72
Número de perfilhos	0,78	11,97	0,24	7,69	9,84	0,76
TCH	173,89	1078,60	0,39	292,46	509,14	0,70
Fibra	0,39	0,77	0,50	0,66	0,45	0,75
Brix	0,42	0,56	0,62	0,58	0,76	0,60
Pol%Cana	0,34	0,68	0,50	0,52	0,72	0,59

$\hat{\sigma}_g^2$ =variância genética, $\hat{\sigma}_e^2$ =variância do ambiente, h^2 =herdabilidade no sentido amplo.

4.1.2 Correlação entre as características

As estimativas de correlação fenotípicas das características em cana planta (r_p), cana soca (r_s) e entre cana planta e cana soca (r_{ps}) estão expostas na tabela 5. Foram encontrados valores baixos e positivos, tanto em cana planta quanto em cana soca, da correlação fenotípica para diâmetro do colmo com altura do colmo ($r_p=0,11$ e $r_s=0,06$), TCH ($r_p=0,36$ e $r_s=0,19$) e Pol%Cana ($r_p=0,19$ e $r_s=0,18$), entre o peso do colmo com Brix ($r_p=0,13$ e $r_s=0,21$) e com Pol%Cana ($r_p=0,23$ e $r_s=0,34$), da altura do colmo com número de perfilhos ($r_p=0,10$ e $r_s=0,31$), TCH ($r_p=0,40$ e $r_s=0,53$), fibra ($r_p=0,03$ e $r_s=0,07$), Brix ($r_p=0,08$ e $r_s=0,13$) e Pol%Cana ($r_p=0,06$ e $r_s=0,18$), do número de perfilhos com fibra ($r_p=0,02$ e $r_s=0,27$) e com Brix ($r_p=0,01$ e $r_s=0,28$) e do TCH com Brix ($r_p=0,08$ e $r_s=0,31$) e com Pol ($r_p=0,11$ e $r_s=0,34$).

Moderadas correlações fenotípicas entre diâmetro e peso do colmo ($r_p=0,60$ e $r_s=0,60$), entre o peso com a altura do colmo ($r_p=0,53$ e $r_s=0,53$) e com o TCH ($r_p=0,66$ e $r_s=0,65$), bem como altas correlações fenotípicas entre número de perfilhos e TCH ($r_p=0,74$ e $r_s=0,80$), brix e Pol%Cana ($r_p=0,87$ e $r_s=0,91$) foram encontrados em cana planta e cana soca. Enquanto valores baixos e negativos de correlações fenotípicas entre fibra com diâmetro do colmo ($r_p=-0,28$ e $r_s=-0,35$), com peso do colmo ($r_p=-0,22$ e $r_s=-0,13$) e com pol ($r_p=-0,34$ e $r_s=-0,03$) foram obtidos também em ambos os ciclos.

Tabela 5. Estimativas de correlações fenotípicas, sendo que as que envolvem características de produção (diâmetro, peso, altura do colmo, número de perfilhos e TCH) foram calculadas com quatro repetições, e as que envolvem parâmetros de qualidade (Fibra, Brix e Pol%Cana) foram calculadas considerando apenas duas repetições. Acima da diagonal estão as correlações para cana planta, abaixo as para cana soca e na diagonal as entre anos.

CP/ CS	DC	PC	AC	NP	TCH	Fibra	Brix	Pol%Cana
DC	0,007 ^{NS}	0,60**	0,11*	-0,03 ^{NS}	0,36**	-0,28**	0,06 ^{NS}	0,19**
PC	0,60**	0,10*	0,53**	0,03 ^{NS}	0,66**	-0,22**	0,13*	0,23**
AC	0,06 ^{NS}	0,53**	-0,01 ^{NS}	0,10*	0,40**	0,03 ^{NS}	0,08 ^{NS}	0,06 ^{NS}
NP	-0,22**	0,14*	0,31**	0,04 ^{NS}	0,74**	0,02 ^{NS}	0,01 ^{NS}	-0,02 ^{NS}
TCH	0,19**	0,65**	0,53**	0,80**	0,16*	-0,13*	0,08 ^{NS}	0,11*
Fibra	-0,35**	-0,13 ^{NS}	0,07 ^{NS}	0,27**	0,12*	0,04 ^{NS}	-0,3 ^{NS}	-0,34**
Brix	0,02 ^{NS}	0,21**	0,13 ^{NS}	0,28**	0,31**	0,26**	0,10*	0,87**
Pol%Cana	0,18*	0,34**	0,18*	0,23**	0,34**	-0,03 ^{NS}	0,91**	0,09*

CP=cana planta, CS=cana soca, DC=diâmetro do colmo, PC=peso do colmo, AC=altura do colmo, NP= número de perfilhos, TCH=toneladas de cana por hectare.

A correlação obtida das características entre os anos mostrou-se de baixa significância, sendo que apenas peso do colmo, TCH e Brix foram significativos ($p<0,05$).

Através das dispersões das médias individuais de cada clone (Figura 2) é possível identificar indivíduos que combinem valores desejáveis entre duas características, visualizando o efeito das correlações (Anexo 1).

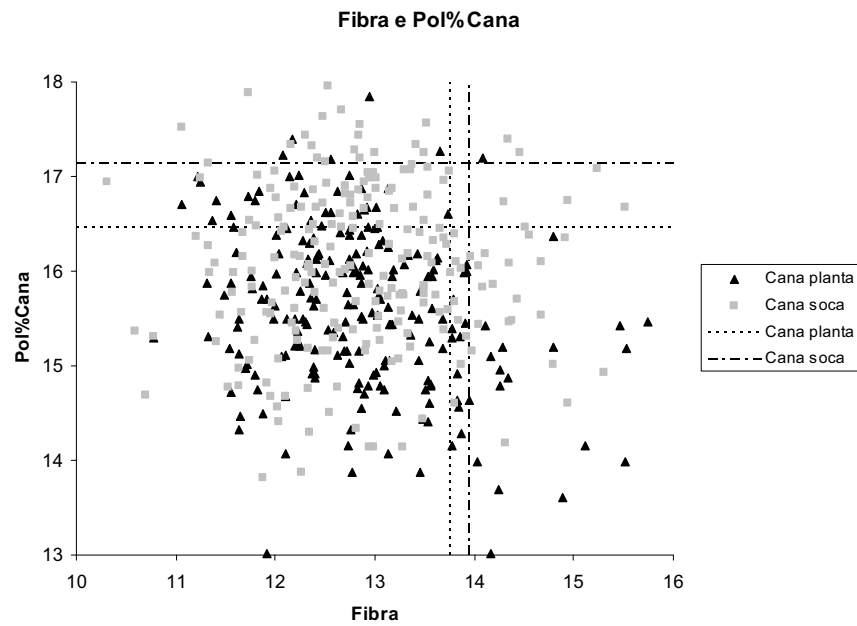


Figura 2. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre Fibra e Pol%Cana em cana planta e cana soca.

4.2 Análise de segregação dos marcadores moleculares

Analisando os perfis de bandas obtidos no gel dos genitores e dos clones, os mesmos foram genotipados com base na presença (1) e ausência (0) das marcas (Figura 3).

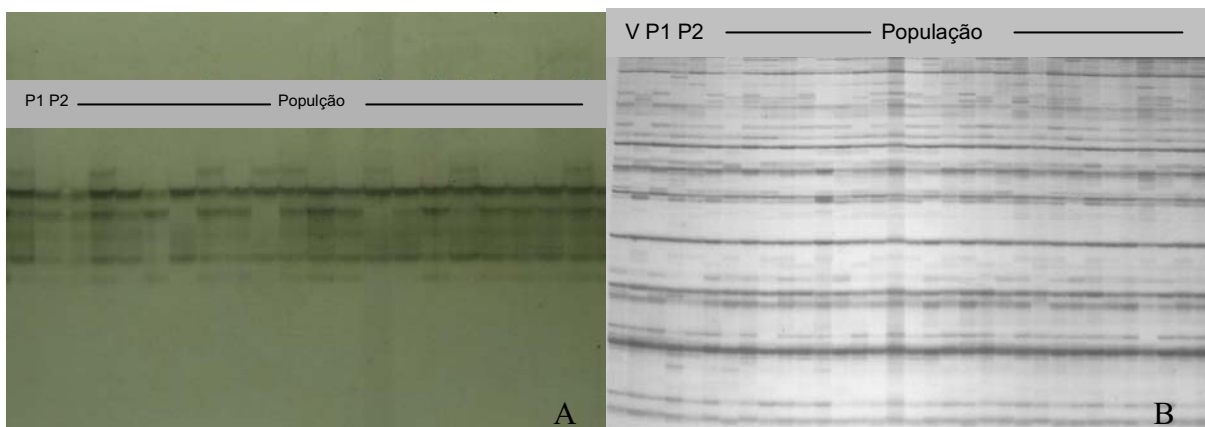


Figura 3. Polimorfismo obtido com: A) microssatélite EST-SCB 27 e B) combinação ACT/CTG. Esquerda para direita: V) variante somaclonal do genitor IACSP93-3046, P1) genitor IACSP95-3018, P2) genitor IACSP93-3046 e amostra de indivíduos da população de mapeamento.

O número de marcas polimórficas entre as 15 combinações de AFLP variou de 9 a 23, com média de 17,58. Trabalhos semelhantes utilizando marcadores AFLP foram realizados por HOARAU et al. (2001) e AITKEN et al. (2005), ambos com populações derivadas de cruzamentos bi-parentais em cana-de-açúcar. Comparando-os com o presente estudo, observou-se uma coincidência de nove combinações de *primers*, sendo elas: AAG/CAT, ACC/CTC, ACG/CAG, ACG/CTT, ACT/CAT, ACT/CTG, ACT/CTT, AGC/CAG e AGC/CTC. Para AITKEN et al. (2005) o número de fragmentos polimórficos ficou entre 16 e 32, com média de 19,23. HOARAU et al (2001) obtiveram bandas polimórficas variando entre 18 e 44, com média 30, 12, ambos para as combinações citadas acima.

Para os SSRs genômicos o número de bandas polimórficas variou de 1 a 9, com média 4,89. Comparando os resultados obtidos por AITKEN et al. (2005) em relação a 18 *primers* de microssatélites genômicos, também utilizados no mapeamento da população IACSP95-3018 vs IACSP93-3046 (Cir1, Cir12, Cir14, Cir18, Cir21, Cir 23, Cir 24, Cir 26, Cir 32, Cir 35, Cir 36, Cir 50, Cir 51, Cir 55, Cir 74, SMC21SA, 26BUQ e SMC1047HA) obteve um número de fragmentos polimórficos variando de 2 a 18 e média de 5. Para os EST-SSRs a variação do número total de bandas ficou entre 2 e 10, com média de 4,7. Comparando com o trabalho realizado por PINTO et al. (2004), que também utilizou uma população derivada de cruzamento bi-parental, houveram quatro primers que foram utilizados em comum (SCA07, SCB06, SCB07 e SCC01), com número total de alelos variando entre 2 a 15 e média de 6,05.

No total, 710 marcadores segregantes nas progênies foram obtidos a partir das 15 combinações de primers AFLP (EcoRI/MseI), 35 SSRs genômicos e 71 EST-SSRs. A este total de marcadores foi aplicado o teste qui-quadrado ($p < 0,05$) a fim de testar as segregações Mendelianas 1:1 (dose simples), 3:1 (dose simples em ambos os pais), 11:3 (dose dupla) e 13:1 (dose tripla).

Entre as marcas selecionadas pelo teste, 58% (410) apresentaram segregação em dose única, com frequências de 34,5% (245) e 23,5% (165), para a segregação 1:1 e 3:1, respectivamente, 14% (100) segregando em dose dupla e apenas 2% (14) em dose tripla. Do total, 26% (186) das marcas apresentaram

distorção das segregações Mendelianas baseadas nas respectivas taxas consideradas (Tabela 6).

Tabela 6. Segregações referentes as 15 combinações de AFLP, 35 SSRs genômicos e 71 EST-SSRs nos 220 clones de cana-de-açúcar derivados do cruzamento entre IACSP95-3018 e IACSP93-3046, baseadas no teste qui-quadrado a $p < 0,05$.

Segregação	DS		DD	DT	Total	Distorção	Total final
	1:1	3:1	11:3	13:1			
AFLP	91	58	50	5	204	44	248
SSR-g	67	43	26	3	139	44	183
SSR-f	87	64	24	6	181	98	279
Total	245	165	100	14	524	186	710

DS: dose simples, DD: dose dupla, DT: dose tripla.

Um total de 185 marcas foram observadas apenas no genitor IACSP95-3018. As 15 combinações de *primers* AFLP geraram 76 marcas no genitor IACSP95-3018. Cada combinação seletiva de AFLP gerou de 1 (AAC/CAC e AGC/CTC) a 10 (ACG/CTT) marcas polimórficas, com uma (AAC/CAC, AGC/CTC, ACT/CAG e AGC/CAG) a sete (ACG/CTT) marcas segregando em uma única cópia (1:1).

Os 35 SSRs genômicos detectaram 43 marcas, sendo que cada par de *primers* gerou de zero (Cir26, Cir31, Cir50 e Cir74, SMC1011HA, SMC415MS, SMC448MS, SMC687CS e SMC863CG) a quatro (Cir32) marcas polimórficas presentes no genitor IACSP95-3018 e com zero (Cir1, Cir4, Cir26, Cir 31, Cir 50, Cir 55 e Cir 74, SMC1011HA, SMC415MS, SMC448MS, SMC687CS, SMC863CG, SMC119CG, SMC2017FL e SMC31Cuq) a três (Cir 36) marcas segregando em dose única (1:1).

Para os 71 ESTSSRs foram obtidos 66 marcas polimórficas, com cada par de *primer* gerando de zero (SCA 07, SCA 17, SCA 44 e SCA 53, SCB 01, SCB 14, SCB 16, SCB 23, SCB 25, SCB 40, SCB 56, SCB 65, SCB 100, SCB 145, SCB 148, SCB180, SCB 186, SCB 171, SCB 190, SCB 191, SCB 192, SCB 210, SCB 226, SCB 228, SCB 232, SCB 236 e SCB 246, SCC 38 e SCC 47) a três (SCB 06, SCB 213, SCB 225, SCB 236 e SCB 270) marcas polimórficas, e com zero (SCA 07, SCA 17, SCA 26, SCA 44, SCA 53 e SCA 61, SCB 01, SCB 14, SCB 16, SCB 23, SCB 25, SCB 40, SCB 56, SCB 65, SCB 100, SCB 145, SCB 148, SCB 180, SCB 186, SCB 171, SCB 190, SCB 191, SCB 192, SCB 193, SCB 210, SCB 226, SCB 228,

SCB 232, SCB 236, SCB 243, SCB 246, SCB 252, SCB 256 e SCB 270, SCC35, SCC 36, SCC 38 e SCC 47) a duas (SCA 31 e SCA 48, SCB 07, SCB 41, SCB 60, SCB 222, SCB 227, SCB 236 e SCB 248) segregando em dose única no genitor IACSP95-3018.

Já para o genitor IACSP93-3046 foram obtidas um total de 198 marcas. Dessas, 81, 57 e 60 foram geradas pelas combinações de AFLP, SSRs genômicos e EST-SSRs, respectivamente. Cada combinação de primers AFLP gerou de duas (ACT/CTG) a 11 (AAG/CAG) marcas polimórficas, com uma (ACG/CAG) a cinco (AAG/CAT e AGC/CAG) marcas segregando em cópia única (1:1).

Os SSRs genômicos geraram de zero (Cir14, Cir 50, e Cir 74, SMC1011HA, SMC448MS, SMC232MS e SMC236) a cinco (SMC1047HA) marcas polimórficas com zero (Cir14, Cir 31, Cir 50, e Cir 74, SMC1011HA, SMC448MS, SMC232MS, SMC236, SMC477CG, SMC2039 e SMC687CS) a cinco (SMC1047HA) marcas em dose única (1:1).

Os EST-SSRs geraram de zero (SCA07, e SCA 31, SCB02, SCB 14, SCB 27, SCB 41, SCB 49, SCB 55, SCB56, SCB65, SCB82, SCB118, SCB 174, SCB186, SCB189, SCB190, SCB191, SCB192, SCB193, SCB194, SCB222, SCB 225, SCB 232, SCB 236, SCB 243, SCB 248, SCB 252, SCB 256, SCB 259, e SCB 272, SCC33 e SCC 35) a quatro (SCB 270) marcas polimórficas, sendo que de zero (SCA 07, SCA 31, e SCA 44, SCB 01, SCB 02, SCB 14, SCB 27, SCB 41, SCB 43, SCB 49, SCB 55, SCB56, SCB 65, SCB 82, SCB 118, SCB 145, SCB 148, SCB 174, SCB 186, SCB 189, SCB 190, SCB 191, SCB 192, SCB 193, SCB 194, SCB 207, SCB 219, SCB 222, SCB 225, SCB 232, SCB 236, SCB 243, SCB 248, SCB 252, SCB 256, SCB 259, e SCB 272, SCC 30, SCC 33 e SCC 35) a quatro (SCB 270) marcas apareceram segregando em dose única (1:1), apenas no genitor IACSP93-3046.

Para cada uma das 185 marcas presente apenas no genitor IACSP95-3018 e das 198 marcas presentes apenas no genitor IACSP93-3046, foram calculadas as frequências de segregação nas progênies e gerado um histograma (Figura 4). Para cada genitor houve a formação de um grupo de marcadores na frequência de segregação de 0,5, a qual corresponde a frequência esperada para marcadores em dose única segregando na proporção 1:1 (presença:ausência). Observa-se também marcadores nas frequências de segregação 0,786 e 0,93, que são as frequências

esperadas as segregações em dose dupla (11:3) e dose tripla (13:1), respectivamente.

Quando foi analisada a segregação das marcas presentes em ambos os genitores foi obtido 327 marcas, com a segregação nas progênes de 91, 83 e 153 para AFLP, SSRs genômicos e EST-SSRs, respectivamente. Dessas marcas apenas 58, 43 e 64 segregam em uma única cópia em ambos os genitores (3:1) para AFLP, SSRs genômicos e EST-SSRs, respectivamente. Com as frequências de segregação nas progênes foi construído o histograma (Figura 5) e observou-se em torno de 50 marcas na frequência de segregação 0,75, que é a esperada para marcadores que segregam na proporção 3:1.

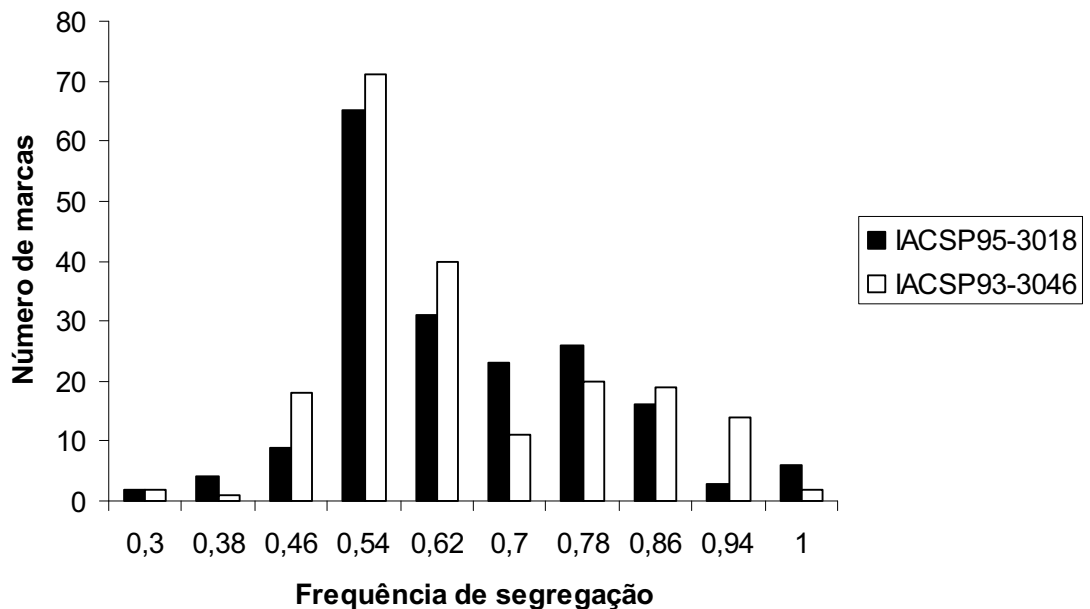


Figura 4. Distribuição da frequência de segregação das 185 e 198 marcas presentes no genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046, respectivamente, entre as 15 combinações seletivas de AFLP, os 35 SSRs genômicos e os 71 EST-SSRs avaliados nos 220 clones de cana-de-açúcar.

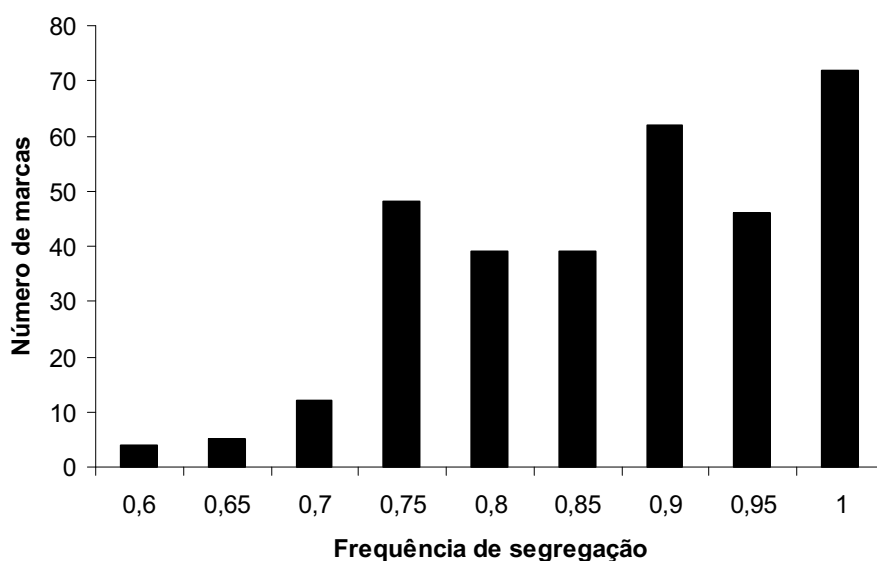


Figura 5. Distribuição da frequência de segregação das 327 marcas presentes em ambos os genitores IACSP95-3018 e IACSP93-3046, entre as 15 combinações de AFLP, os 35 SSRs genômicos e os 71 EST-SSRs nos 220 clones de cana-de-açúcar.

4.3 Mapa de ligação

Os 410 MDUs, do tipo D1 (presente no IACSP95-3018), D2 (presente no IACSP93-3046) e C (presente em ambos os genitores) foram utilizados na construção do mapa de ligação, dos quais 231 (56%) apresentaram-se ligados, distribuindo-se em 72 grupos de ligação (GL) sendo que as 179 (44%) marcas remanescentes permaneceram não ligadas (Figura 6). O número de marcas não ligadas foi menor que o apresentado por OLIVEIRA et al. (2007), que foi de 1005 marcas (60%), porém maior que o apresentado por HOARAU et al. (2001), AITKEN et al. (2005) e RABOIN et al. (2006) o qual ficou em torno de 52 (5%), 57 (5%) e 97 (6%), respectivamente.

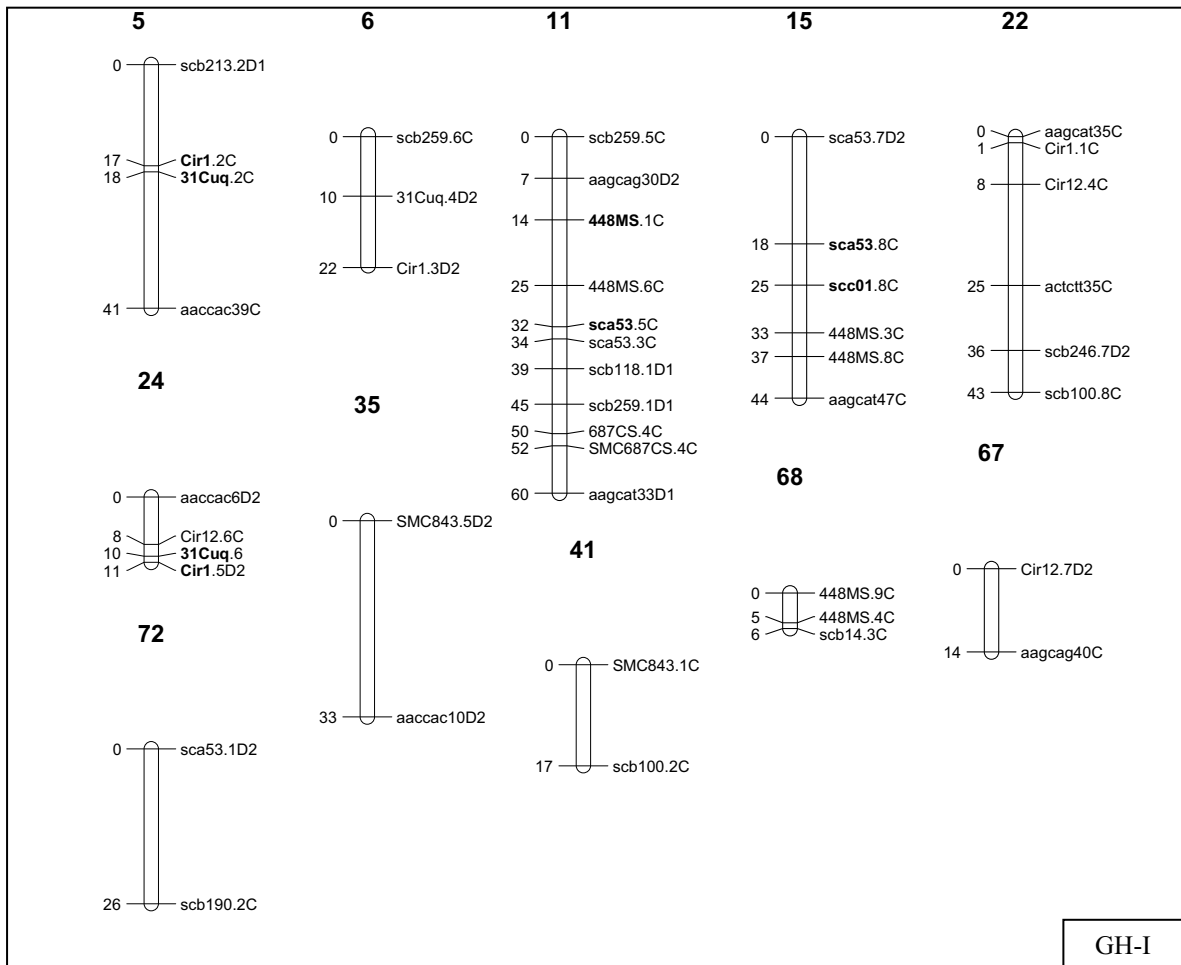


Figura 6. Mapa de ligação de cana-de-açúcar obtido para o cruzamento IACSP95-3018 e IACSP93-3046. Os números superiores referem-se ao grupo de ligação (GL) que pertencem as marcas. Os números à esquerda são as distâncias em centimorgans (cM) entre as marcas. Os nomes das marcas estão à direita, seguidos pela sigla D1 (presente no IACSP95-3018), D2 (presente no IACSP93-3046) ou C (presente em ambos os genitores). Os GL foram reagrupados com base na presença de alelos derivados de um mesmo microssatélite (loco definido pelo par de *primers* que flanqueia o microssatélite) formando assim os grupos de homologia (GH), I ao X.

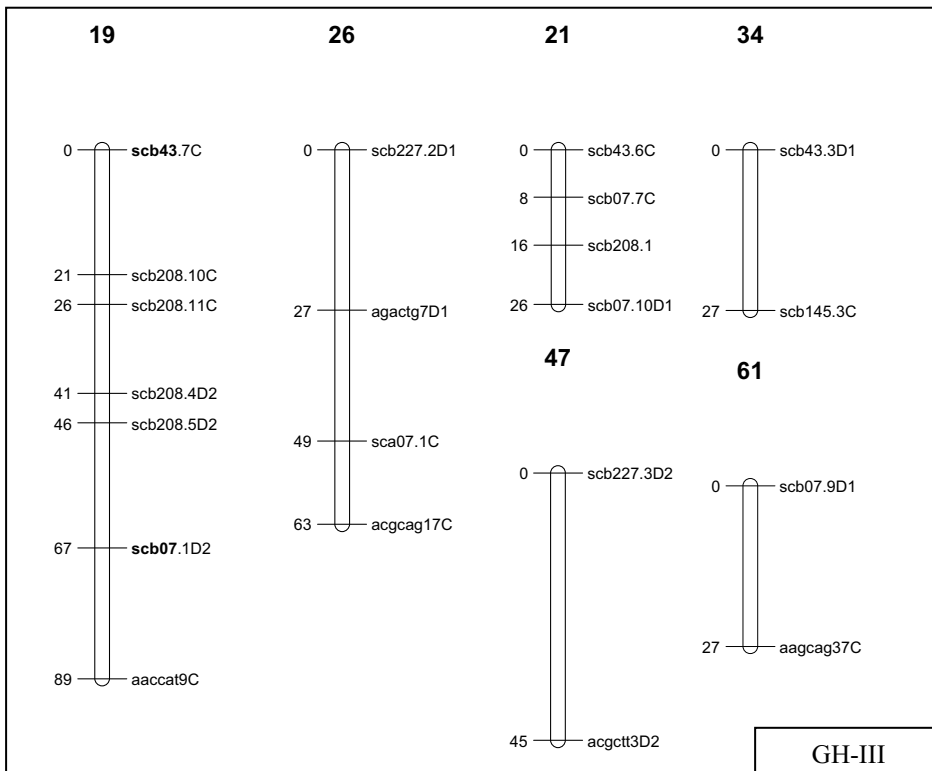
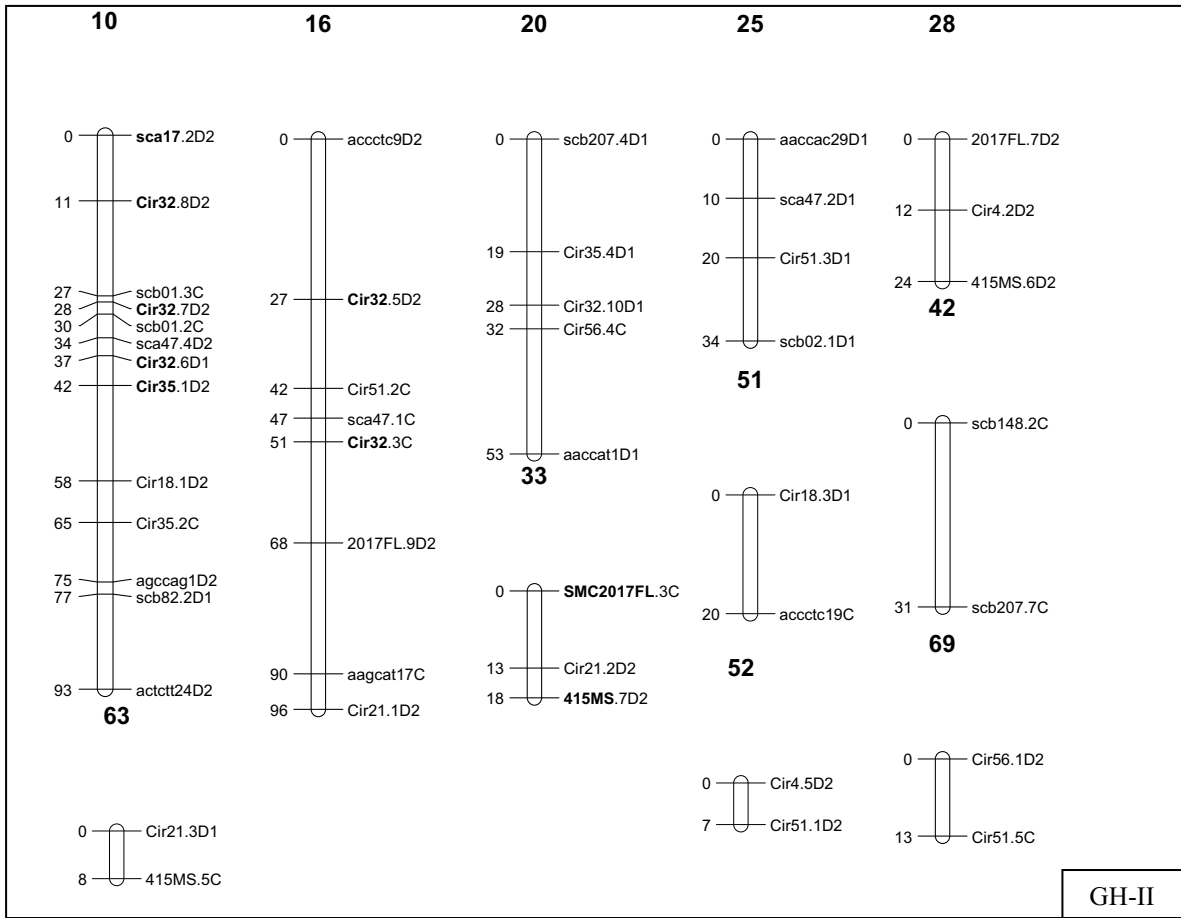


Figura 6. Continuação

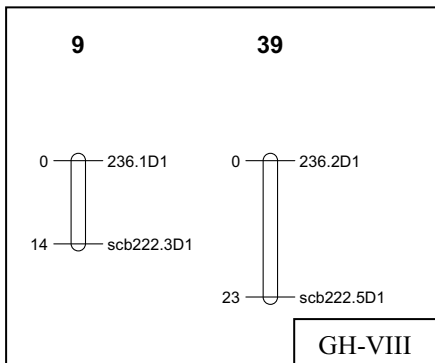
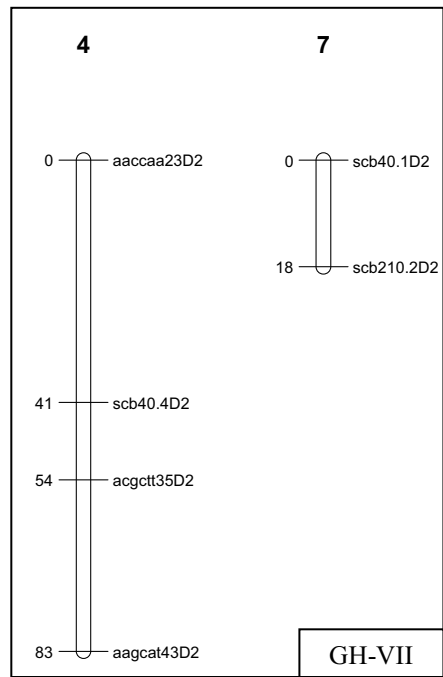
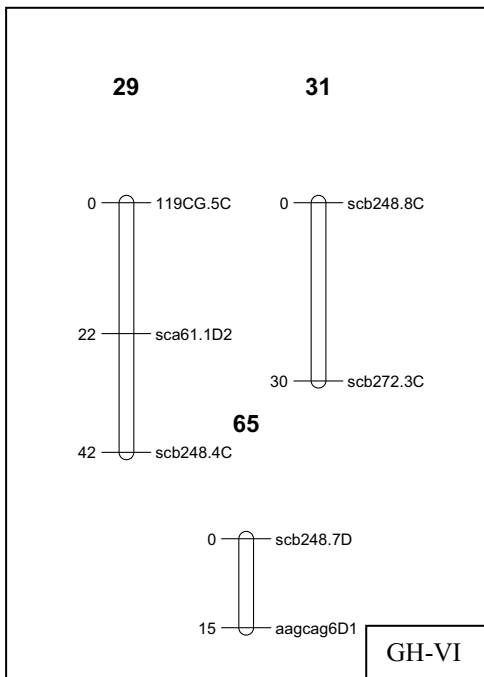
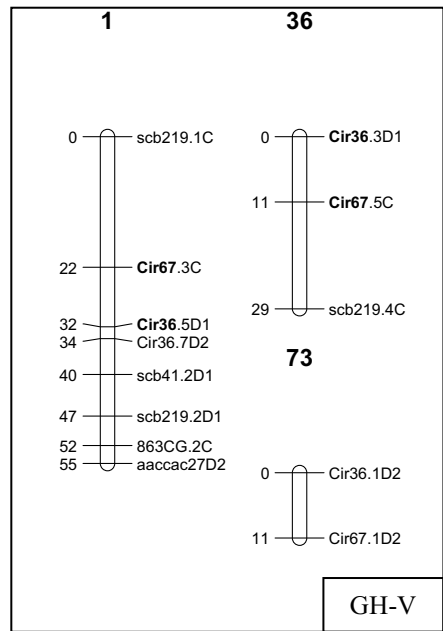
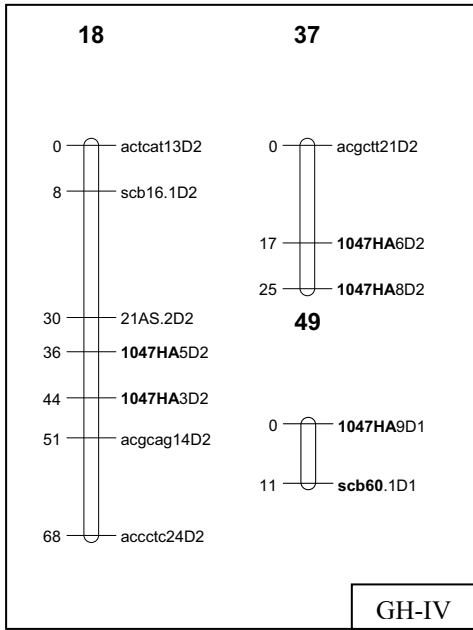


Figura 6. Continuação

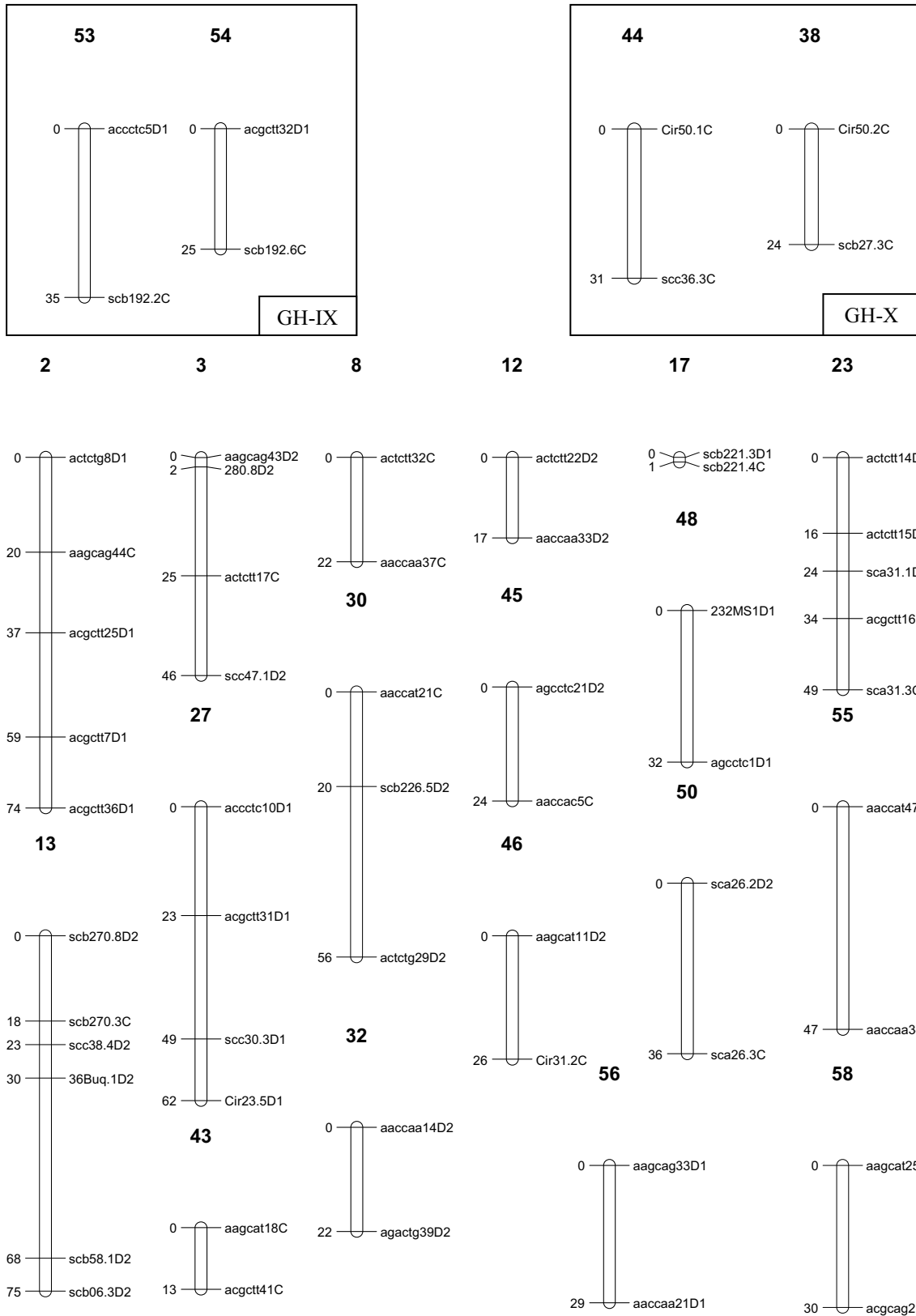


Figura 6. Continuação

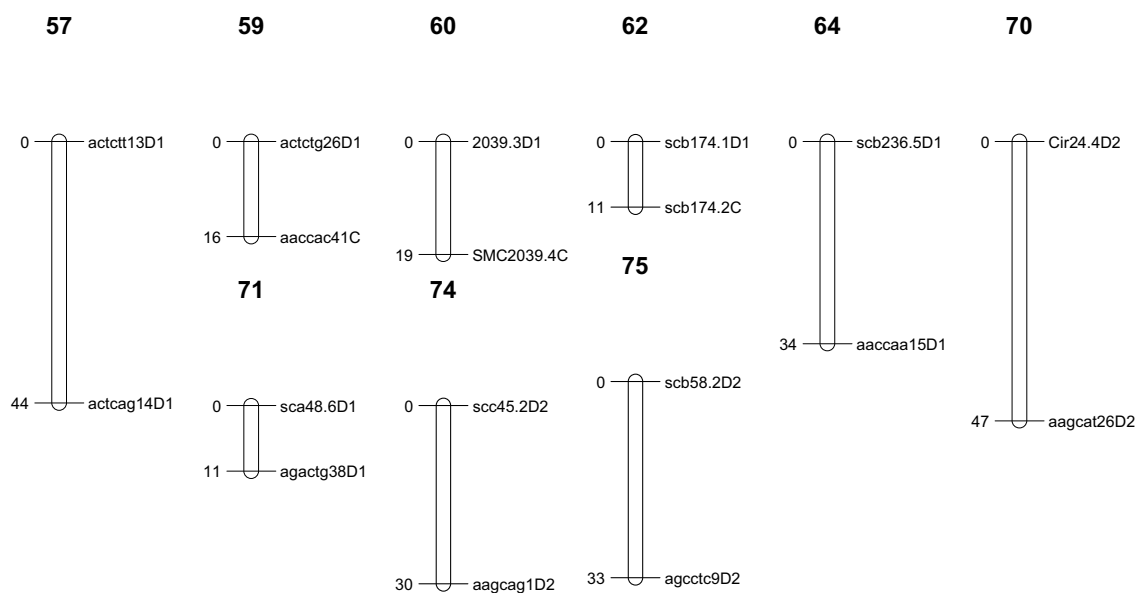


Figura 6. Continuação

Analisando a origem dos 231 MDUs verificou-se que 65 (28%) são do tipo D1, 80 (35%) do tipo D2 e 86 (37%) do tipo C (Tabela 7). Embora os marcadores do tipo C sejam menos informativos, por serem comuns em ambos os genitores, atuam como pontes entre os seus genomas, identificando regiões de homologia entre eles (MALIEPAARD et al., 1997; WU et al., 2000). A maioria dos marcadores mapeados foram do tipo C. Essa grande quantidade de marcadores do tipo C pode ser explicada pela existência de ancestrais comuns entre os genitores, comprovando a estreita base genética existente em cana-de-açúcar.

Tabela 7. Relação de marcadores do cruzamento IACSP95-3018 com IACSP93-3046 em dose única quanto ao seu tipo.

Tipo	AFLP	gSSRs	EST-SSRs	Total
D1	28	14	23	65
D2	26	31	23	80
C	19	31	36	86
Total	73	76	82	231

D1: proveniente ao genitor IACSP95-3018; D2: proveniente ao genitor IACSP93-3046; C: proveniente de ambos os genitores.

O mapa obtido apresentou cobertura de 2436 centiMorgans (cM), com distância média entre marcas de 10,55 cM, mas a distribuição ao longo dos cromossomos foi irregular. O comprimento do GL variou entre 1 cM (GL17) a 96 cM (GL16).

Os grupos de homologia (GH) foram identificados usando os marcadores SSRs genômicos e EST-SSRs como pontes de ligação, devido a sua natureza co-dominante. Dos 72 GL, 45 puderam ser reagrupados dentro de 10 GH distintos, da seguinte maneira:

GH-I (GL5, 6, 11, 15, 22, 24, 35, 41, 67, 68 e 72);

GH-II (GL10, 16, 20, 25, 28, 33, 42, 51, 52, 63 e 69);

GH-III (GL19, 21, 26, 34, 47 e 61);

GH-IV (GL18, 37 e 49);

GH-V (GL1, 36 e 73);

GH-VI (GL29, 31 e 65);

GH-VII (GL4 e 7);

GH-VIII (GL9 e 39);

GH-IX (GL53 e 54);

GH-X (GL38 e 44);

Vinte e um GL com duas marcas e seis GL com mais de duas marcas permaneceram independentes por apresentar falta de marcas comuns para serem agrupados em GH (Figura 6).

Alguns dos mapas mais saturados apresentados na literatura em cana-de-açúcar estão dispostos na tabela 8. Observa-se que o mapa aqui apresentado fica aquém dos que foram publicados por HOARAU et al. (2001), AITKEN et al. (2005) e OLIVEIRA et al. (2007) tanto em número de grupos de ligação formados como em cobertura do genoma da cana de açúcar. De fato, isso já era esperado, uma vez que o mapa aqui apresentado encontra-se em construção, sendo que novos marcadores do tipo AFLP e EST-SSRs ainda serão incorporados.

Tabela 8. Mapas de ligação presentes na literatura, com os respectivos GL, GH e cobertura total do genoma.

População de mapeamento	GL	GH	Cobertura do mapa (cM)	Referência
R570	120	10	5.849	HOARAU et al., 2001
IJ76-514 x Q165	136	8	9.058,3	AITKEN et al., 2005
SP80-180 x SP80-4966	192	40	6.261,1	OLIVEIRA et al., 2007
IACSP95-3018 x IACSP93-3046	72	10	2436	MANCINI, 2010

GL: grupo de ligação; GH: grupo de homologia, cM: centiMorgans.

Os grupos de ligação que aparecem em destaque (Figura 6) referem-se aos locos microssátélites em comum com o mapa publicado por OLIVEIRA et al. (2007).

O uso de marcadores do tipo SSR permite comparar mapas oriundos de cruzamentos diferentes e também validar a localização desses locos em comum. A comparação entre mapas é muito importante, principalmente, quando se trata do mapeamento de QTLs. A identificação, em diferentes cruzamentos, de um mesmo loco de microssátélites relacionado a uma determinada característica de interesse, é extremamente importante para, de fato, validar este loco como associado a característica em questão, mesmo que os alelos do loco sejam diferentes para cada cruzamento. Este tipo de comparação agrega valor ao marcador para ser utilizado na seleção assistida.

4.4 Identificação funcional dos ESTs

A grande vantagem da utilização de marcadores derivados de sequencias expressas, tal como os marcadores EST-SSRs utilizados no presente trabalho, é a possibilidade de mapear parte de genes expressos como a de estabelecer, nas associações marcador/QTL, a relação entre o papel do gene do qual o marcador foi derivado com a característica fenotípica associada.

A homologia dos EST-SSRs, assim como as respectivas sequencias dos *primers* aqui utilizados, encontram-se publicadas por PINTO et al., 2004 e OLIVEIRA et al., 2009).

No total, 49 EST-SSRs foram mapeados (Tabela 9), 41 (85%) mostraram homologia a uma grande variação de proteínas, incluindo algumas relacionadas a processos biológicos e metabólicos e outras relacionadas às funções moleculares da cana-de-açúcar, enquanto oito (15%) foram associadas a proteínas hipotéticas ou desconhecidas. A maioria das proteínas mostra homologia a genes oriundos de *Arabidopsis thaliana*, considerada uma planta modelo em estudos genéticos, como de outras espécies mais próximas da cana-de-açúcar (milho, sorgo e arroz).

Tabela 9. Relação dos EST-SSRs mapeados, localização nos grupos de homologia (GH) e de ligação (GL) e respectiva homologia.

ESTs	GH (GL)	Homologia	Referência
SCA 07	III (26)	Putative apical-basal pattern formation protein	
SCB 01	II (10)	Glycine-rich RNA-binding protein	
SCB 02	II (25)	Putative centromere/ microtubule-binding protein	PINTO et al. (2004)
SCB 06	- (13)	Putative protein phosphatase-2C (PP2C)	
SCB 07	III (19, 21 E 61)	Pyrophosphatase-dependent phosphofructo-1-kinase-like	
SCA 17	II (10)	Hypothetical protein	
SCA 26	- (50)	TPA_inf:WRKY transcription factor 74	
SCA 31	- (23)	DFL1	
SCA 47	II (10, 16 e 25)	Putative branched-chain amino acid aminotransferase protein	
SCA 48	- (71)	Chloroplast phytoene synthase 1	
SCA 53	I (11, 15 e 72)	Indeterminate spikelet 1	
SCA 61	VI (29)	No hit found	
SCB 14	I (68)	SbCBF5	
SCB 16	IV (18)	BRI1-KD interacting protein 128	
SCB 27	X (38)	Putative protein	OLIVEIRA et al. (2009)
SCB 40	VII (4 e 7)	Hypothetical protein	
SCB 41	V (1)	Putative diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	
SCB 43	III (19, 21 e 34)	OSJNBa0032F06.16	
SCB 58	- (13)	Putative myb protein	
SCB 60	IV (49)	OJ000114_01.16	
SCB 82	II (10)	Putative peroxidase	
SCB 100	I (22 e 41)	Abscisic acid and stress inducible protein	
SCB 118	I (11)	Homeobox transcription factor GNARLY1	
SCB 145	III (34)	Alpha-galactosidase-like protein	
SCB 148	II (42)	Beta-amylase	
SCB 174	- (62)	DNAK-type molecular chaperone hsp70 - rice	
SCB 190	I (72)	Somatic embryogenesis related	
SCB 192	IX (53 e 54)	DNA-3-methyladenine glycosidase I-like protein	
SCB 207	II (20 e 42)	Putative receptor-like protein kinase, ERECTA [Arabidopsis thaliana]	
SCB 208	III (19, 21 e 34)	DNA-binding protein MNB1a - maize	
SCB 210	VII (7)	putative C3HC4-type RING zinc finger protein [Arabidopsis thaliana]	
SCB 213	I (5)	Unknown protein	
SCB 219	V (1 e 36)	Hypothetical protein	
SCB 221	- (17)	Putative auxin-induced protein [Arabidopsis thaliana]	
SCB 222	VIII (9 e 39)	Similar to hypothetical protein SPAC2F7.14c	
SCB 226	- (30)	Putative RING-H2 zinc finger protein [Arabidopsis thaliana]	
SCB 227	III (26 e 47)	Putative WD-40 repeat protein [Arabidopsis thaliana]	
SCB 236	- (64)	Correspond to a region of the predicted gene	
SCB246	I (22)	Hypothetical protein	
SCB 248	VI (29, 31 e 65)	Hypothetical protein	
SCB 259	I (6 e 11)	No hits found	
SCB 270	- (13)	r40g2 protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	
SCB 272	VI (31)	Hypothetical protein	
SCC 01	I (15)	Putative cysteine protease	
SCC 30	- (27)	Chain A, C-terminal domain of mouse brain tubby protein-like	
SCC 36	X (44)	Putative RING-H2 zinc finger protein	OLIVEIRA et al. (2009)
SCC 38	- (13)	Type IIB calcium ATPase	
SCC 45	- (74)	B1066G12.15	
SCC 47	- (3)	SbPCL1	

4.5 Análise de marcas simples e localização dos QTAs (*Quantitative Trait Allele*) no mapa de ligação

Em cana-de-açúcar, devido a poliploidia, para cada loco existe uma série de alelos segregando. Neste caso, a denominação de alelos de características quantitativas (QTAs) torna-se mais adequada (Hoarau et al. 2002) em relação a de QTLs comumente utilizada para diplóides.

As 410 marcas que segregam em dose única (1:1 e 3:1) foram usadas na análise de marcas simples a fim de detectar QTAs (*Quantitative Trait Allele*) que influenciam na expressão do diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, Fibra, Brix e Pol%Cana. Dessas marcas foram obtidos um total de 155 (37,89%) QTAs com associações significativas a $p < 0,05$ para as características estudadas entre cana planta e cana soca (Tabelas 10, 11 e 12) sendo 57 (36,80%), 32 (20,60%) e 66 (42,60%) QTAs derivados de marcadores do tipo AFLP, SSRs genômicos e EST-SSRs, respectivamente.

Os 155 QTAs foram derivados de 66 marcadores moleculares diferentes, sendo que 84 (54,20%) destes marcadores encontram-se mapeados ao longo de 34 grupos de ligação e 10 grupos de homologia distintos.

No geral, a magnitude da proporção da variação fenotípica (R^2) explicada pelos marcadores foi baixa, variando entre 1,04% a 7,58%. De fato, devido a poliploidia, em cana-de-açúcar é esperado que os efeitos dos marcadores associados aos prováveis QTLs detectados sejam pequenos. HOARAU et al. (2002) relatou valores de R^2 de 3% a 7%, AITKEN et al. (2006) encontraram variação entre 2% a 8% e AITKEN et al. (2008) entre 2% a 10% enquanto MING et al. (2002) revelaram uma variação fenotípica com maior influência na expressão das características, variando de 3,8% a 16,2%.

Tabela 10. Efeito de marcas simples e de associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para as características diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Canha em cana planta e cana soca para marcadores do tipo AFLP.

Característica	GL	GH	Diâmetro do colmo			Peso do colmo			Altura do colmo			Número de perfilhos								
			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	$R^2(\%)$						
ACT/CTT 24D2	10	II	-0,07*	2,37	-0,08*	2,82														
AAC/CAT 40D1	55	-	-0,09*	4,38	-0,80*	2,94	-0,71*	2,64												
AAC/CAA 5C	-	-	-0,08*	2,93											1,35*	3,34				
ACG/CAG 17C	17	IX	-0,07*	2,26	-0,08*	2,29			-0,85*	4,68										
ACG/CTT 21D2	37	IV	0,06*	2,27																
ACT/CTG 17D1	-	-	0,06*	2,07																
AAG/CAG 33D1	56	-			0,70*	2,06														
ACT/CAT 13D2	18	IV			0,07*	1,04														
AAC/CAT 3C	-	-			0,69*	2,25														
AAG/CTG 19C	-	-			-0,69*	1,86														
AAC/CAA 37C	8	-			0,79*	2,31			0,69*	2,66										
AAC/CAA 15D1	-	-			-0,89*	3,59			-0,54*	2,15										
ACT/CAG 6C	-	-																		
ACC/CTC 9D2	16	II																		
AAC/CAC 10D2	35	I																		
ACC/CTC 19C	51	II																		
ACT/CTT 35C	-	-																		
ACT/CTG 11C	-	-																		
ACC/CTC 5D1	-	-																		
AAC/CAC 5C	45	-																		
ACG/CTC 20D2	-	-																		
$R^2\%$ Total				16,28		11,15		12,65		9,49		9,98		14,22		2,00	2,00	1,06*	2,33	8,27

*Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$); GL: grupo de ligação, GH: grupo de homologia; R^2 : porcentagem da variação fenotípica explicada pelo marcador.

Tabela 10. Continuação

Característica	TCH						Fibra						Brix						Pol%Cana					
	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 (%)	Efeito	R ² (%)	Efeito	R ² (%)	Efeito	R ² (%)		
GL	35	I	5,80*		5,80*		1,92																	
GH	-	-	6,21*	2,20																				
GL	-	-	8,38*	4,21																				
GH	-	-	6,90*	2,01																				
GL	17	IX	-12,40*		-12,40*		6,79																	
GH	-	-	0,34*	3,59																				
GL	4	VII	-0,30*	2,83																				
GH	56	-	-0,29*	2,74																				
GL	55	-	0,32*	2,82																				
GH	-	-	-0,42*	3,99																				
GL	51	II	0,37*	2,70																				
GH	18	IV	0,43*	2,81																				
GL	54	X	0,32*	3,39																				
GH	-	-	-0,52*	3,61																				
GL	16	II	0,35*	1,77																				
GH	1	V	-0,46*	3,49																				
GL	2	-	-0,35*	4,29																				
GH	-	-	0,29*	2,41																				
GL	-	-	1,68*	1,53																				
GH	51	II	2,85*	4,03																				
R ² % Total			8,42		8,71		9,16		11,51		6,20		13,90		4,29		21,62							

Tabela 11. Efeito de marcas simples e de associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para as características diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana em cana planta e cana soca para marcadores do tipo SSRs genômicos.

Característica	Diâmetro do colmo				Peso do colmo				Altura do colmo				Número de perfilhos							
	Cana Planta		Cana Soca		Cana Planta		Cana Soca		Cana Planta		Cana Soca		Cana Planta		Cana Soca					
	GL	GH	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$				
CIR36 2D1	-	-	0,07*	2,47																
SMC1011HA 3C	-	-	-0,09*	2,00																
CIR01 3D2	6	I	-0,06*	2,15																
CIR12 7D2	67	I	0,08*	3,37																
CIR36 5D1	1	V	-0,08*	3,61																
SMC1011HA 3C	-	-	-0,10*	2,47																
CIR32 3C	16	II	0,08*	1,82																
CIR35 3D1	-	-																		
CIR32 5D2	16	II																		
CIR67 3C	1	V																		
36BUQ 3D1	-	-																		
SMC1047 3D2	18	IV																		
SMC21AS 2D2	18	IV																		
CIR18 1D2	10	II																		
CIR31 2C	46	-																		
CIR14 1D1	-	-																		
CIR36 7D2	1	V																		
$R^2\%$ Total			13,60		4,29		8,08		1,90		4,39		2,04		11,52		4,09			
Característica	TCH																			
	Cana Planta				Cana Soca				Fibra				Brix				Pol%Cana			
	GL	GH	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$		
CIR35 3D1	-	-	-6,31*	2,20																
CIR51 3D1	25	II	7,03*	2,96																
36BUQ 3D1	-	-																		
CIR12 7D2	67	I	8,12*	3,69																
CIR32 6D1	10	II	6,17*	2,12																
415MS 5C	63	II																		
CIR74 5C	-	-																		
2039 2C	-	-																		
CIR67 4D2	-	-																		
CIR36 5D2	1	V																		
CIR36 7D2	1	V																		
CIR67 4D2	-	-																		
$R^2\%$ Total			5,16		6,08		4,51		4,24		0		2,00		5,06		4,54			

*Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$); GL: grupo de ligação, GH: grupo de homologia; R^2 : porcentagem da variação fenotípica explicada pelo marcador.

Tabela 12. Efeito de marcas simples e de associações ($R^2\%$) parciais e múltiplas (R^2 total) para as características diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol% Cana em cana planta e cana soca para marcadores do tipo EST-SSRs.

Característica	GL	GH	Diâmetro do colmo			Peso do colmo			Altura do colmo			Número de perfilhos					
			Cana Planta	Cana Soca	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$	Efeito	$R^2(\%)$		
SCB208 4D2	19	III	-0,07*	2,57	-0,12*	5,88											
SCB227 1D1	-	-	0,06*	1,83													
SCA53 8C	18	I	0,07*	1,77													
SCB148 2C	42	-			0,08*	1,74	0,97*	3,43									
SCA17 1C	-	-			-0,10*	2,06											
SCB145 3C	6	I			-0,11*	2,51											
SCB259 6C	10	II			-0,08*	2,09											
SCB01 3C	-	-			0,09*	2,37											
SCB270 7D2	36	V			-0,61*	2,03											
SCB219 4C	-	-			-0,68*	2,17											
SCB248 3C	-	-			-0,83*	1,79											
SCB193 1C	34	III			-0,81*	2,05											
SCB194 1D1	-	-					0,54*	2,32									
SCB228 2D2	-	-					-0,57*	2,46									
SCC45 2D2	74	-															
SCB232 1C	-	-															
SCA17 3D2	-	-															
SCA31 1D1	-	-															
SCB227 2D1	26	IX															
SCB25 2D2	-	-															
SCB14 3C	-	-															
SCB226 6D2	-	-															
SCB219 1C	1	V															
SCB207 6C	-	-															
SCB222 2C	-	-															
SCB248 4C	29	VI															
SCB55 1D1	-	-															
$R^2\%$ Total					6,77	16,65	11,47	8,36	8,63	12,41	9,66	9,37					

* Significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$); GL: grupo de ligação, GH: grupo de homologia; R^2 : porcentagem da variação fenotípica explicada pelo marcador.

Tabela 12. Continuação

Característica	TCH			Fibra			Brix			Pol%Cana		
	GL	GH	Canha Planta Efeito R ² (%)	Canha Soca Efeito R ² (%)	Canha Planta Efeito R ² (%)	Canha Soca Efeito R ² (%)	Canha Planta Efeito R ² (%)	Canha Soca Efeito R ² (%)	Canha Planta Efeito R ² (%)	Canha Soca Efeito R ² (%)	Canha Planta Efeito R ² (%)	Canha Soca Efeito R ² (%)
SCB248 1D1	-	-	8,53*	4,30								
SCB248 3C	-	-	-8,38*	2,94								
SCB07 1D2	19	III	-8,44*	4,06								
SCB207 6C	-	-			11,12*	3,14			0,50*	1,86		
SCB49 1D1	-	-			6,10*	2,09						
SCB25 2D2	-	-			6,53*	2,39						
SCB222 3D1	9	VIII			0,29*	2,72						
SCB01 2C	10	II			-0,35*	2,83						
SCA17 1C	-	-			0,45*	3,23						
SCB221 1D2	-	-			0,30*	2,76						
SCB27 1D1	-	-			0,28*	2,65						
SCA61 1D2	29	VI			-0,24*	1,94						
SCB192 2C	53	X			0,45*	5,01						
SCB270 3C	13	-			0,32*	2,29						
SCC38 4D2	-	-			-0,31*	2,70						
SCA47 2D1	25	II			-0,27*	2,05						
SCA48 1D2	-	-			0,50*	5,08			0,45*	3,42		
SCB193 5C	-	-			-0,38*	2,31						
SCB56 1C	-	-			0,49*	2,47						
SCA31 3C	23	-			-0,40*	1,84						
SCB07 9D1	61	III							0,33*	2,72		
SCB208 4D2	19	III							-0,37*	2,27		
SCB213 2D1	5	I							-0,43*	3,10		
SCB227 1D1	-	-										
SCB06 3D2	13	-										
SCB270 7D2	-	-										
SCA53 1D2	-	-										
SCA31 1D1	23	-										
SCA53 3C	11	I										
R ² % Total			11,30	7,62	16,13	12,05	11,70	13,37	12,23	14,02	0,33*	1,73

4.5.1 Diâmetro do colmo

Para os marcadores do tipo AFLP foram encontrados 11 QTAs associados com o diâmetro a $p < 0,05$ (Tabela 10) sendo três em cana planta e soca (ACT/CTT 24D2, AAC/CAT 40D1 e ACG/CAG 17C), três apenas em cana planta (AAC/CAA 5C, ACG/CTT 21D2 e CAC/CTG 17D1) e dois em cana soca (AAG/CAG 33D1 e ACT/CAT 13D2).

Os marcadores ACT/CTT24D2, AAC/CAT40D1, ACG/CAG17C, ACG/CTT21D2, AAG/CAG33D1 e ACT/CAT13D2 associados a QTAs foram mapeados nos grupos de ligação 10, 55, 17, 37, 56 e 18, nos grupos de homologia II (GL10), IV (GL37 e 18) e IX (GL17). Para estes marcadores, a variação fenotípica (R^2) variou de 1,04% a 4,38%. Considerando todas as marcas associadas para diâmetro, juntas elas respondem por 16,28% e 11,15% da variação fenotípica total observada, respectivamente, em cana planta e soca.

Para os marcadores derivados dos SSRs genômicos foram obtidos sete associações marcador/QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 11). Destes, cinco marcas foram encontradas em cana planta (CIR36 2D1, SMC1011HA 3C, CIR01 3D2, CIR12 7D2 e CIR36 5D1) e duas em cana soca (SMC1011HA 3C e CIR32 3C). Os marcadores CIR01 3D2, CIR12 7D2, CIR36 5D1 e CIR32 3C associados aos QTAs foram mapeados nos grupos de ligação 6, 67, 1 e 16, respectivamente, e nos grupos de homologia I (GL6 e 67), II (GL16) e V (GL1).

A variação fenotípica (R^2) para diâmetro foi de 1,82% a 3,61%. Analisando todas as marcas para cana planta houve uma explicação da variação fenotípica de 13,60% e de 4,29% para cana soca.

Em relação aos marcadores do tipo EST-SSRs houve a detecção de nove associações marcador/QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 12). Apenas um permaneceu em ambos os ciclos (SCB208 4D2), dois somente para cana planta (SCB227 1D1 e SCA53 8C) e cinco exclusivos de cana soca (SCB148 2C, SCA17 1C, SCB145 3C, SCB259 6C e SCB01 3C). Os marcadores SCB208 4D2, SCA53 8C, SCB148 2C,

SCB145 3C e SCB259 6C associados a QTAs foram mapeados nos grupos de ligação 19, 18, 42, 6 e 10, respectivamente e nos grupos de homologia I (GL6 e 18), II (GL10) e III (GL19).

Os valores da variação fenotípica (R^2) ficaram entre 1,74% e 5,88%. Juntos, todos os marcadores contribuem para uma variação fenotípica de 6,77% em cana planta e de 16,65% em cana soca.

Ao observar a tabela 9, os marcadores ESTs associados a esta característica mostraram homologia a uma proteína de ligação ao DNA (DNA-binding protein MNB1) (SCB208), a uma provável proteína (WD-40) (SCB227), ao gene da espiguetta 1 indeterminada em milho (SCA53), a enzima beta amilase, a qual é responsável pela quebra do amido em açúcar (SCB148), a uma proteína hipotética (SCA17), a alpha-galactosidase (SCB145) e a uma proteína de ligação ao RNA (SCB01).

De acordo com Ming et al. (2002), o valor fenotípico de cada planta é o produto de um número de QTAs tanto de efeitos positivos como negativos. Para verificar a relação entre o fenótipo e número de QTAs com os efeitos positivos e negativos os indivíduos da população de mapeamento foram agrupados em suas respectivas classes fenotípicas para cada uma das características avaliadas e relacionados com o número médio de QTAs de efeitos positivos e negativos observados em cana planta e soca (Figura 7).

Para diâmetro do colmo, a maioria dos QTAs apresentou efeitos negativos, significando que a presença desses alelos contribui negativamente para essa característica sendo que o número de QTAs negativos diminui a medida com que o diâmetro do colmo vai aumentando e consequentemente, aumentado o número de QTAs de efeito positivo.

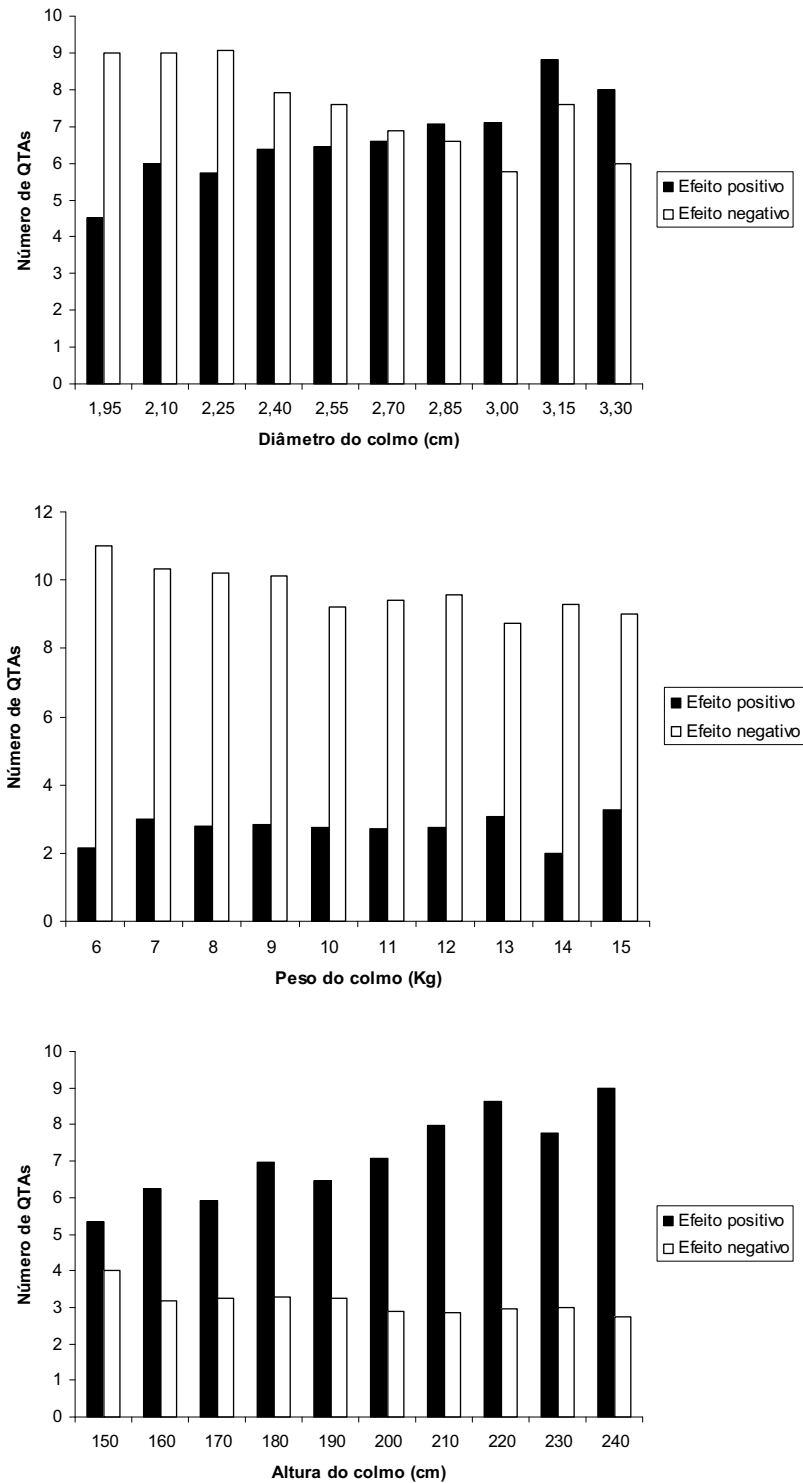


Figura 7. Frequência de distribuição dos efeitos médios positivos e negativos dos QTAs identificados no cruzamento para diâmetro, peso e altura do colmo, número de perfilhos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana, medidos entre cana planta e cana soca.

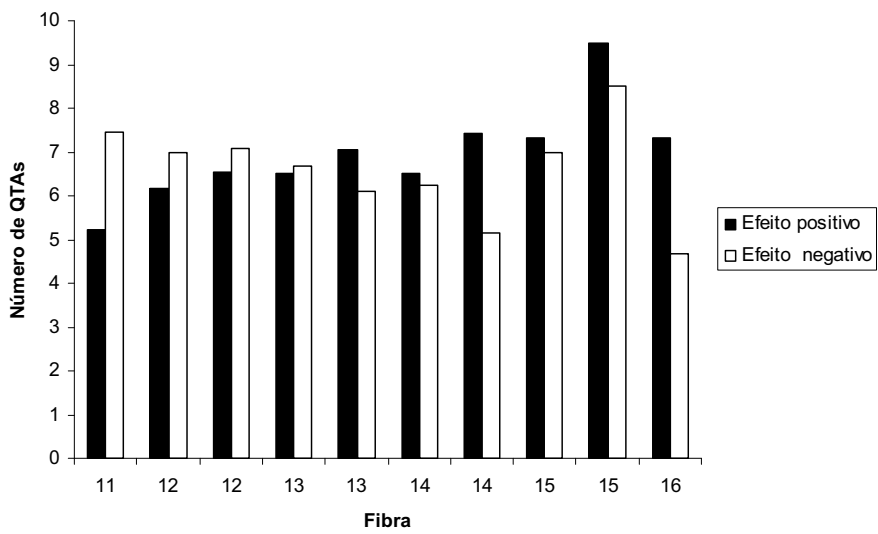
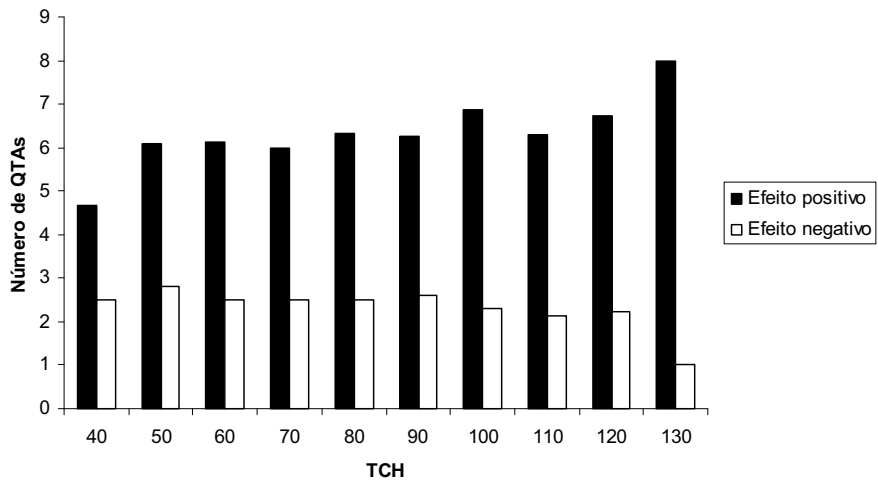
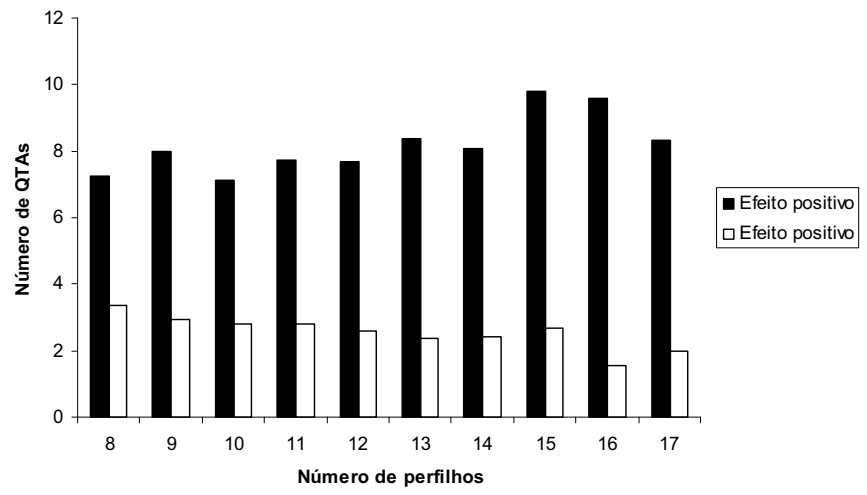


Figura 7. Continuação

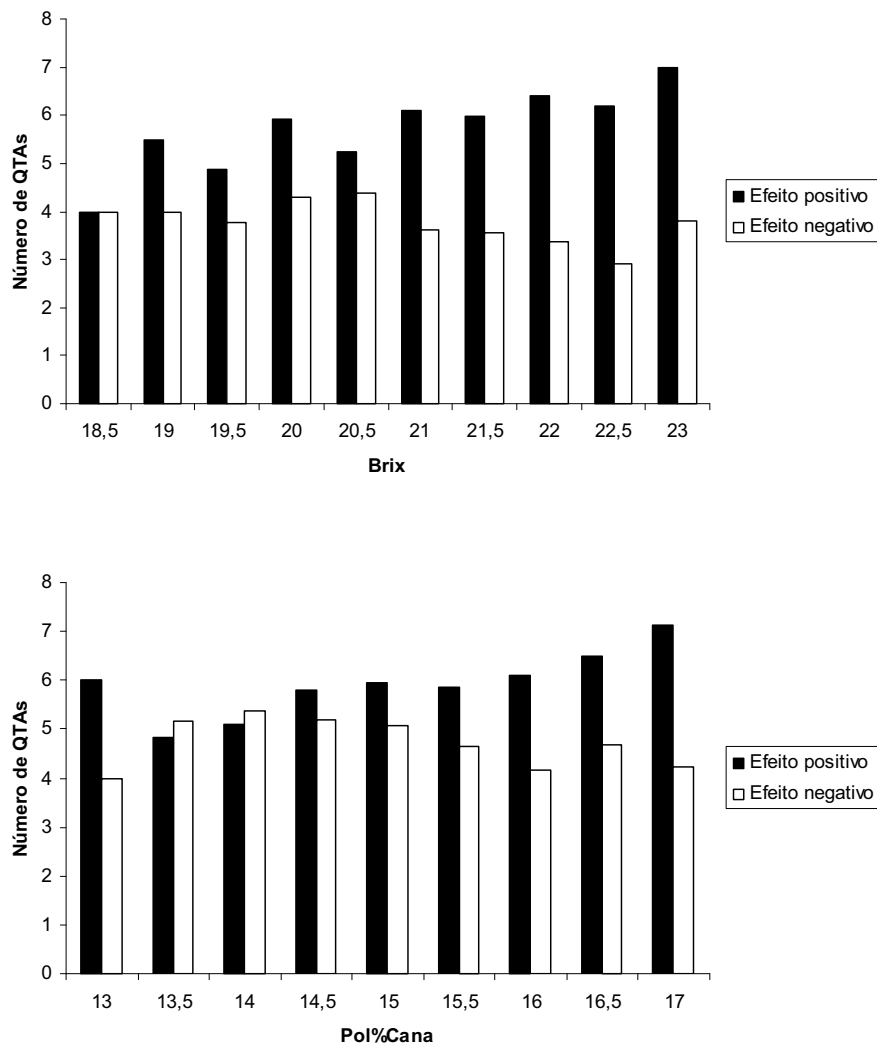


Figura 7. Continuação

4.5.2 Peso do colmo

Para os marcadores do tipo AFLP, foram identificados oito associações marcador/QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 10), sendo uma em ambos os ciclos (AAG/CTG 19C), quatro em cana planta (AAC/CAT40D1, ACT/CAT13D2, AAC/CAT 3C e AAC/CAA37C), e duas em cana soca (ACG/CAG17C e AAC/CAA15D1). Os marcadores AAC/CAT40D1, ACT/CAT13D2 e ACG/CAG17C associados a QTAs para peso também mostraram associação ao diâmetro do colmo. Alguns marcadores associados aos QTAs para peso foram mapeados sendo AAC/CAT40D1,

ACG/CAG17C, ACT/CAT13D2 e AAC/CAA37C, nos GL 55, 17, 18 e 8, referente aos grupos de homologia IV (GL18) e IX (GL17).

A variação fenotípica (R^2) observada para peso de colmos variou de 1,86 a 4,68. Considerando o total de associações marcador/QTAs, a variação fenotípica foi de 12,65% em cana planta e 9,49% em cana soca.

Para os marcadores do tipo SSRs genômicos, apenas quatro associações marcador/QTAs foram detectadas para peso do colmo a $p < 0,05$ (Tabela 11), três em cana planta (CIR01.3D2, CIR36.5D1 e CIR35.3D1) e somente uma em cana soca (CIR12.7D2).

Os marcadores CIR12.7D2 e CIR36.5D1 também mostraram associados ao diâmetro do colmo. Os marcadores CIR01.3D2, CIR12.7D2 e CIR36.5D1 foram mapeados nos grupos de ligação 6, 67 e 1, respectivamente, e agrupados nos grupos de homologia I (GL6 e 67) e V (GL1).

A magnitude da variação fenotípica (R^2) foi de 1,83% a 4,11%. Considerando todos os marcadores associados ao peso do colmo, a explicação da variação fenotípica foi de 8,08% em cana planta e 1,90% em cana soca.

Para os marcadores do tipo EST-SSRs foram detectadas oito associações marcador/QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 12) sendo cinco em cana planta (SCB148.2C, SCB270.7D2, SCB219.4C, SCB248.3C e SCB193.1C) e o restante em cana soca (SCB145.3C, SCB194.1D1 e SCB228.2D2). Os marcadores SCB148.2C e SCB145.3C associados aos QTAs de peso de colmo também mostraram associação para diâmetro do colmo, o que talvez possa sugerir o envolvimento dos locos SCB145 e SCB148 com essas duas características. Os marcadores SCB148.2C, SCB145.3C, SCB270.7D2 e SCB193.1C foram mapeados nos seguintes grupos de ligação: 42, 6, 36 e 34, respectivamente, nos grupos de homologia I (GL6), III (GL34) e V (GL36). A R^2 para cada um dos marcadores associados ao peso de colmo (R^2) variam de 1,79% a 3,58%. Todos os marcadores juntas explicaram 11,47% e 8,36% da variação fenotípica para cana planta e cana soca, respectivamente.

A frequência de distribuição entre os efeitos dos QTAs positivos e negativos (Figura 7) mostrou que na média foram detectados um maior número de marcadores associados a QTAs de efeitos negativos do que positivos para peso de colmo, mesmo nas classes fenotípicas correspondentes aos indivíduos com maior peso.

4.5.3 Altura do colmo

Para os marcadores AFLP foram detectadas oito associações marcador/QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 10) para altura do colmo, duas exclusivas em cana planta (ACT/CAG.6C e ACC/CTC.9D2), quatro em cana soca (ACC/CTC.19C, ACT/CTT.35C, ACT/CTG.11C e ACC/CTC.5D1) e apenas uma (AAC/CAC.10D2) em ambos os ciclos. Os marcadores/QTAs ACC/CTC.9D2, AAC/CAC.10D2 e ACC/CTC.19C foram mapeados nos grupos de ligação 16, 35 e 51, respectivamente, nos de homologia I (GL35) e II (GL16 e 51). A variação fenotípica total (R^2) foi de 2,29% a 5,15%. E 9,89% da variação fenotípica total de altura do colmo são explicados pelos três alelos em cana planta e 14,22% é explicado pelos cinco alelos em cana soca.

Para os marcadores do tipo SSRs genômicos apenas três marcadores mostraram associações a QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 11) para a altura do colmo, dois em cana planta (CIR32.5D2 e CIR67.3C) e um em cana soca (SMC36BUQ.3D1). Dentre estes marcadores apenas CIR32.5D2 e CIR67.3C foram mapeados nos grupos de ligação 16 e 1, localizados nos grupos de homologia II e V, respectivamente. Os valores da variação fenotípica (R^2) variaram entre 2,04% a 2,22% sendo que 4,39% da variação fenotípica total foi observada em cana planta e 2,04% em cana soca.

Em relação aos 71 EST-SSRs avaliados, foram encontrados oito associações marcador/QTAs para altura do colmo a $p < 0,05$ (Tabela 12), quatro em cana planta (SCC45.2D2, SCB232.1C, SCA17.3D2 e SCA31.1D1) e quatro em cana soca (SCB227.1D1, SCB259.6C, SCB227.2D1 e SCB25.2D2). Os marcadores SCB227.1D1 e SCB259.6C também mostraram associação a QTAs para diâmetro do colmo. Apenas os marcadores SCB259.6C, SCC45.2D2 e SCB227.2D1 foram mapeados nos grupos de ligação 10, 74 e 26, pertencentes nos grupos de homologia II (GL2) e IX (GL26). A variação fenotípica (R^2) encontrada para cada

marcador associado aos QTAs de altura variou de 1,83% a 5,76%, e no total foram obtidos valores de 8,63% da em cana planta e 12,41% em cana soca.

Conforme a figura 7, a maior parte dos marcadores associados aos QTAs para altura de colmo mostraram efeito positivos nesta característica.

4.5.4 Número de perfilhos

Em relação aos marcadores do tipo AFLP apenas quatro associações marcador/QTAs foram detectadas para número de perfilhos a $p < 0,05$ (Tabela 10), sendo uma em cana planta (AAC/CAC.5C) e o restante em cana soca (AAC/CAA.5C, AAC/CAC.10D2 e ACG/CTC.20D2), não havendo nenhuma associação que permanecesse em ambos os ciclos. A associação marcador/QTA AAC/CAA.5C também mostrou associação ao diâmetro do colmo e o marcador AAC/CAC.10D2 para a altura do colmo. Apenas o marcador AAC/CAC.10D2 foi mapeado no grupo de ligação 35 pertencente ao grupo de homologia I. A porcentagem da variação fenotípica explicada pelos marcadores que mostraram associação com os QTAs de número de colmos variou de 2,00% a 3,34% enquanto o R^2 total foi de 2,00% e 8,27% em cana planta e cana soca, respectivamente.

Para os marcadores do tipo SSRs genômicos foram detectadas seis associações marcador/QTAs com número de perfilhos a $p < 0,05$ (Tabela 11) sendo quatro em cana planta (SMC1047.3D2, SMC21AS. D2, CIR18.1D2 e CIR31.2C) e dois em cana soca (CIR14.1D1 e CIR36.7D2). Os marcadores SMC1047.3D2, SMC21AS.2D2, CIR18.1D2, CIR31.2C e CIR36.7D2, respectivamente, foram mapeados nos grupos de ligação 18 (SMC1047.3D2 e SMC21AS.2D2), 10, 46 e 1, e agrupadas nos grupos de homologia II (GL10), IV (GL18) e V (GL1). O (R^2) ficou entre 1,85% e 3,39% sendo que o R^2 total contribuiu com 11,52 para cana planta e 4,09% para cana soca.

Entre os EST-SSRs foram observadas sete associações marcador/QTAs com número de perfilhos a $p < 0,05$ (Tabela 12), três em cana planta (SCB14.3C, SCB226.6D2 e SCB219.1C) e quatro em cana soca (SCB207.6C, SCB222.2C,

SCB248.4C e SCB55.1D1). Apenas os marcadores SCB219.1C e SCB248.4C foram mapeados nos grupos de ligação 1 e 29 e de homologia V e VI, respectivamente. O R^2 variou de 1,86% a 3,52%. O R^2 total foi de 9,66% para cana planta e 9,37% em cana soca.

Conforme o observado na tabela 9, os ESTs associados a número de perfilhos apresentam homologia a provável proteína dedo de zinco (RING-H2) (SCB226), a um gene ERECTA (SCB207) e uma proteína similar a SPAC2F7 (SCB222).

A maioria dos marcadores detectados associados aos QTAs mostraram efeito positivo, indicando que quanto maior o número de perfilhos, maior é a presença dos QTAs de efeito positivo (Figura 7).

4.5.5 TCH

Cinco associações entre marcador e QTAs putativos foram detectadas à $p < 0,05$ para TCH (Tabela 10), sendo três em cana planta (ACT/CAT.7D1, ACT/CTG.7D2 e AAG/CTG.19C) e dois em cana soca (AAC/CAC. 10D2 e ACG/CAG.17C). O marcador AAC/CAC.10D2 também mostrou associação com a altura do colmo, enquanto o marcador AAG/CTG.19C no peso do colmo e o marcador ACG/CAG.17C no diâmetro e peso do colmo. Apenas os marcadores AAC/CAC.10D2 e AAG/CTG.19C foram mapeados nos grupos de ligação 35 e 17, nos de homologia I e IX, respectivamente. O R^2 variou de 1,92% a 6,79%, sendo que o R^2 correspondeu a 8,42% em cana planta e 8,71% em cana soca.

Para os marcadores SSRs genômicos foram detectadas quatro associações entre marcadores e QTAs para TCH a $p < 0,05$ (Tabela 11), sendo dois em cana planta (CIR35.3D1 e CIR51.3D1) e dois em cana soca (SMC36BUQ.3D1 e CIR12.7D2). Dentre estes, os marcadores CIR35.3D1 e CIR12.7D2 também mostraram associação com diâmetro e peso do colmo, enquanto o marcador SMC36BUQ.3D1 e a altura do colmo. Somente o marcador CIR51.3D1 foi mapeado no grupo de ligação 25, dentro do grupo de homologia II. Os valores de R^2 foram de

2,12% a 3,69% para os marcadores individualmente e de 5,16% em cana planta e 6,08% em cana soca.

Para os marcadores EST-SSRs foram encontradas seis associações marcador/QTAs para TCH a $p < 0,05$ (Tabela 12), três em cana planta (SCB248.1D1, SCB248.3C e SCB07.1D2) e três em cana soca (SCB207.6C, SCB49.1D1 e SCB25.2D2), com a maioria apresentando efeito positivo. O marcador SCB248.3C também mostrou associação com peso dos colmos e o SCB207.6C com o número de perfilhos. Somente o marcador SCB07.1D2 foi mapeado no grupo de ligação 19 (GH III). O R^2 ficou entre 2,09% e 4,30%. Ao somar os R^2 individuais de todos os marcadores associados aos QTAs de TCH foram obtidos valores de 11,30% e 7,62%, respectivamente para cana planta e soca.

Para TCH, a maioria dos QTAs detectados mostrou efeito positivos mesmo nas classes fenotípicas de menor valor (Figura 7).

4.5.6 Fibra

Para os marcadores do tipo AFLP foram detectadas a presença de sete marcadores associados a QTAs de fibra a $p < 0,05$ (Tabela 10), três em cana planta (AAC/CAC.15D1, AAG/CAT.43D2 e AAG/CAG.33D1) e quatro em cana soca (ACT/CAT.7D1, AAC/CAT.47D1, AGA/CTG.27C e ACC/CTT.19C). O marcador ACT/CAT.7D1 também foi associado a um QTA para TCH, o AAC/CAC.15D1 para um QTA de peso do colmo e o AAG/CAG.33D1 para um QTA de diâmetro do colmo. Destes, os marcadores AAG/CAT.43D2 e AAG/CAG.33D1, AAC/CAT.47D1 e o ACC/CTT.19C foram mapeados nos grupos de ligação 4, 56, 55 e 51, respectivamente, pertencentes aos grupos de homologia II (GL51) e VII (GL4). Os valores de R^2 ficaram entre 2,00% e 3,99%, considerando todos os marcadores associados aos QTAs detectados, os valores de R^2 explicam 9,16% e 11,51% da variação fenotípica em cana planta e soca.

Entre todos os SSRs genômicos avaliados foram detectados quatro associações entre marcador/QTAs para fibra a $p < 0,05$ (Tabela 11), duas em cana

planta (CIR12.6D1 e SMC415MS.5C) e duas em cana soca (CIR74.5C e SMC2039.2C). Apenas marcadores CIR12.6D1 e SMC415MS.5C foram mapeados nos grupos de ligação 10 e 63, ambos do GH II. Os valores de R^2 ficaram entre 2,05% e 2,46%, e no total, corresponderam a 4,51% e 4,24% em cana planta e soca, respectivamente.

Para os EST-SSRs foram detectadas 10 marcadores associados a QTAs de fibra a $p < 0,05$ (Tabela 12), seis em cana planta (SCB222.3D1, SCB01.2C, SCA17.1C, SCB221.1D2, SCB27.1D1 e SCA61.1D2) e quatro em cana soca (SCB192.2C, SCB270.3C, SCC38.4D2 e SCA47.2D1). Os marcadores SCB222.3D1, SCB01.2C, SCA61.1.D2, SCB192.2C, SCB270.3C e SCA47.2D1 foram mapeados nos grupos de ligação 9, 10, 29, 53, 13 e 25, respectivamente, e nos GH II (GL10 e 25), VI (GL29), VIII (GL9) e X (GL53). Os valores encontrados para o R^2 foi de 1,94% a 5,08%, e no total foram obtidos valores de R^2 de 16,13% em cana planta e 12,05%, cana soca.

Conforme a visualização dos efeitos dos QTAs nos gráficos de frequência verifica-se que o número de QTAs detectados com efeitos positivos foi semelhante ao número de QTAs de efeito negativo, sendo que os QTAs de efeitos positivos foram predominantes nas classes fenotípicas de maior valor de fibra (Figura 7).

4.5.7 Brix

Sete associações entre marcadores do tipo AFLP e QTAs de Brix foram detectadas a $p < 0,05$ (Tabela 10), uma em ambos os ciclos (ACG/CAG.14D2), um em cana planta (ACG/CTT.32D1) e quatro em cana soca (ACG/CTT.19C, ACT/CTT.32C, AAG/CAT.17C e AAC/CAC.27D2). Também foi encontrada associação significativa para o marcador ACG/CTT.19C com QTA de produtividade (TCH). Os marcadores ACG/CTT.19C, ACG/CAG.14D2, ACG/CTT.32D1, AAG/CAT.17C e AAC/CAC.27D2 foram mapeados nos grupos de ligação 51, 18, 54, 16 e 1, respectivamente, dentro dos GH II (GL16 e 51), IV (GL18), V (GL1) e X (GL54). A porcentagem da variação fenotípica explicada pelos marcadores

associados a Brix ficou entre 1,77% e 3,61%. Se considerarmos todos os marcadores o valor do R^2 total corresponde a 6,20% e 13,90% em cana planta e soca respectivamente.

Apenas o marcador CIR67.4D2 derivado de um SSR genômico mostrou associação com QTA de Brix a $p < 0,05$ (Tabela 11) em cana soca e com um R^2 de 2,00%.

Nove associações entre marcadores derivados de EST-SSRs e QTAs para Brix foram detectadas a $p < 0,05$ (Tabela 12), uma em cana planta e soca (SCA48.1D1), três exclusivos de cana planta (SCB193.5C, SCB56.1C e SCA31.3C) e quatro somente em cana soca (SCB207.6C, SCB07.9D1, SCB208.4D2 e SCB213.2D1). O marcador SCB207.6C também mostrou associação a um QTA para número de perfilhos e TCH e o SCB208.4D2 a um QTA para diâmetro. Os marcadores SCA31.3C, SCB07.9D1, SCB208.4D2 e SCB213.2D1 foram mapeados nos grupos de ligação 23, 61, 19 e 5, nos grupos de homologia I (GL5) e III (GL61 e 19). Do total, quatro tiveram efeito negativo. O R^2 foi de 1,84% a 5,08%, sendo que o R^2 total foi de 11,70% em cana planta e 13,37% em cana soca.

Em relação aos efeitos dos QTAs, o número de QTAs negativos decresceu na medida com que o valor do Brix aumentou, demonstrando que valores elevados de Brix tiveram maior influência de QTAs de efeitos positivos (Figura 7).

4.5.8 Pol%Cana

Para Pol%Cana, foram encontradas sete associações entre marcadores derivados de AFLP com QTAs a $p < 0,05$ (Tabela 10), sendo um em cana planta (ACT/CTT.20D1) e seis em cana soca (ACT/CTT.32C, AAG/CAT.17C, AAC/CAC.27D2, ACG/CTT.36D1, AGC/CAG.14C e ACC/CTC.19C). Os marcadores ACT/CTT.32C, AAG/CAT.17C e AAC/CAC.27D2 também mostraram associação para Brix. Os marcadores AAG/CAT.17C, AAC/CAC.27D2, ACG/CTT.36D1 e ACC/CTC.19C foram mapeados nos grupos de ligação 16, 1, 2 e 51,

respectivamente, dentro dos grupos de homologia II (GL16 e 51) e IV (GL1). A variação fenotípica (R^2) foi de 4,29% para cana planta e 2,41% para cana soca.

Em relação aos marcadores derivados dos SSRs genômicos, três associações/QTAs foram detectadas a $p < 0,05$ (Tabela 11), uma em cana planta (CIR36.5D2) e duas (CIR36.7D2 e CIR67.4D2) em cana soca. Ambos os marcadores CIR36.5D2 e CIR36.7D2, foram mapeados no grupo de ligação 1 e no de homologia V, o primeiro também mostrou-se associado ao diâmetro e peso do colmo e o segundo ao número de perfilhos. Os valores de R^2 permaneceram entre 1,95% e 5,06%. No total, a porcentagem da variação fenotípica atribuída pelos marcadores associados aos QTAs de Pol%Cana foi de 5,06% e 1,95% para cana planta e cana soca, respectivamente.

Para os marcadores do tipo EST-SSRs foram detectados nove marcadores associados a QTAs para Pol%Cana a $p < 0,05$ (Tabela 12), cinco em cana planta (SCB227.1D1, SCB06.3D2, SCB270.7D2, SCA53.1D2 e SCA31.1D1) e quatro em cana soca (SCB221.1D2, SCA48.1D2, SCB07.9D1 e SCA53.3C). Os marcadores SCA48.1D2 e SCB07.9D1 também mostraram-se associados a um QTA para Brix, o SCB221.1D2 a um QTA para fibra, o SCB227.1D1a um QTA para diâmetro do colmo e o SCB270.7D2 a um QTA para peso do colmo. Apenas quatro marcadores foram mapeados, o SCB07.9D1, o SCB06.3D2, o SCA31.1D1 e o SCA53.3C nos grupos de ligação 61, 13, 23 e 11, respectivamente, pertencente aos grupos de homologia III (GL61) e I (GL11). A porcentagem da variação fenotípica explicada pelos marcadores associados aos QTAs de Pol%Cana (R^2) permaneceu entre 1,85% a 7,58%, e quando somadas as variações entre todas as marcas individuais, o R^2 total, foi de 12,23% para cana planta e de 14,02% para cana soca.

O número de QTA com efeito positivo detectados para Pol%Cana foi um pouco maior para as classes fenotípicas referentes aos indivíduos com altos teores de Pol%Cana (Figura 7).

5. DISCUSSÃO

A utilização de marcadores moleculares nos programas de melhoramento pode auxiliar os melhoristas durante as fases de seleção. Entretanto, a utilização de um marcador para auxiliar na seleção de genótipos superiores, ou na eliminação de genótipos inferiores depende da escolha de um marcador que esteja fortemente ligado a característica de interesse do melhorista. A detecção de tal tipo de marcador requer, portanto a construção de um mapa de ligação, o qual constitui a representação gráfica e ou estatística dos cromossomos, fornecendo a localização e disposição dos marcadores ao longo do genoma.

Tradicionalmente, o mapeamento genético utiliza de populações segregantes derivadas de cruzamentos planejados. Em cana-de-açúcar, as populações para mapeamento têm sido oriundas de cruzamentos bi-parentais. A vantagem em se utilizar progênies derivadas de genitores elite ou cultivares, como no caso da população aqui apresentada (IACSP95-3018 x IACSP95-3046) diz respeito a possibilidade de mapear um maior número de alelos ou marcadores favoráveis para características importantes e de interesse em cana-de-açúcar, desde os componentes de produção, parâmetros de qualidade até resistência a principais doenças, visto que os genitores passaram por seleção. Por outro lado, as populações oriundas de cruzamento entre genitores elite podem não apresentar níveis de polimorfismo molecular e mesmo fenotípico tão altos como aqueles esperados entre cruzamentos envolvendo genitores de espécies diferentes (cruzamentos interespecíficos) ou entre uma variedade e uma espécie selvagem (AITKEN et al. 2005). Apesar disso, para todas as medidas fenotípicas analisadas, tanto para cana planta como para cana soca foram detectadas diferenças significativas, entre os indivíduos da população IACSP95-3018 x IACSP95-3046 demonstrando a existência de grande variabilidade entre a progênie para as características avaliadas.

No geral, os CV% apresentaram uma boa precisão experimental, com exceção para número de colmos e TCH, que foram altos nos dois anos da cultura (cana planta e cana soca). Tal resultado pode ser devido ao perfilhamento em cana-de-açúcar que, diferentemente de outras gramíneas, ocorre de forma desuniforme, isto é, os perfilhos vão se alongando enquanto novos perfilhos ainda estão sendo formados (HOARAU et al., 2002) o que dificulta a fenotipagem. Já para o TCH, por ser um valor estimado e dependente de outras características (peso e número de colmos), faz com que os erros das características dependentes sejam somados, apresentando desta forma, uma maior variação ambiental. Por outro lado, os valores moderados a altos encontrados para herdabilidade no cruzamento avaliado indicaram que a maior parte da variação fenotípica observada pode ser atribuída ao genótipo.

A população de mapeamento utilizada neste trabalho constou de 220 indivíduos amostrados ao acaso do cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046, sendo que 207 indivíduos foram genotipados para os marcadores do tipo AFLP, gSSRs e EST-SSRs. O tamanho ideal de uma população para mapeamento genético em famílias de irmãos completos é de 200 indivíduos. Essa quantidade é suficiente para recuperar as informações originais do genoma (CRUZ, 2006; BHERING & CRUZ, 2008). Amostras compostas menos de 50 indivíduos apresentam baixa resolução de mapeamento, principalmente na detecção de QTL de pequeno efeito (YOUNG, 1994), como é o caso da cana-de-açúcar.

A seleção baseada em características correlacionadas é frequentemente praticada nos programas de melhoramento devido à maior facilidade em selecionar os clones que possuam as duas características (SKINNER, 1972, SKINNER et al., 1987, RAM & HEMAPRABHA, 1998). Por exemplo, o coeficiente de correlação entre Fibra e Pol%Cana, nos dois anos, foi negativo e o entre peso e número de colmos foi positivo, também nos dois anos, assim como o observados em outras populações derivadas de cruzamentos bi-parentais em cana-de-açúcar (JACKSON, 2005; TYAGI & LAL, 2007; PINTO et al., 2009, MING et al., 2002) esperado, indicando a possibilidade de selecionar num mesmo clone alto teor de sacarose e adequados valores de fibra como alto peso e número de colmos.

O mapa obtido para o cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046 foi composto por 231 MDUs (1:1 e 3:1), distribuídos em 72 GLs, agrupados em dez GH sendo que 179 MDUs permaneceram não ligados levando a uma cobertura de 2436 cM. O número de marcadores moleculares utilizados foi insuficiente para cobrir todo o genoma. De fato, o mapa não está completamente saturado pelo pequeno tamanho dos GL e pelas marcas que permaneceram não ligadas.

Cultivares modernas, como IACSP95-3018 e IACSP93-3046, tem entre 100 a 130 cromossomos, sendo cerca de 15% oriundo de *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1996). Estudos têm mostrado que os GLs de origem de *S. spontaneum* são geralmente melhores cobertos por marcadores devido a sua natureza mais polimórfica (D'HONT et al., 1994; GRIVET et al., 1996). Os GL2, 10, 11, 13, 16, 18, 19, 26 e 27 foram os maiores (de 60 a 93cM) contendo um número maior de marcadores que o restante dos GLs, e provavelmente, segundo AITKEN et al. (2005), podem corresponder a fração *S. spontaneum* do genoma. A maior parte dos GLs desse estudo, assim como os apresentados por GRIVET et al. (1996), HOARAU et al. (2001) e AITKEN et al. (2005) são menores e com menos marcas, sendo provavelmente cromossomos *S. officinarum*, relacionados a mais baixa diversidade da espécie, já que aproximadamente 80% do genoma da cana-de-açúcar é atribuído a contribuições de *S. officinarum* (GRIVET et al., 1996), devido ao processo de nobilitação.

Baixos números de GLs encontrados dentro de alguns GHs também foram reportados por GRIVET et al. (1996), MING et al. (1998), HOARAU et al. (2001), AITKEN et al. (2005) e OLIVEIRA et al. (2007), sendo possivelmente atribuído a aneuploidia da cana-de-açúcar e a carência de marcas pode ser explicada pelos baixos níveis de polimorfismo encontrados nas regiões *S. officinarum* do seu genoma (GRIVET et al., 1996; MING et al., 1998; HOARAU et al., 2001; AITKEN et al., 2005).

Existem regiões no mapa com espaços entre as marcas superiores a 40 cM que ainda estão sendo frequentemente formados, que também foi reportado por HOARAU et al. (2001), havendo a necessidade de adicionar mais marcas para que haja uma maior cobertura do genoma. Além da necessidade da utilização de um

maior número de marcadores moleculares, esses espaços podem ser atribuídos a poucas marcas segregando em dose única presentes nesta região do genoma.

A solução para esse impasse pode ser a utilização das multidoses, a qual pode maximizar o número de GLs que possam vir a se formarem (AITKEN et al., 2007). Como observado (Figuras 3 e 4), a progênie segrega para outras doses (duplas e triplas) as quais futuramente poderão ser exploradas. A utilização das multidoses proporcionará um aumento na cobertura do mapa, pois apesar dos MDUs estarem presentes em altas freqüências no genoma da cana, aproximadamente 70% (AITKEN et al., 2005; DA SILVA et al., 2005), os 30% dos marcadores que não estão segregando em dose única poderão ser incorporados ao mapa de ligação, aumentando assim sua abrangência no genoma da cana-de-açúcar.

Um total de 155 marcadores associados com QTAs prováveis a $p < 0,05$ foram detectados para as oito características estudadas, com 84 mapeados em 34 GLs, sendo que apenas 16 deles foram observados nos dois anos da cultura para a mesma característica. Baixa interação QTA com o ciclo também foi reportado por HOARAU et al. (2002), indicando que existe uma alta interação genótipo x ano para muitas das características estudadas. Entretanto observa-se que a direção dos efeitos dos QTAs foi considerada a mesma nos dois anos em todos os casos. Alguns marcadores mostraram associação a QTAs de mais de uma característica simultaneamente, como é o caso dos marcadores AAC/CAT.40D1, ACG/CAG.17C, ACT/CAT.13D2, CIR01.3D2, CIR12.7D2, CIR36.5D1, SCB208.4D2 e SCB148.2C que mostraram associações tanto com diâmetro como com peso do colmo, caracterizando um caso de pleiotropia.

A utilização de marcadores derivados dos EST constitui uma estratégia que permite mapear de forma direta os genes de interesse (THAMARUS et al., 2002; SCHLOSS et al., 2002; ROSSI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; PINTO et al., 2007) e desta forma, descobrir a porção funcional do mapa de ligação (OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, permite estabelecer relação entre a função do gene e a característica fenotípica referente ao QTL associado. De fato, o marcador SCB207.6C associado a um QTA para perfilhamento é derivado de um EST com homologia a um gene (ERECTA) que regula a eficiência da transpiração. Este gene

atua na coordenação entre transpiração e fotossíntese (MASLE et al., 2005) tendo uma influência indireta na produtividade.

Em geral, os efeitos dos marcadores associados aos QTAs detectados foram baixos podendo ser atribuídos a poliploidia da cana-de-açúcar associada a alta heterozigosidade que implica na existência de vários alelos em cada loco (HOARAU et al., 2002).

O baixo número e efeito dos QTAs com associações significativas encontrados, em cana-de-açúcar estão no fato que nas cultivares modernas há uma maior concentração de alelos favoráveis, devido a seleção recorrente, diminuindo o contraste genético que determina a segregação das características e a magnitude do efeito dos QTAs (HOARAU et al., 2002) somado ao fato de existir mais de um alelo segregando no mesmo loco, sendo que para que esse efeito possa ser detectado ele tem que diferir significativamente dos outros (AITKEN et al., 2008).

Como ainda não existem mapas de ligação em cana-de-açúcar que são completos é difícil comparar a localização no genoma de alguns QTLs que controlam a mesma característica em diferentes populações de cana-de-açúcar (MING et al., 2002). A fim de obter suficiente cobertura do genoma para análises de QTL há necessidade de um grande número de marcas, já que a extensa cobertura do mapa facilitará a sua detecção para características de interesse em cana-de-açúcar (AITKEN et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- Existe grande variabilidade genética e segregação transgressiva entre os clones de cana-de-açúcar para os componentes de produção e parâmetros de qualidade, com baixo CV%, exceto para número de colmos e TCH;
- Através do coeficiente de correlação pode-se selecionar clones que combinem duas características desejáveis, como é o caso de peso e número de colmos e Pol%Cana e fibra;
- Foi possível constatar que a progênie segrega para multidoses, sendo que, futuramente, a sua exploração irá garantir um mapa mais saturado, cobrindo uma maior parte do genoma da cana-de-açúcar;
- Todos os marcadores juntos (AFLP, gSSR e EST-SSR) produziram um mapa de ligação com cobertura do genoma da ordem de 2436 cM, ficando evidente que não está completamente saturado, havendo necessidade de uma maior quantidade de marcadores moleculares bem como o uso das multidoses;
- Foram identificados na progênie QTAs associados a diâmetro, peso e altura dos colmos, número de colmos, TCH, fibra, Brix e Pol%Cana, com alguns deles associados a mais de uma característica, concluindo que existem alelos que segregam para as características de interesse agrônômico em cana-de-açúcar.
- Os ESTs apresentaram maiores números de marcas ligadas e também maiores quantidades de associações com QTAs importantes na detecção das regiões funcionais do genoma da cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.789-801, 2005.

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

AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. Construction of a genetic linkage map for *Saccharum officinarum* incorporating both simplex and duplex markers to increase genome coverage. **Genome**, v.50, p.742-756, 2007.

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

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.

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

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

ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome: A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.1-1, 2001.

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.

BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, p.379-385, 2008.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoria de Plantas. 4ª Edição. Viçosa: Editora Universitária, 525p., 2005.

BORÉM, A.; SANTOS, F.R. **Biologia simplificada**. 2.ed., Viçosa, MG, 302p., 2004.

BLEARS, M. J.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. I. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review a procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.99-114, 1998.

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

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. **Marcadores moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds) Tipos de marcadores moleculares Viçosa, MG, 531p., 2009.

CHARCOSSET, A.; MOREAU, L. Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. **Euphytica**, v.137, p.81-94, 2004.

CONSECANA – Conselho nacional dos produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado de São Paulo. **Manual de instruções – CONSECANA-SP**. Editora CONSECANA, Piracicaba, 112p., 2006.

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

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia Univ. Press, New York, 1981.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3a Edição. Vicososa: Editora UFV, 460p., 2004.

CRUZ, E. M. **Efeito da saturação e do tamanho de populações F2 e de retrocruzamento sobre a acurácia do mapeamento genético**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 119p., 2006.

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

DA SILVA, J.; HONEYCUTT, R. J.; BURNQUIST, W.; AL-JANABI, S. M.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D.; SOBRAL, B. W. S. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP and PCR-based markers. **Molecular Breeding**, v.1, p.165-179, 2005.

DANIELS, J. and DANIELS C.A. Geographical historical and Cultural aspects of the origin of the Indian Chinese sugarcane *S. barberi* and *S. sinense*. **Sugarcane Breeders Newsletters**, v.36, p.1-23, 1975.

DEMEKE, T.; SASIKUMAR, B.; HUCLY, P.; CHIBBAR, R. N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in cereal improvement. **Maydica**, v.42, p.133-142, 1997.

D'HONT, A.; LU, Y. H.; GONZÁLES, D. L.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J.C. A molecular approach to unravelling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the andropogoneae. **Genome**, v.37, p.222-230, 1994.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, v.250, p.405-413, 1996.

Doerge, R. W.; ZENG, Z. B.; WEIR, B. S. Statistical issues in the search for genes affecting quantitative traits in experimental populations. **Statistical Science**, v.12, p.195-219, 1997.

Doerge, R. W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.43-52, 2002.

EDEMÉ, S. J.; GLYNN, N. G.; COMSTOCK, J. C. Genetic segregation of microsatellite markers in *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum*. **Heredity**, v.97, p.366-375, 2006.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Londres: Editora Longman Group, 464p., 1996.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p., 1998.

GARCIA, A. A. F.; KIDO, E. A.; MEZA, A. N.; SOUZA, H. M. B.; PINTO, L. R.; PASTINA, M. M.; LEITE, C. S.; DA SILVA, J. A. G.; ULIAN, E. C.; FIGUEIRA, A. 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. **Computacional Statistics & Data Analysis**, v.51, p.3749-3764 (ISSN 0167-9473), 2007.

GRIVET, L.; D'HONT, A.; ROQUES, D.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J. C. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum spp.*): Genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics**, v.142, p.987-1000, 1996.

GRUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K.; SHARMA, P.C.; ARMES, B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant Breed**, v.118, p.369-390, 1999.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163-185, 2000.

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. **Theoretical and Applied Genetics**, 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. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p1027-1037, 2002.

HOGARTH, D. M.; CROSS, K. W. V. The inheritance of fiber content in sugar cane. *Proc Aust Soc Sugar Cane Technol*, p.93 98, 1987.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <http://www.ibge.gov.br> acesso em 09 outubro 2009.

JACKSON, P. A. Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crops Research**, v.92, p.277-290, 2005.

LANDELL, M. G. DE A.; ALVAREZ, R.; ZIMBACK, L.; CAMPANA, M. P.; SILVA, M. DE A.; VILA NOVA, J. C.; PEREIRA, A.; PERECIN, D.; GALLO, P. B.; MARTINS, A. L. M.; KANTHACK, R. A. D.; FIGUEIREDO, P.; VASCONCELOS, A. C. M. Avaliação final de clones IAC de cana-de-açúcar da serie 1982, em Latossolo Roxo da região de Ribeirão Preto. **Bragantia**, Campinas, v.58, p.269-280, 1999.

LISCUM, M., OELLER, P. AFLP: not only for fingerprinting, but for positional cloning. Disponível em: <http://carnegiedpb.stanford.edu/methods/aflp> , 10p., 2000.

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

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; VAN OOIJEN, J.W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: Overview and consequences for applications. **Genetical Research**, v.70, p.237-250, 1997.

MANCINI, M. C. Mapeamento genético e identificação de marcadores AFLP, microsatélites genômicos e funcionais associados a parâmetros agroindustriais em cana-de-açúcar. Jaboticabal. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, 98p., 2010.

MASLE, J., GILMORE, S. R., FARQUHA, G. D. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. **Nature**, v.436, p.866-870, 2005.

MILACH, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agrônômica. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.67-73 1998.

MING, R.; LIU, S. C.; MOORE, P. H.; IRVINE, J. E.; PATERSON, A. H. QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. **Genomic Research**, v.11, p.2075-2084, 2001.

MING, R.; LIU, S. C.; LIN, Y. R.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T. F.; WU, K. K.; MOORE, P. H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; IRVINE, J. E.; PATERSON, A. H. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v.150, p.1663–1682, 1998.

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

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T. G.; YANO, M.; BHATIA, C. R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v.3, p.87-103, 1997.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v.30, p.194–200, 2002.

MORGANTE, M.; SALAMINI, F. From plant genomics to breeding practice. **Current Opinion in Plant Biotechnol**, v.14, p.214-219, 2003.

MUELLER, U. G.; WOLFNBERGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v.14, n.10, p.389-394, 1999.

MURKHERJEE, S.K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanic Gas**, v.119, p.55-61, 1957.

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

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

PERECIN, D.; MARQUES, D. G.; LANDELL, M. G. A. Selo de qualidade para ensaios de melhoramento de cana-de-açúcar. **Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**. Uberlândia – MG, p.382-384, 2004.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11. Ed. Piracicaba: ESALQ, 467p., 1985.

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

PINTO, L. R.; GARCIA, A. A. F.; PATINA, M. M.; TEIXEIRA, L. H. M.; BRESSIANE, J. A.; ULIAN, E. C.; BIDOIA, M. A. P.; SOUZA, A. P. Analysis of genomic and functional RFLP derived markers associated with sucrose content, fiber and yield QTLs in a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Euphytica** DOI 10.1007/s10681-009-9988-2, 2009.

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

RAM ,B.; HEMAPRABHA, G. Genetic variance for five traits in 12 hybrid groups of *Saccharum* sp. hybrids. **Sugar Cane**, v.3, p.9-12, 1998.

RESENDE, M. D. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Embrapa Informacao Tecnológica: Brasília, 975p, 2002.

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. **Molecular Genetics and Genomics**, v.269, p.406-419, 2003.

SAS - **SAS Institute Inc.** Procedures guide, version 6, 3rd edn. Sas Institute Inc, Cary, North Carolina, USA, 1990.

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

SILVA, M.A. **Época de amostragem na seleção e qualidade tecnológica de clones de cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado), Curso de Pós Graduação em Fitotecnia, UNESP, Botucatu, 159p, 1996.

SKINNER, J.C. Selection in sugarcane: a review. **Proc Int Soc Sugarcane Technology**, v.12, p.938-949, 1972.

SKINNER, J.C.; HOGARTH, D. M.; WU, K. K. **Selection methods, criteria, and indices**, In: Sugarcane improvement through breeding. HEINZ, D. J. (Ed) Elsevier Press, Amsterdam, p.409-454, 1987.

SOUZA JÚNIOR, C. L. **Melhoramento de espécies de reprodução vegetativa.** Piracicaba: ESALQ, Departamento de Genética, p.41, 1995. (Publicação Didática).

STEVENSON, G.C. Genetics and breeding of sugarcane. London, Longmans. 284p, 1995.

SOUZA JÚNIOR, C. L. **Componentes da variância genética e suas implicações no melhoramento vegetal.** Piracicaba: FEALQ, 134p., 1989.

SOUZA, H. M. B. **Mapeamento genético de híbridos comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utilizando marcadores moleculares do tipo**

microssatélite. Piracicaba. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 85p., 2003.

STEVENSON, G. C. Genetics and breeding of sugarcane. **Longmans**, London, p.284, 1965.

TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. **Genome Research**, v.11, p.1441–1452, 2001.

THAMARUS, K. A.; GROOM, K.; MURRELL, J.; BYRNE, M.; MORAN, G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical Applied Genetics**, v.104, p.379-387, 2002.

TYAGI, A. P.; LAL, P. Correlation and path coefficient analysis in sugarcane. **South Pacific Journal Natural Science**, v.1, p.1-10, 2007.

UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. Disponível em www.unica.com.br
Acesso em 09 outubro 2009.

VAN OOIJEN, J. W.; VOORRIPS, R. E. JoinMap version 3.0 Software for the calculation of genetics linkage maps. **Plant Research International**, Wageningen, The Netherlands, 2001.

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

WU, K. K.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; TEW, T. L.; MOORE, P. H.; TANKSLEY, S. D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-

dose restriction fragments. **Theoretical and Applied Genetics**, 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.

YOUNG, N.D. **Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers**. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. DNA: based markers in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p.31-47, 1994.

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

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol**, v.11, p.1–16, 2002.

8. ANEXO

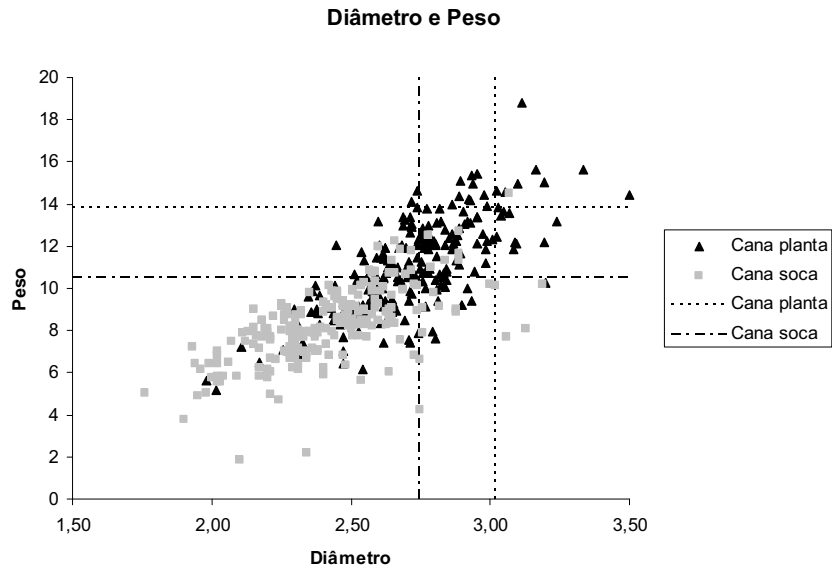


Figura 8. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e peso do colmo em cana planta e cana soca.

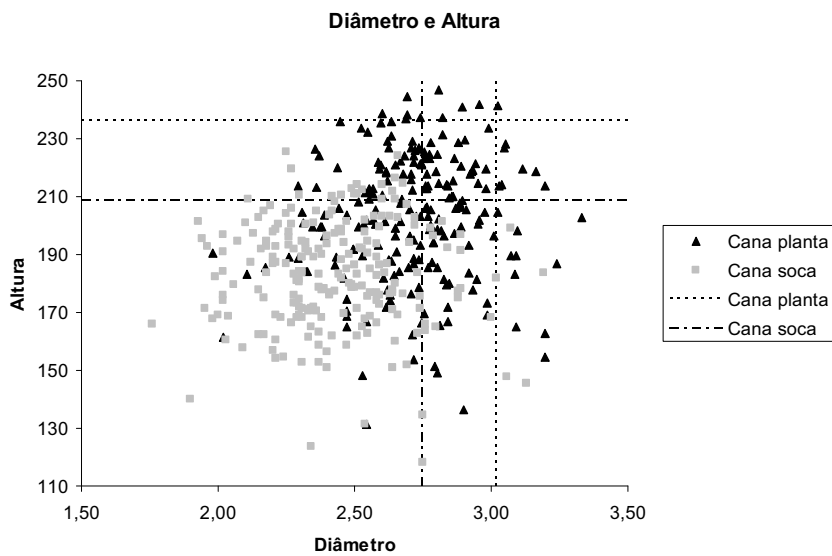


Figura 9. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e altura do colmo em cana planta e cana soca.

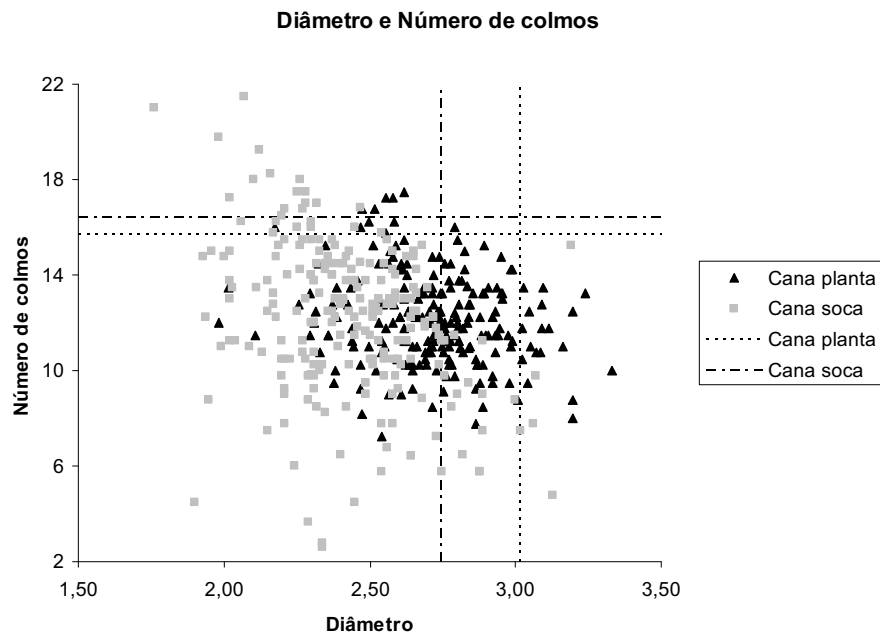


Figura 10. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e número de colmo em cana planta e cana soca.

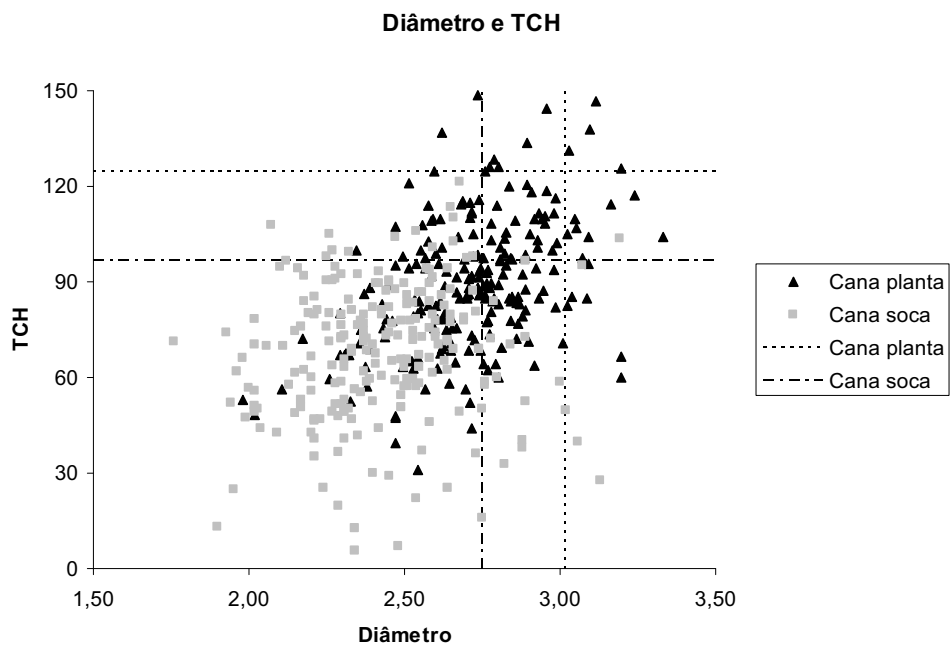


Figura 11. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e TCH em cana planta e cana soca.

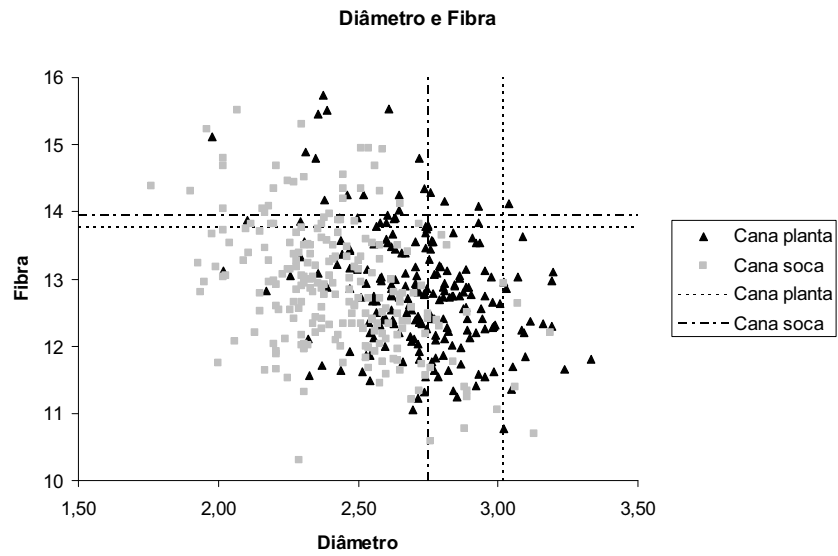


Figura 12. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e Fibra em cana planta e cana soca.

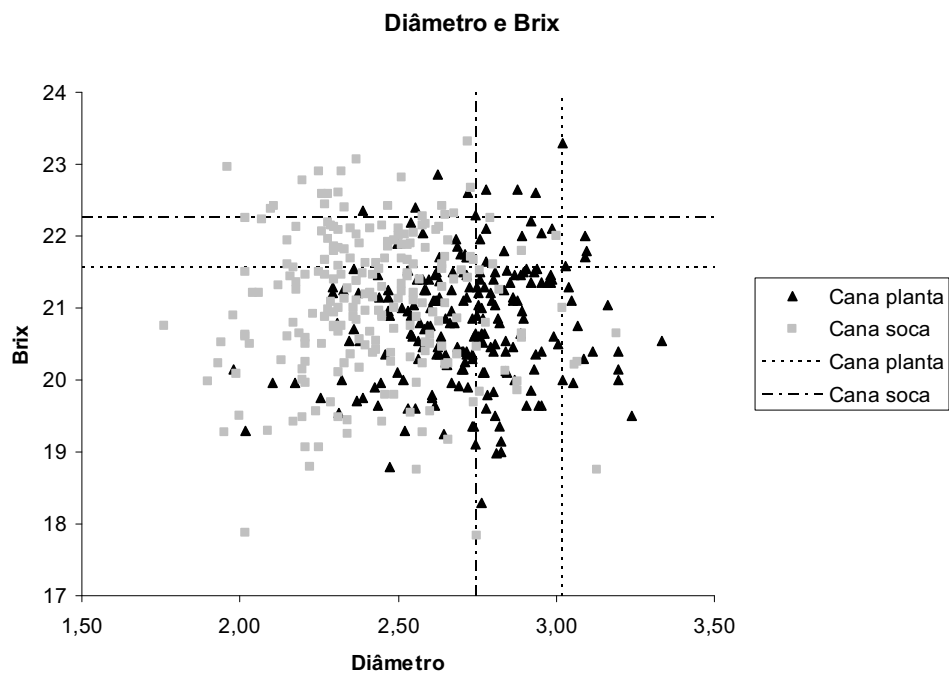


Figura 13. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e Brix em cana planta e cana soca.

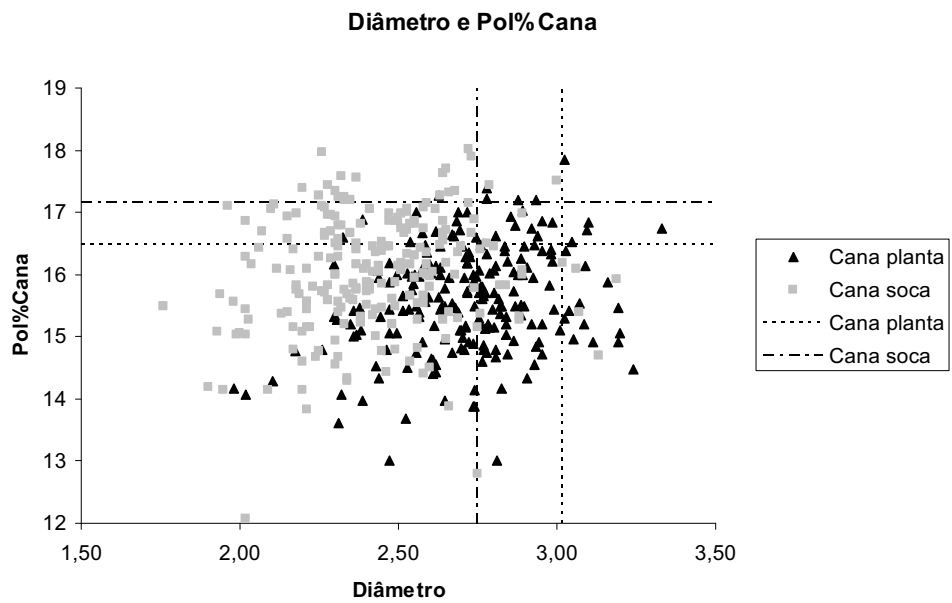


Figura 14. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre diâmetro e Pol%Cana em cana planta e cana soca.

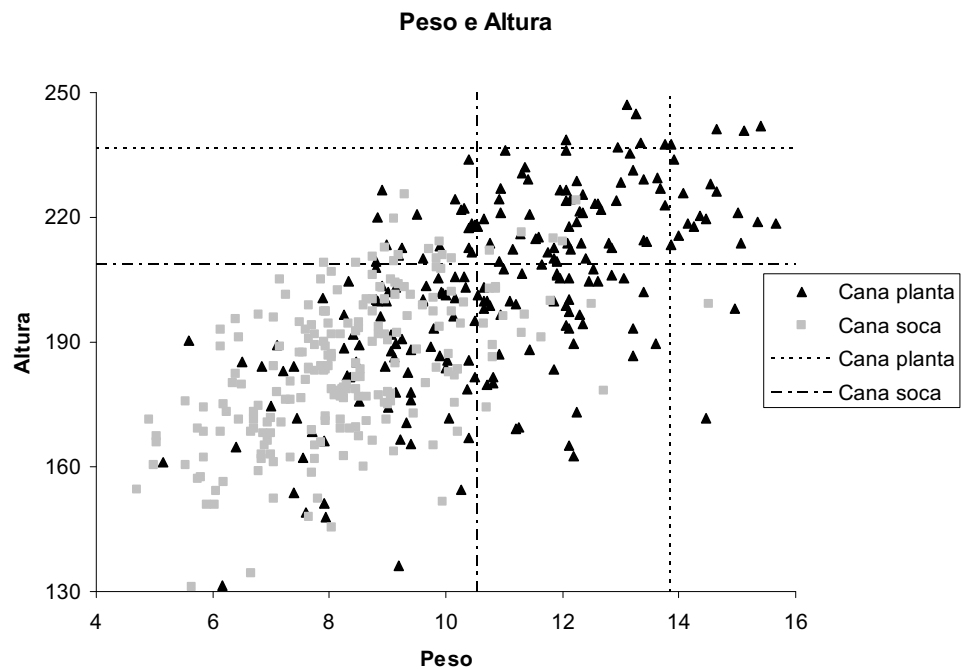


Figura 15. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e altura do colmo em cana planta e cana soca.

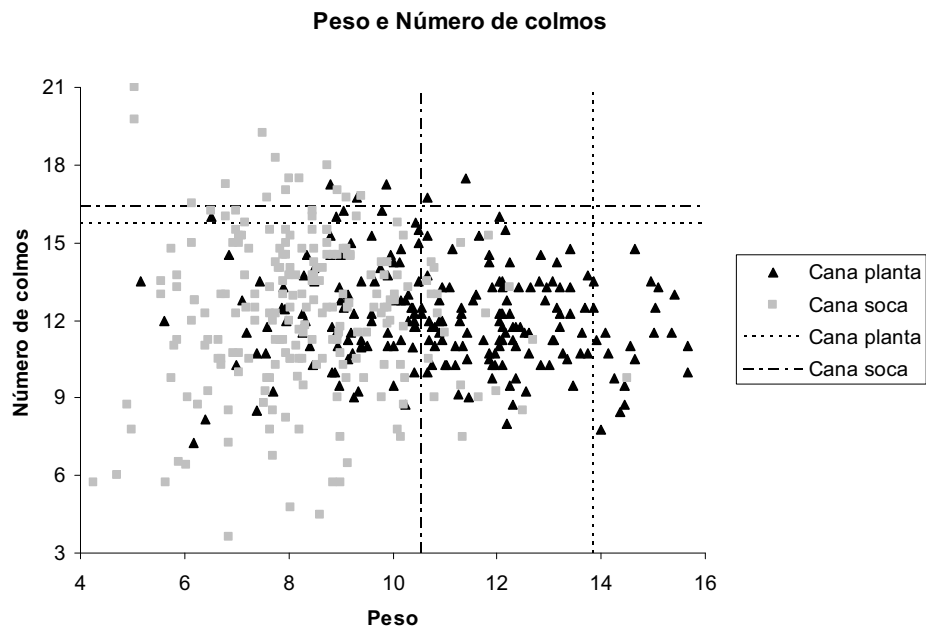


Figura 16. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e número de colmos em cana planta e cana soca.

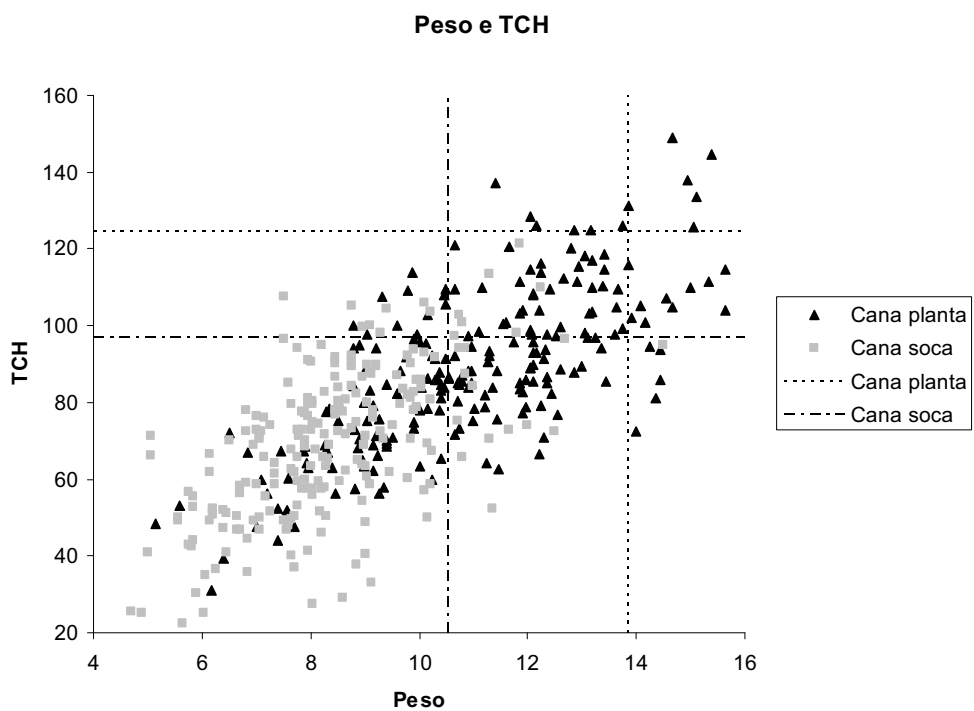


Figura 17. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e TCH em cana planta e cana soca.

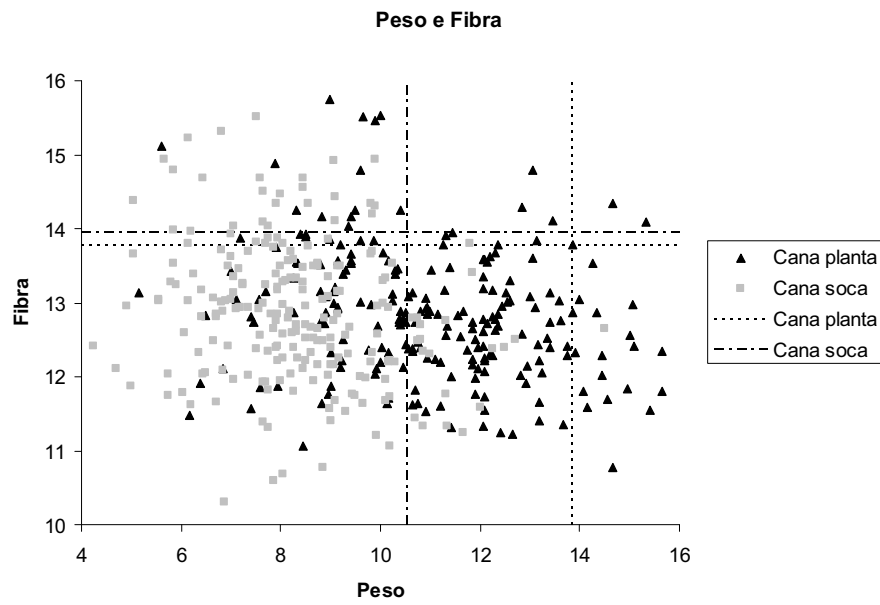


Figura 18. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e Fibra em cana planta e cana soca.

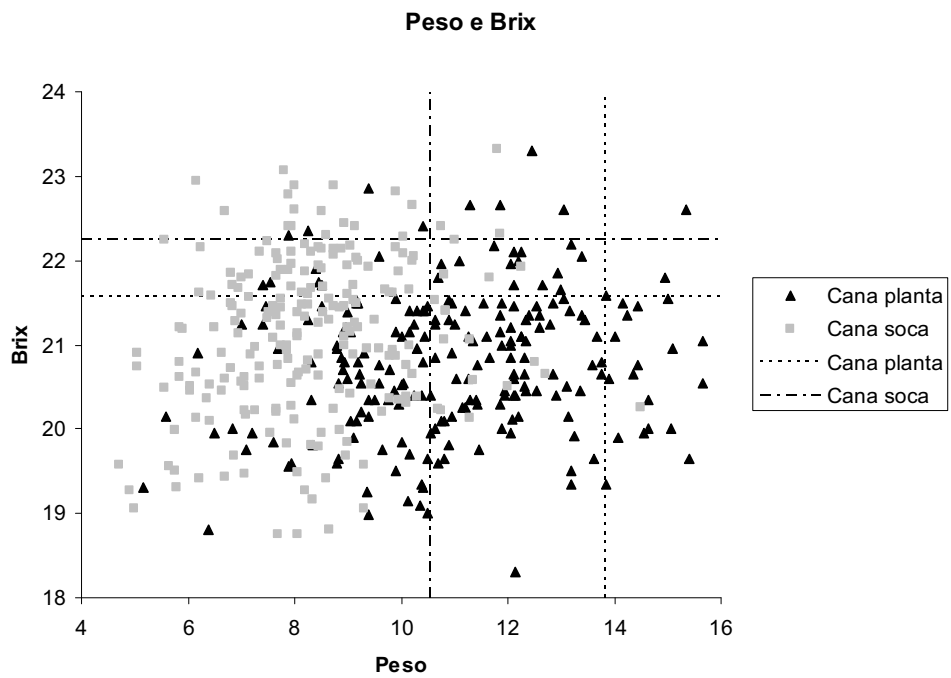


Figura 19. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e Brix em cana planta e cana soca.

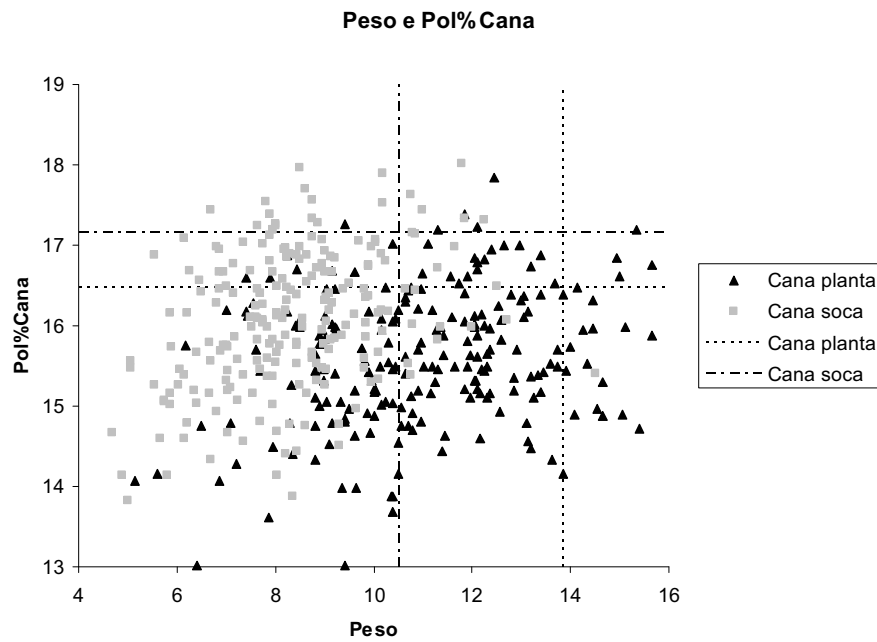


Figura 20. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre peso e Pol%Cana em cana planta e cana soca.

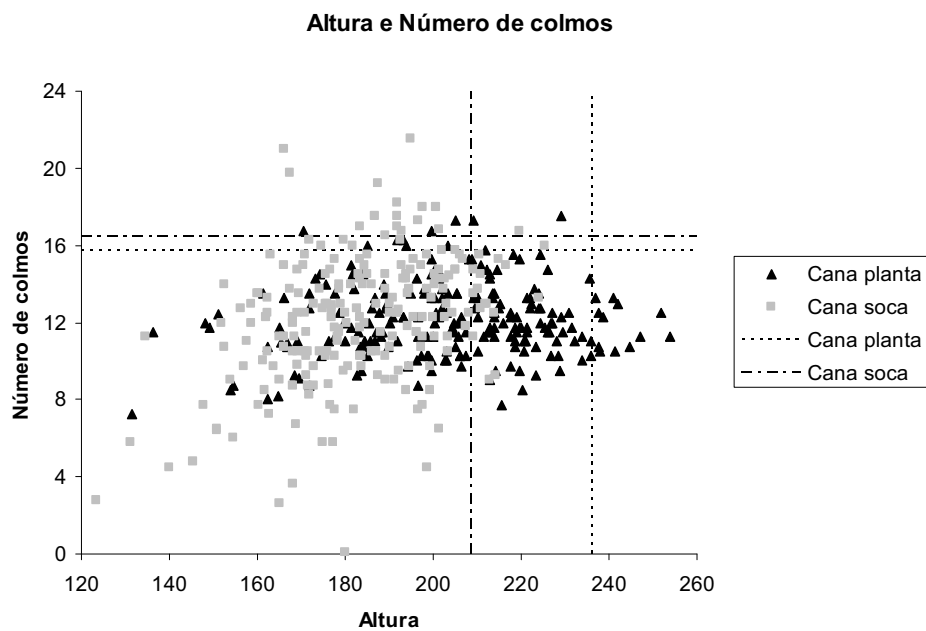


Figura 21. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e número de colmos em cana planta e cana soca.

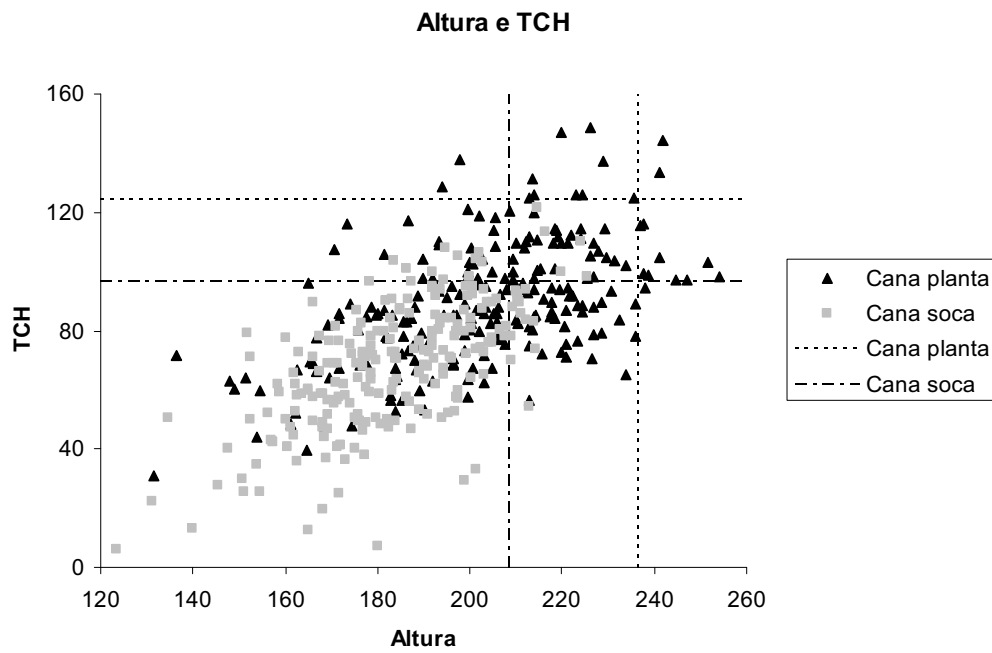


Figura 22. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e TCH em cana planta e cana soca.

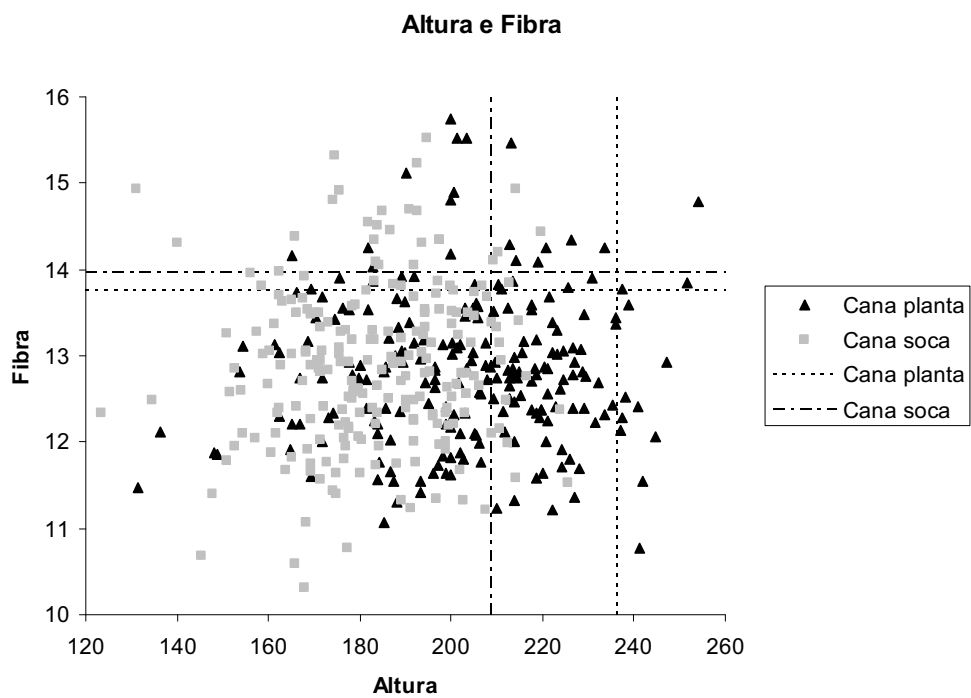


Figura 23. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e Fibra em cana planta e cana soca.

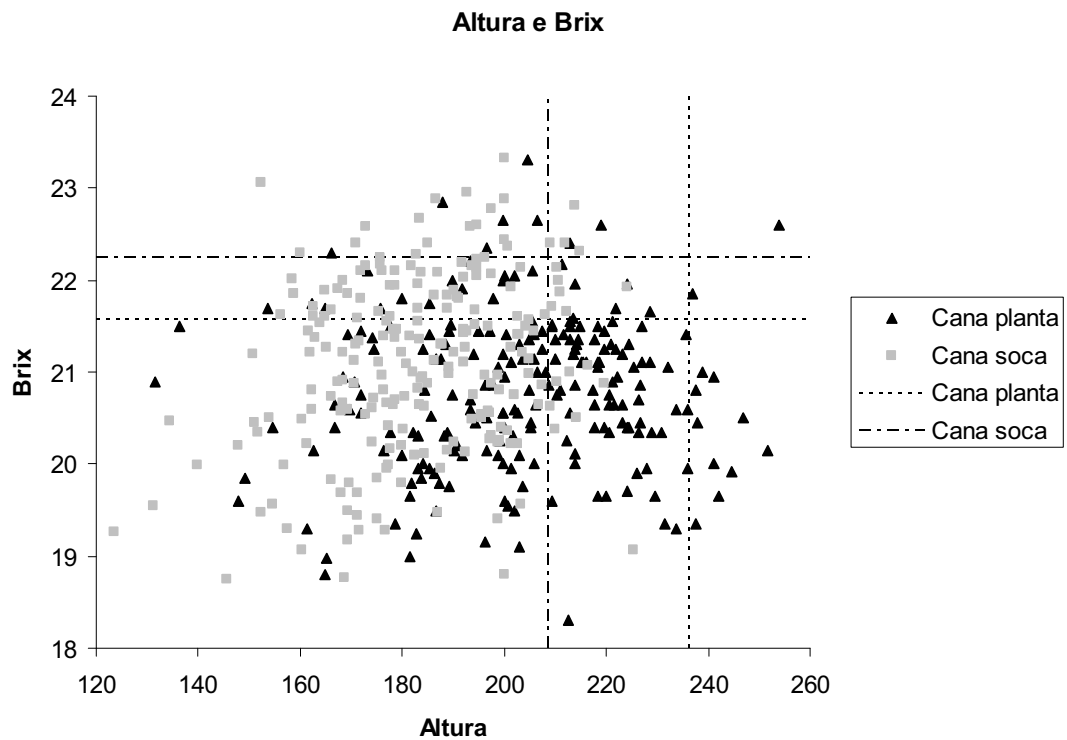


Figura 24. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e Brix em cana planta e cana soca.

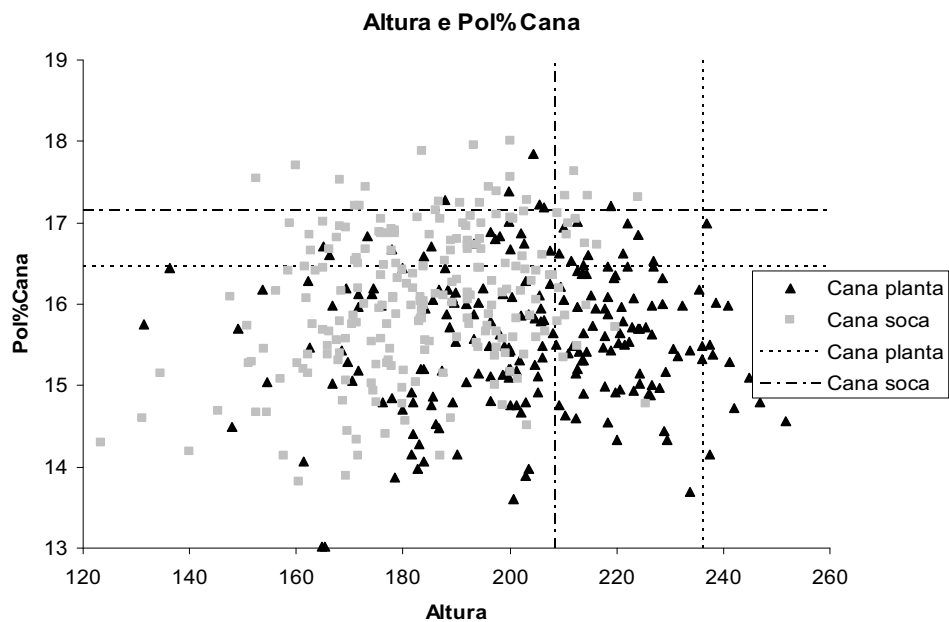


Figura 25. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre altura e Pol%Cana em cana planta e cana soca.

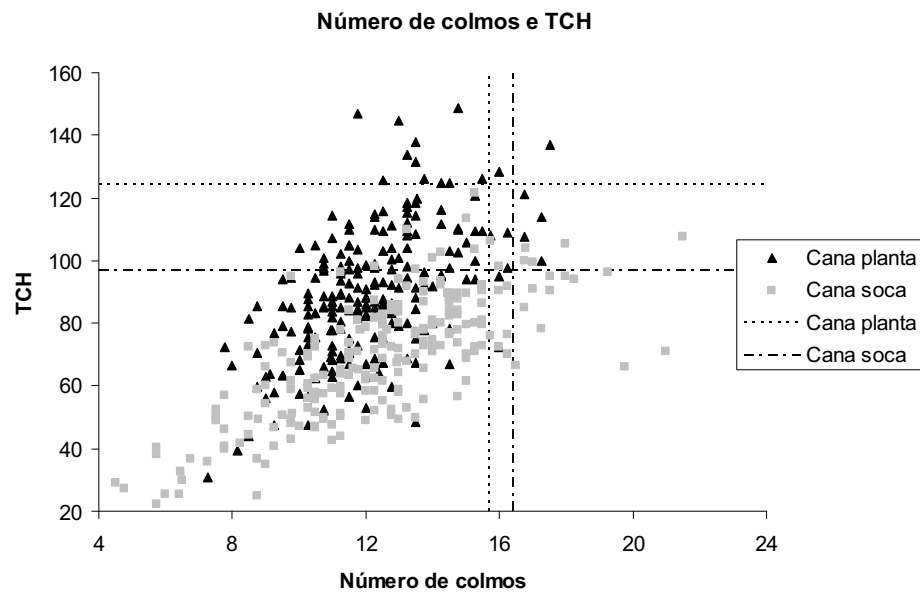


Figura 26. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e TCH em cana planta e cana soca.

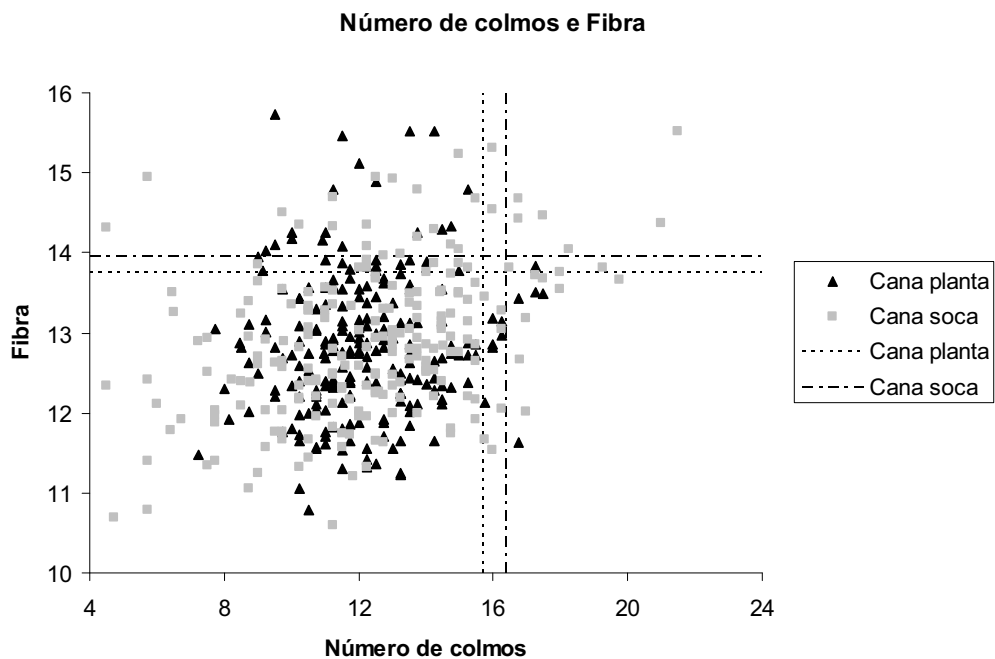


Figura 27. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e Fibra em cana planta e cana soca.

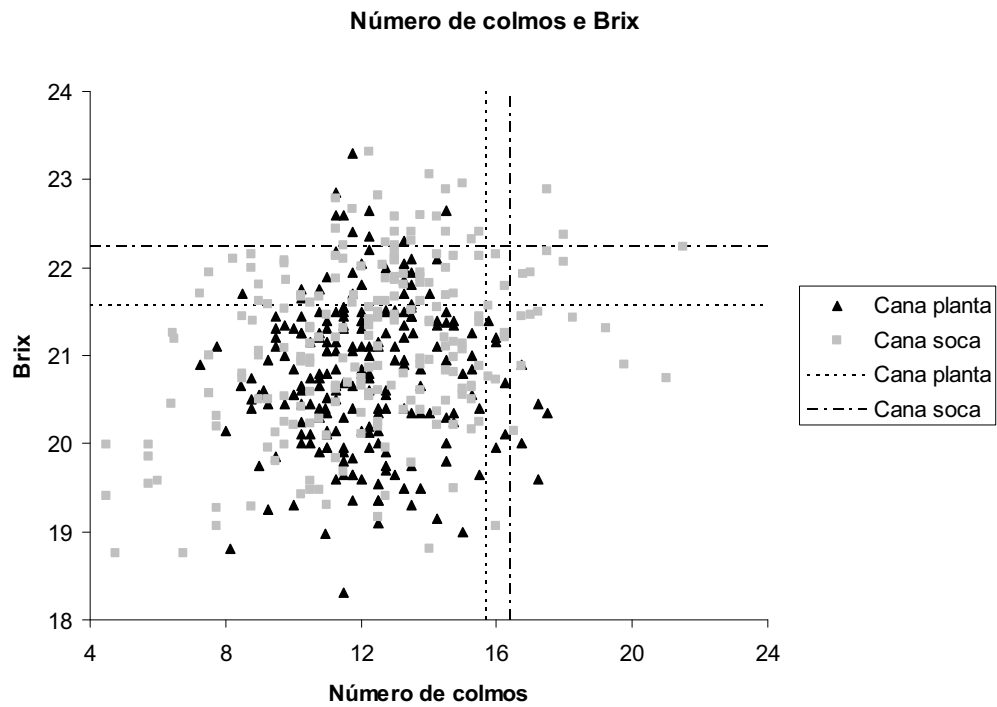


Figura 28. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e Brix em cana planta e cana soca.

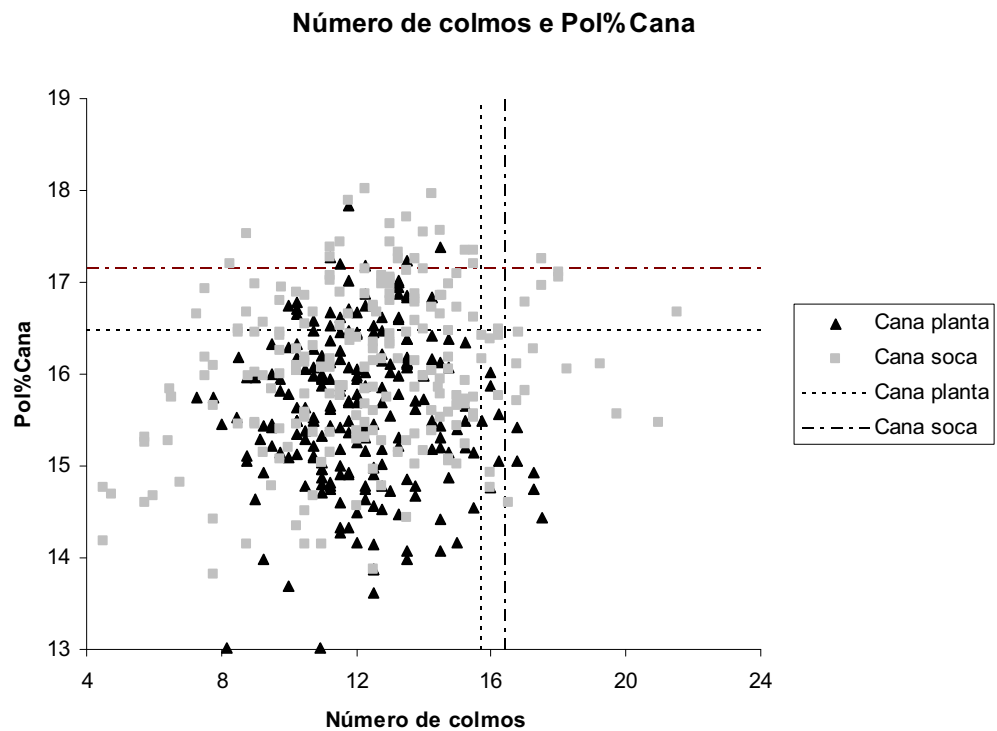


Figura 29. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre número de colmos e Pol%Cana em cana planta e cana soca.

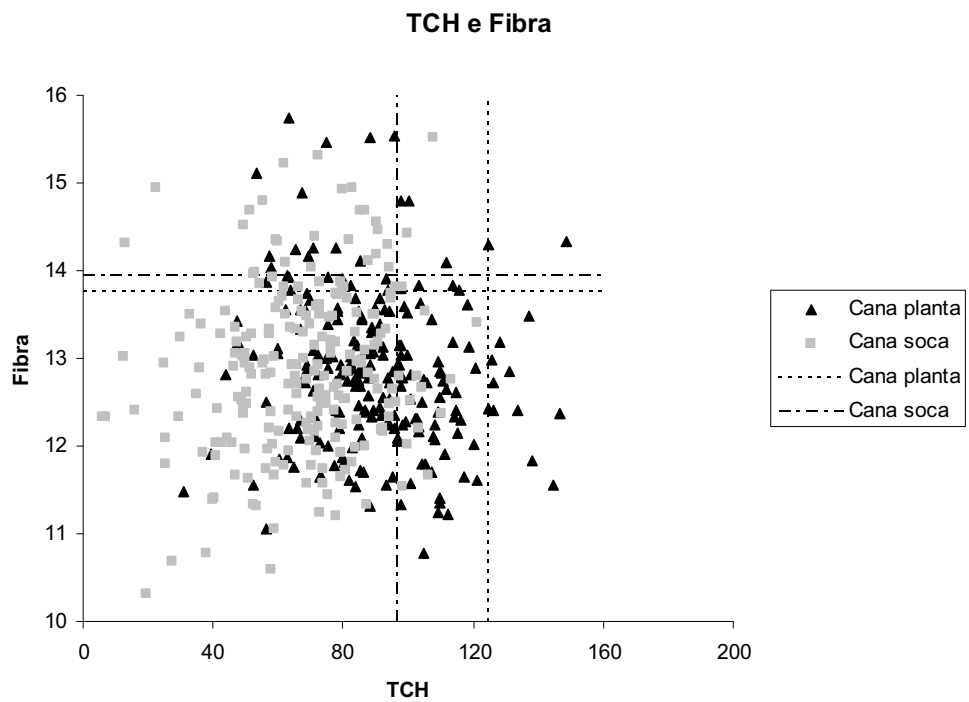


Figura 30. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre TCH e Fibra em cana planta e cana soca.

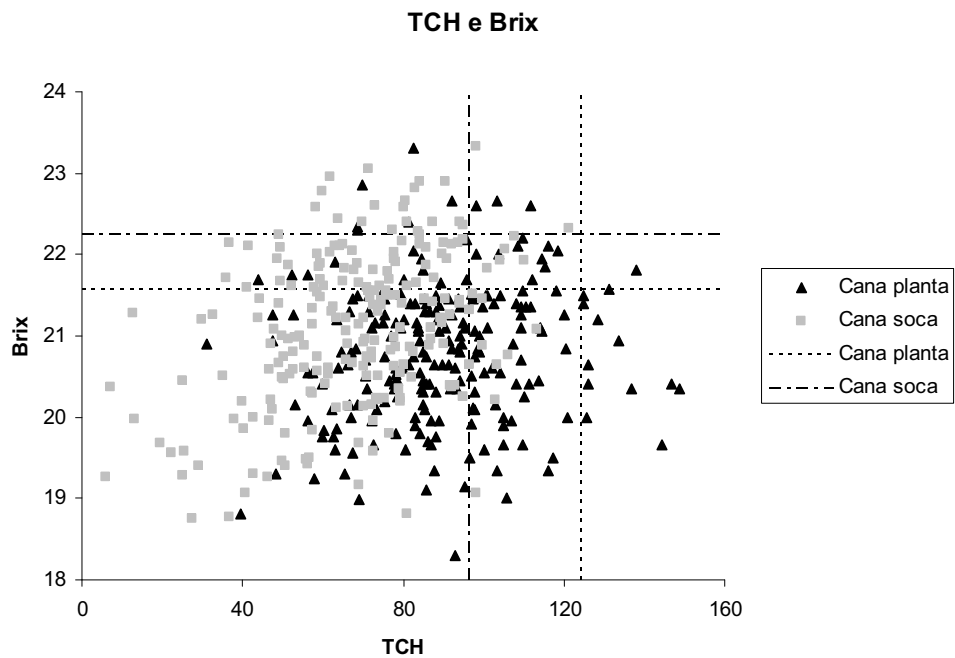


Figura 31. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre TCH e Brix em cana planta e cana soca.

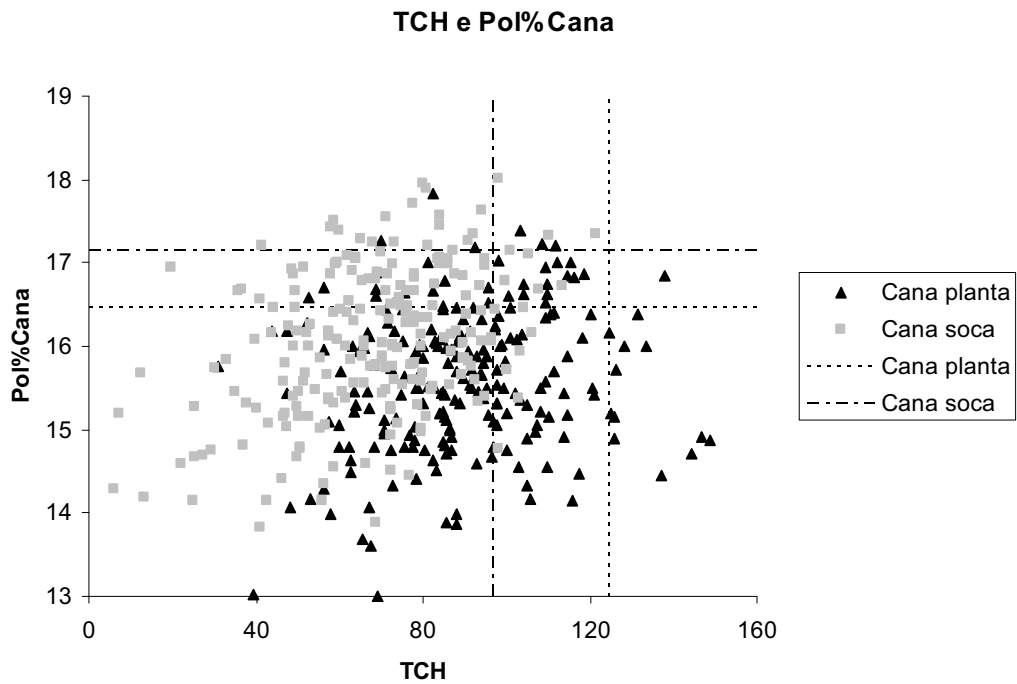


Figura 32. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre TCH e Pol%Cana em cana planta e cana soca.

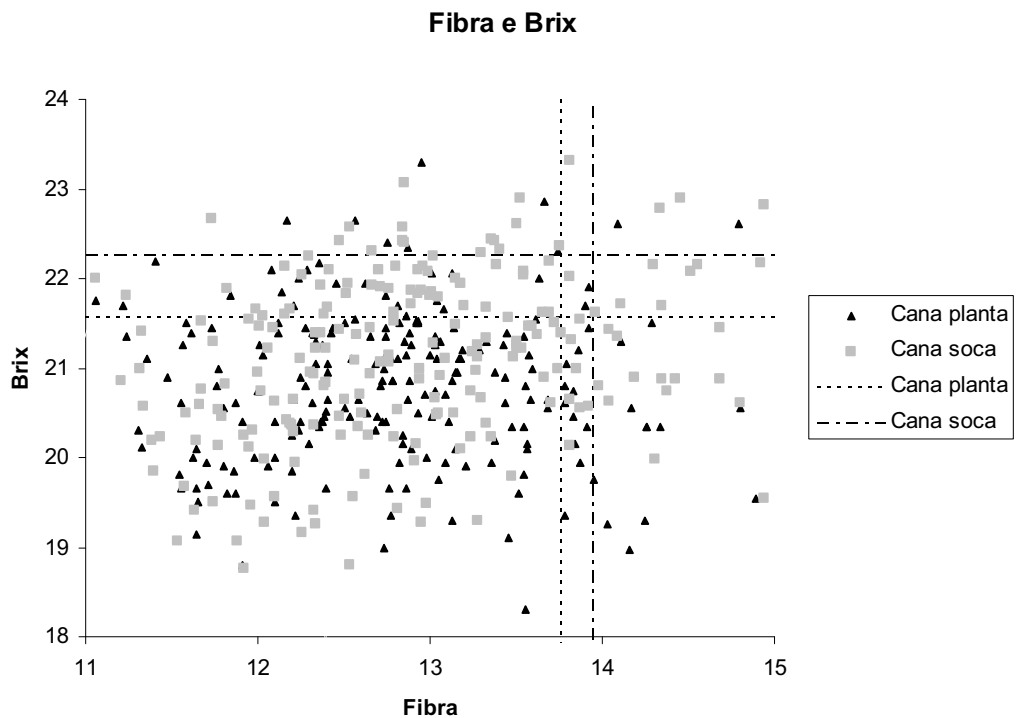


Figura 33. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre Fibra e Brix em cana planta e cana soca.

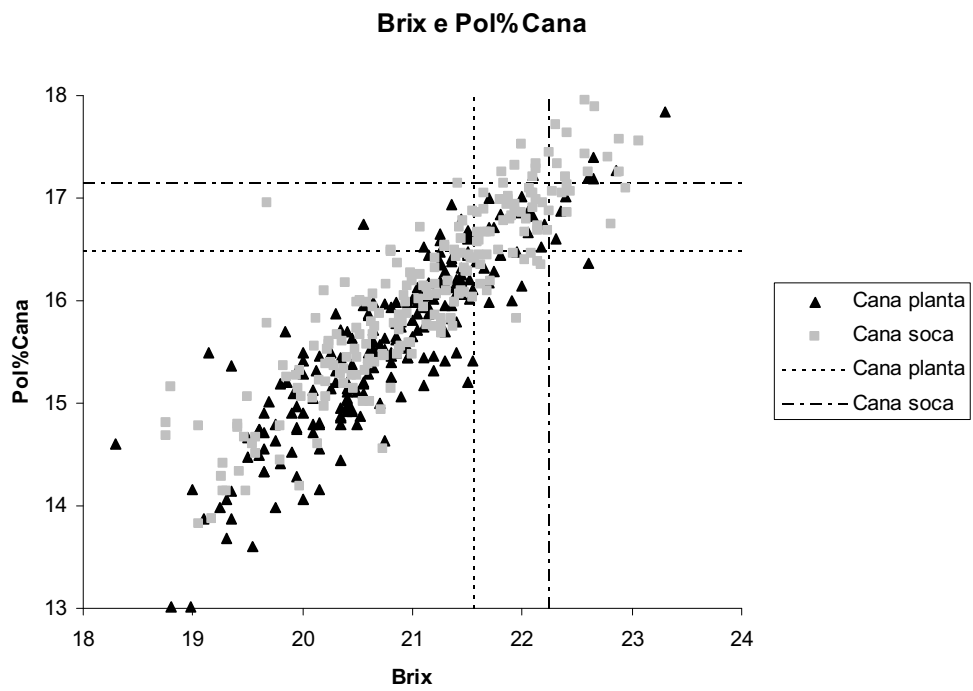


Figura 34. Estimativa de dispersão das médias individuais dos 220 clones de cana-de-açúcar entre Brix e Pol%Cana em cana planta e cana soca.