

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/51904

IB/ 81866

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Andréia Navarro Meza

Construção de um mapa genético para híbridos interespecíficos de variedades comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) empregando-se marcadores moleculares do tipo RFLP.

Orientadora: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto F. Garcia

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
<i>Andréia Navarro Meza</i>
<i>[Signature]</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

UNIDADE	IB/33846
Nº CHAMADA	1000-
	17
V	EX
TOMBO BC/	51909
PROCC.	
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	
DATA	
Nº CPD	

CMC0177087-B

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

M579c **Meza, Andréia Navarro**
 Construção de um mapa genético para híbridos interespecíficos de variedades comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) empregando-se marcadores moleculares do tipo RFLP/Andréia Navarro Meza.--
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Anete Pereira de Souza
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

I. Mapa genético. 2. Cana-de-açúcar. 3. Marcador molecular RFLP. I. Souza, Anete Pereira de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 III. Título

Campinas, 21 de outubro de 2002.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)

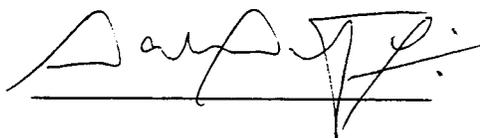


Prof. Dr. Laurent Grivet



Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



"Construção de um mapa genético para híbridos
interespecíficos de Variedades Comerciais de
cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) empregando-se
marcadores moleculares do tipo RFLP"

Andréia Navarro Meza

Campinas
Estado de São Paulo
Outubro, 2002

A ciência é constituída de fatos, assim como uma casa é construída com tijolos, mas um conjunto de fatos não é uma ciência, da mesma forma que um amontoado de tijolos não é uma casa.

Henri Poincaré

Dedico:

As pessoas mais importantes da minha vida:

Minha filha, Luiza Navarro Gibbin (*in memoriam*) por me ensinar a valorizar a vida e as pessoas, despertando em mim o amor e a coragem necessária para continuar a viver.

Meu querido pai, Salvador Meza Navarro (*in memoriam*), pelo olhar de aprovação e reprovação, ora doce ora enérgico, que foram essenciais para a formação do meu caráter.

Minha super mãe, Josefina, por ser sempre meu porto seguro em todas as tempestades.

Meus irmãos, Adriana e Aldo, por aceitarem integralmente o que sou.

Meu sobrinho, Mateus, pela esperança.
Seja Bem-Vindo!

Agradeço:

À minha orientadora, Prof. Dra. Anete Pereira de Souza, por esclarecer as dúvidas mais básicas com paciência e dedicação, mostrando que o rigor pode direcionar-nos em momentos de incertezas.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia, por apresentar-me a estatística como aliada e não como inimiga, mostrando-se sempre generoso e disposto a ajudar-me.

Aos professores participantes da pré-banca: Dr. Eugênio Cesar Ulian (Centro de Tecnologia Copersucar), Profa. Dra. Maria Elisa Ayres Guidetti Zagatto Paterniani (Instituto Agrônomo de Campinas) e Dr. Laurent Grivet (CBMEG/UNICAMP), pela análise da tese e comentários construtivos, além da compreensão e gentileza.

Aos professores participantes da banca de minha tese: Dr. Laurent Grivet (CBMEG/UNICAMP) e Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko e Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (CBMEG/UNICAMP), pela análise deste trabalho e tempo despendido.

Ao idealizador do projeto, Dr. Jorge Alberto Gonçalves da Silva (A&M Texas University), por confiar em meu trabalho.

Aos funcionários: Juverlande e Zildinha, pela ajuda herculana e imenso carinho que me deram nesses anos de convivência.

Aos técnicos que passaram por este laboratório sempre sendo prestativos e que se tornaram amigos queridos: Andreza, Zildene, Marcus e Aline.

À Cynthia Sara (aluna de Iniciação Científica- CBMEG/UNICAMP), pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, por mostrar serenidade quando tudo parecia perdido e pela sincera amizade.

Aos meus amados amigos: Angêla, Alexandre, Eliete, Andrea Rici, e ao meu carma Sibov, por serem indispensáveis na minha vida.

Aos Smolbnetianos mais que queridos (Lab. de Análise Genética e Molecular - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG/ UNICAMP): Débora (pau pra toda obra), Susy (paciência), Cleide (identificação), Adriano e Luciana Kauer.

Ao pessoal de Marcadores Moleculares (Lab. de Análise Genética e Molecular - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG/ UNICAMP): Claudete (carinho

eterno), Karine (florzinha), Priandinha, Fabíola, Milena, Luciana Rossini e Luciana Benchimol, pela sempre alegre convivência.

À prima Beth que proporcionou-me, de tantas formas, conhecer além dos muros da minha casa.

Ao pessoal da B2 (moradia/1996-1998): Júlio, Helaine, Arnaldo, Gustavo e Melchor por toda alegria.

À Turma Bio/94N, em especial à Cinthia, Maristela, Graziela, Renata, Brígida, Daniel e Fabiano.

Aos funcionários e estagiários que estão ou passaram pela Copersucar, por serem receptivos e carinhosos.

À Carlos Cais por me ajudar a buscar o equilíbrio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 0/05718-7) pelas bolsas MSI e MSII concedidas e auxílios financeiros, ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/CNPQ, 620020/99-7), pelo financiamento de parte da pesquisa desenvolvida e ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP/Pró-Reitoria de Pesquisa-UNICAMP, 0901/02) pela bolsa Auxílio Ponte que foi fundamental para a finalização da Dissertação de Mestrado aqui apresentada.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse concretizado, seja com suor ou com um simples sorriso.

Sumário

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura	4
2.1 Aspectos Gerais e Importância Econômica da Cultura da Cana-de-Açúcar	4
2.2 Sistemática e Evolução do Gênero <i>Saccharum ssp.</i>	7
2.2.1 Classificação Taxonômica	8
2.2.2 Características da Espécies <i>Saccharum ssp.</i>	8
2.2.3 Complexo <i>Saccharum</i>	13
2.3 Características Citológicas	13
2.3.1 Número Cromossômico em <i>Saccharum spp.</i>	14
2.3.2 Nobilitação.....	16
2.4 Marcadores Moleculares	19
2.4.1 Mapas Genéticos	23
2.4.2 Poliplóides	26
2.4.3 Detecção de Polimorfismo em Poliplóides	28
3 Objetivo	35
4 Artigo	36
5 Conclusões	83
6 Perspectivas	85
7 Referências Bibliográficas.....	86
Resultados Complementares.....	97

Lista de Figuras

2. Revisão de Literatura

Figura 1. Esquema da transmissão dos cromossomos no processo de nobilização em cruzamento envolvendo *S. officinarum* ($2n=80$), como genitor feminino, e *S. spontaneum* ($2n=64$).....18

Figura 2. Esquema ilustrando a distribuição dos alelos A e B, pertencentes ao mesmo loco, entre os gametas formados por cada um dos genitores (P_1 e P_2) e possíveis genótipos observados entre os descendentes F_1 do cruzamento. O alelo A é representado como cópia única entre os cromossomos homólogos no genitor P_1 . Considerando o pareamento de bivalentes na meiose, haverá somente formação de dois tipos de gametas: um tipo de gameta contendo o alelo A e o outro não apresentando este alelo. No caso do genitor P_2 , o alelo A não está presente, resultando em formação de gametas sem este alelo em seu genótipo. O alelo B está em doses múltiplas e presente na constituição genômica dos dois tipos de gametas formados pelos dois genitores. Baseando-se no encontro aleatório dos possíveis gametas originados na meiose por cada um dos pais, em F_1 estão representados os possíveis genótipos da progênie originada. Os gametas do genitor P_2 combinam-se de duas formas diferentes: com um gameta do P_1 que contém o alelo A ou um gameta sem a presença deste alelo. Dessa forma, espera-se que metade dos indivíduos formados pela união desses gametas tenham o alelo A e a outra metade não. A relação esperada para um alelo em dosagem única no genoma, obedece portanto a relação 1:1. O alelo B está em dosagens variadas no genoma, possuindo um padrão de segregação mais complexo29

Figura 3. Esquema ilustrando a distribuição dos alelos A e B, pertencentes ao mesmo loco, entre os gametas formados por cada um dos genitores (P_1 e P_2) e possíveis genótipos observados entre os descendentes F_1 do cruzamento. O alelo A é representado como cópia única entre os cromossomos homólogos tanto no genitor P_1 como no genitor P_2 . Baseando-se em pareamento de bivalentes na meiose, haverá somente formação de dois tipos de gametas para os genótipos representados por esses genitores: um tipo de gameta contendo o alelo A e o outro não apresentando este alelo. Considerando os gametas formados por cada genitor analisado, metade dos gametas provenientes do P_1 possui o alelo A e a outra metade dos gametas não tem esse alelo representado. Situação semelhante é observada para P_2 . Verificando-se os possíveis genótipos formados para a progênie F_1 de um cruzamento deste tipo, constata-se que o alelo A, estará presente na proporção de 3:1 indivíduos. Assim, quando se observa um fragmento monomórfico entre os genitores com segregação 3:1 entre os indivíduos da progênie F_1 , o alelo será considerado em dose única e será utilizado para a construção do mapa. O alelo B está em dosagens variadas no genoma, possuindo um padrão de segregação mais complexo e de difícil análise.....31

4 Artigo

Figura 1. Comportamento de sondas SG em combinação com as enzimas *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* e *XbaI*. Ausência Polimorfismo, representa a porcentagem referente às 28 sondas que não demonstraram nenhum fragmento polimórfico entre os genitores. *DraI* (15), *EcoRI* (14), *EcoRV* (11) e *XbaI* (15), representam a proporção de sondas que geraram os melhores resultados com cada uma destas enzimas. Os números entre parentêses representam as quantidades de sondas para as quais foram utilizadas cada uma das enzimas.....48

Figura 2. Número de marcadores detectados no mapeamento de uma população F_1 derivada do cruzamento entre duas variedades comerciais. MDRF, indica número de marcadores em doses

múltiplas no genoma. SDRF, número de marcadores em dose simples. *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* e *XbaI*, enzimas utilizadas na hibridização com sondas SG geradoras de marcadores MDRF e SDRF.....50

Figura 3. Mapa genético de ligação obtido a partir da análise da progênie F₁ do cruzamento entre as variedades comerciais de cana-de-açúcar SP80-180 e SP80-4966. Este mapa foi obtido a partir da análise de 189 marcadores SDRFs, utilizando-se "Lod Score" 3 e frequência de recombinação 0,5. Houve formação de 33 grupos pela ligação envolvendo 72 marcadores. Destes grupos, 27 foram reagrupados em 7 prováveis grupos homólogos. Cento e dezessete marcadores permaneceram não ligados a nenhum outro marcador.....55

Resultados Complementares

Figura 1. Padrão de fragmentos provenientes da combinação sonda SG021/enzima *Dra I* para os genitores e 14 indivíduos da progênie F₁ digeridos com a enzima *Dra I*. É possível verificar a segregação de cada um dos marcadores nos indivíduos F₁. Os marcadores A, C, D, E, F e H são polimórficos entre os genitores. Os marcadores B e G apresentam-se monomórficos entre os genitores.....98

Figura 2. Autoradiografia mostrando o perfil de marcadores RFLP para 100 indivíduos da população proveniente do cruzamento entre duas variedades utilizadas como genitores. P₁ e P₂, representam os genitores SP80-180 e SP80-4966 e os números 1-100 correspondem aos indivíduos F₁ da progênie utilizada. A genotipagem desses indivíduos foi realizada com a combinação sonda SG011/enzima *Eco RI*. Os marcadores A, B, C, D, E e F são marcadores presentes em dose única no genoma (SDRF).....102

Lista de Tabelas

2. Revisão da Literatura

Tabela 1. Números de cromossomos envolvendo o gênero <i>Saccharum spp.</i>	16
--	----

4 Artigo

Tabela 1. Detalhamento das características dos marcadores encontrados nas hibridizações envolvendo cada uma das combinações sonda/enzima utilizadas.....	54
--	----

Tabela 2. Marcadores que não puderam ser ordenados.....	61
---	----

Tabela 3. Relações entre as sondas SG utilizadas em trabalhos de mapeamentos para genótipos de espécies do gênero <i>Saccharum spp.</i>	72
---	----

Resultados Complementares

Tabela. 1 Apresentação dos dados obtidos da análise de dosagem de marcadores gerados pela combinação de 56 sondas/enzimas previamente selecionadas.....	99
---	----

Tabela 2. Resultado da análise de 99 marcadores para segregação na proporção 1:1, quanto à significância à 5% e 1%, pelo teste de χ^2	100
--	-----

Tabela 3. Resultado da análise de 64 marcadores para segregação na proporção 3:1, quanto à significância à 5% e 1%, pelo teste de χ^2	100
--	-----

Resumo

Marcadores moleculares são utilizados como uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genéticos de plantas. Entre as diferentes aplicações dos marcadores, está a construção de mapas genéticos, os quais possibilitam a aquisição de informações importantes sobre uma espécie estudada, auxiliando os programas de melhoramento. Um exemplo importante de aplicação é o mapeamento de QTL's.

Considerando a importância econômica da cultura e a inexistência de um mapa genético oriundo de cruzamento entre variedades comerciais de cana-de-açúcar, o presente trabalho apresenta um estudo utilizando 189 marcadores RFLP em dose simples no genoma (SDRFs) provenientes de 55 combinações diferentes de sonda genômica/enzima de restrição em uma população de mapeamento F_1 , sendo esta proveniente do cruzamento entre duas variedades comerciais de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos), denominadas SP80-180 e SP80-4966. Com estes marcadores foi gerado um mapa genético de 480 cM com 33 grupos de ligação envolvendo 72 marcadores, sendo que 117 marcadores permaneceram não ligados. A utilização de vários marcadores provenientes de uma mesma sonda mostra-se eficiente na identificação de grupos homólogos, apresentando resultados satisfatórios para a cobertura vertical do genoma de cana-de-açúcar. Entretanto, uma vez que o número de cromossomos da cana-de-açúcar é elevado, variando de 80 a 130 marcadores, marcadores com essa característica fornecem uma baixa cobertura horizontal do genoma, pois o mapeamento enfoca apenas as regiões cosegregantes. Em híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar, a coexistência de alelos simples e múltiplos e a presença de número de cromossomos irregular, resultado da aneuploidia nos genitores, dificultam a interpretação correta das classes homólogas.

O mapa construído representa uma estrutura básica inicial para o mapeamento com outros tipos de marcadores, como AFLP e microssatélites, visando a sua saturação. Tal procedimento será necessário para o mapeamento de características quantitativas e qualitativas de interesse agrônômico em cana-de-açúcar.

Abstract

Molecular markers are used as a fast and efficient tool for genetic studies in plants. Among several uses of markers, one is the construction of genetic maps, which enables acquisition of important information about specific species and the improvement of breeding programs.

This study was performed considering the economic importance of sugarcane and the lack of a genetic map for commercial varieties of sugarcane. This information could be used in QTL mapping. It presents a genetic map with 189 RFLP markers generated from 55 genomic probes and restriction enzyme combinations. The F₁ mapping population was obtained by interbreeding two different commercial varieties.

The genetic map length is 480cM with 72 markers in 33 linkage groups, with 117 no linkage. The use of several markers from the same probe resulted in a low genome coverage. However, since sugarcane chromosome number is high, ranging from 100-130, the results shown are acceptable. The study was efficient in the identifications of homologous groups. The coexistence of simple and multiple alleles and the presence of irregular chromosome number due to aneuploid, made a correct interpretation of homologous classes difficult.

This genetic linkage map represents a basic foundation for a saturated map using other types of molecular markers, such as AFLPs and SSRs, and posterior mapping of quantitative and qualitative traits of sugarcane.

1. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) está entre as mais importantes espécies cultivadas. É a principal fonte de sacarose, além de possibilitar a extração e utilização de inúmeros subprodutos a partir do bagaço e caldo obtidos no seu processamento.

O Brasil encontra-se na posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, exportando cerca de 39% de sua produção (Matsuoka, 1999a). Apesar da posição de destaque em nossa economia, este produto enfrenta oscilações de preço no mercado internacional, influenciado diretamente pela oferta de açúcar de beterraba (produzida principalmente na Europa), que representa 35% da produção mundial de açúcar (Hoarau, 2000).

Os países desenvolvidos, produtores de açúcar de beterraba, já recorrem às mais modernas tecnologias em busca do aumento de sua produção e na tentativa de domínio do mercado. Dessa forma, a competição internacional no setor sucro-alcooleiro torna-se crescente a cada ano, e o Brasil necessita de maiores investimentos em tecnologias que resultem no aumento de produtividade na indústria açucareira, visando manter sua capacidade produtiva e competitiva. Outro aspecto a considerar é a importância do álcool, proveniente da cana-de-açúcar, usado como combustível alternativo ao petróleo, sendo utilizado em larga escala no país (Alexander *et al.*, 1982). Considerando as vantagens ambientais envolvidas e a sua característica de fonte renovável, almeja-se a difusão do uso e da produção do álcool no mercado internacional.

O melhoramento genético destaca-se por sua importância na obtenção de cultivares com requisitos adequados a interesses agrônômicos e industriais. Entretanto, o melhoramento da cana-de-açúcar é dificultado pela complexidade apresentada por seu genoma, considerando a natureza híbrida dos seus cultivares, com padrão citogenético de

difícil análise, origem multiespecífica, alto nível de ploidia e aneuploidia (Heinz, 1987). A cana-de-açúcar cultivada é derivada de hibridações interespecíficas entre *S. officinarum* (cana nobre) e outras espécies do gênero *Saccharum* (*S. spontaneum*, *S. barberi* e *S. sinense*), envolvendo retrocruzamentos repetidos com *S. officinarum*. Além disso, um programa de melhoramento genético leva um tempo relativamente longo para obtenção e distribuição de uma nova variedade de cana aos produtores (Hogarth *et al.*, 1997).

Recentemente, o surgimento dos marcadores moleculares possibilitou a ampliação de conhecimentos sobre diversas culturas, facilitando estudos genéticos de caracteres importantes. Tal fato tem adquirido papel de destaque na agricultura moderna.

A disponibilidade de marcadores ao longo de todo o genoma permite a confecção de mapas genéticos, os quais possibilitam a aquisição de informação básicas sobre a estrutura e organização do genoma de uma espécie estudada, tais como: padrões de distorção de segregação Mendeliana de segmentos cromossômicos, associações de marcadores com caracteres qualitativos e localização dos mesmos e, identificação de regiões genômicas associadas a caracteres quantitativos (QTL's) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os marcadores do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), constituem uma das classes de marcadores moleculares mais amplamente utilizadas em genética e melhoramento de plantas, apresentando reprodutibilidade, herança codominante, além de serem livres de interações epistáticas e apresentarem número ilimitado de combinações sonda/enzima para genotipagem de uma população.

Apesar de haver contribuição de vários mapas genéticos para um maior entendimento da cultura de cana-de-açúcar e a possibilidade de aquisições de informações de extremo valor em programas de melhoramento (da Silva *et al.*, 1993; Al Janabi *et al.*,

1993; da Silva *et al.*, 1995; Grivet *et al.*, 1996; Guimarães, 1999; Hoarau, 2000), até o momento não existe um mapa obtido a partir de cruzamento entre variedades comerciais de cana-de-açúcar.

Neste contexto, a proposta do presente estudo foi construir um mapa de ligação proveniente do cruzamento entre dois híbridos interespecíficos, que são as variedades comerciais de cana-de-açúcar SP80-180 e SP80-4966.

A obtenção deste mapa genético é o passo inicial de um programa de mapeamento de características qualitativas e quantitativas de importância econômica, envolvendo variedades comerciais de cana-de-açúcar, contribuindo para estudos futuros mais detalhados.

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico.

2. Revisão de literatura

2.1 Aspectos gerais e importância econômica da cultura da cana-de-açúcar

O exato centro de origem da cana-de-açúcar não está totalmente determinado, sendo alvo de várias investigações. Com base em referências encontradas e diversos estudos realizados, acredita-se que a cana estabeleceu-se há cerca de 6000 anos A.C. em regiões do Pacífico com posterior expansão para o continente asiático, de onde foram originados os primeiros produtos dela derivados (Daniels e Daniels, 1975).

A disseminação do cultivo dessa cultura se estendeu por quase todos os lugares no mundo, principalmente para os países tropicais e subtropicais. O açúcar, produto extraído dessa espécie, é extremamente apreciado principalmente pela cultura Ocidental (Barnes, 1953). Acredita-se que o melhoramento da cana-de-açúcar começou ao mesmo tempo que o seu cultivo, sendo provavelmente uma das espécies que tenha sido submetida mais intensamente ao melhoramento, em nível comparável somente ao milho (Matsuoka, 1999a).

Os primeiros clones domesticados são originários da Indonésia, derivados da espécie *Saccharum officinarum*, denominada "cana nobre". Tais clones foram as principais canas cultivadas até o final do século XIX, sendo a multiplicação realizada exclusivamente por meio de propagação vegetativa. Os programas de cruzamentos interespecíficos foram estimulados com a descoberta da fertilidade sexual da cana em 1888 em Java, além do aumento de danos provocados por doenças que aconteciam neste mesmo período (Bremer, 1961).

A espécie selvagem *S. spontaneum* foi a que mais contribuiu no processo de hibridação para a formação dos novos cultivares. Essa espécie selvagem possui baixo teor de açúcar, porém, contém características interessantes ao melhoramento, tais como vigor vegetativo, resistência ao estresse e a algumas doenças. Os cruzamentos interespecíficos foram seguidos de retrocruzamentos para *S. officinarum* a fim de minimizar os efeitos negativos do genitor selvagem utilizado (Bremer, 1961; Matsuoka, 1999a).

Simultaneamente, na Índia, realizaram-se processos de hibridações interespecíficas envolvendo 3 espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. barberi*, resultando em variedades adaptadas às condições subtropicais.

No Brasil, durante os três primeiros séculos da colonização, provavelmente uma única variedade foi cultivada, tendo o nome Creoula (Deer, 1949, citado por Junqueira & Dantas, 1964). Acredita-se que esta variedade era um híbrido natural entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Miocque & Machado Jr., 1986). Tratava-se de uma variedade rústica e suscetível a várias doenças. O "ciclo da Creoula" abrangeu o período de 1532 a 1810, quando começou a ser substituída pela Cana Caiana, que se apresentou muito mais produtiva e rica em sacarose, promovendo ganhos significativos para a indústria açucareira do Brasil (Matsuoka, 1999b).

Por volta de 1850, buscando-se aumento de variabilidade, foram importadas das ilhas Bourbon três novas variedades: Roxa, Salangor e Rosa; pouco depois vieram as canas Mole, Listada e Ubá. A partir de 1879 entraram no Brasil, provenientes das ilhas Maurício, as variedades Bois Rouge, Lousier e Kavengire (Junqueira & Dantas, 1964); porém, na década de 20 uma epidemia de mosaico tornou inviável o cultivo destas variedades nobres, reduzindo acentuadamente a produtividade da lavoura da cana (Matsuoka, 1976).

Os canaviais se recuperaram com a introdução de variedades javanesas e, posteriormente, em 1932, foram importadas de Coimbatore outras variedades, algumas das quais são cultivadas até hoje em alguns Estados brasileiros. Com o surto de carvão na cultura de cana-de-açúcar interrompeu-se este ciclo.

Um novo ciclo surgiu com as variedades brasileiras obtidas em Campos (RJ) e intensamente utilizadas na lavoura paulista até 1976. Neste mesmo ano, a produção de cana no Brasil aumentou exponencialmente após a implantação do Programa Nacional do Alcool (Pro-álcool), exigindo o aumento da produção de álcool sem prejuízos para a produção do açúcar consumido no país. Inicialmente, solucionou-se o problema com o crescimento da área cultivada, transformando o Brasil no maior produtor mundial de cana-de-açúcar (Matsuoka, 1999a e 1999c).

A principal variedade cultivada neste período foi a NA56-79, a qual atendia a vários requerimentos agrônômicos de interesse no campo e na indústria. Foi desenvolvida na Argentina e introduzida no Brasil devido às qualidades que não haviam sido encontradas em variedades anteriores até então cultivadas, chegando a ocupar 47% da área total de cana cultivada em território nacional. Entretanto, esse incremento despropositado culminou em sérios prejuízos quando esta variedade apresentou-se suscetível a várias doenças. Com os problemas encontrados nesta variedade, programas de melhoramento estabelecidos na década de 70 passaram a liberar novas e boas variedades (Matsuoka, 1999c).

Considerando o cenário nacional dos últimos 26 anos, o Estado de São Paulo assumiu a liderança na produção e na tecnologia da cana-de-açúcar no país, sendo a região que mais preocupou-se com a obtenção de novas variedades. Entretanto, verifica-se

também o crescimento da cultura canavieira nos estados do Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Matsuoka, 1999a).

Durante o período de crescimento intenso e acelerado observado para essa cultura, o setor sucro-alcooleiro investiu em pesquisas e desenvolvimento, implantando e adaptando modernas tecnologias agrícolas e industriais, o que conduziu a ganhos de produtividade (Fernandes e Irvine, 1987). Foram desenvolvidos três programas de melhoramento genético da cana, os quais proporcionaram novas opções de plantio para o produtores, através das variedades lançadas sob diversas siglas: IAC (Instituto Agronômico de Campinas), SP (Copersucar) e RB (Planalsucar, recentemente incorporado à UFSCar - Universidade Federal de São Carlos).

Estima-se que, atualmente, a produção mundial de açúcar seja de 122 milhões de toneladas (USDA), das quais 14,8 milhões (12,1%) provêm do Brasil, segundo dados fornecidos pelo IBGE. A cultura da cana, no Brasil, gerou ainda 15,3 bilhões de litros de álcool na safra 97/98, numa área de 4.877.000 hectares, existindo, em atividade, mais de 200 usinas e destilarias no país. O mercado sucro-alcooleiro movimenta cerca de R\$ 12,7 bilhões por ano, com faturamentos diretos e indiretos, o que corresponde a 2,3% do PIB brasileiro. Este setor faz do Brasil o maior produtor mundial de açúcar de cana e o único do mundo a implantar em larga escala um combustível alternativo ao petróleo.

O Estado de São Paulo é o maior representante do setor, responsável pela produção de 62% de álcool e 56% de açúcar do País.

2.2 Sistemática e evolução do gênero Saccharum ssp.

Considerando a origem complexa das cultivares de cana-de-açúcar e as peculiaridades genéticas desta cultura, a presente revisão apresenta aspectos citológicos, taxonômicos e sobre origem e domesticação, relevantes para uma maior compreensão da biologia das espécies *Saccharum spp.*

2.2.1 Classificação taxonômica

A cana-de-açúcar é uma planta herbácea, alógama, pertencente à família das gramíneas (Poaceae), membro da tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum* (Tzvelev, 1989).

Com base em critérios de morfologia, os taxonomistas concordam no reconhecimento de 6 espécies para o gênero *Saccharum*: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule* (Brandes, 1958; Naidu e Sreenivasan, 1987; Daniel e Roach, 1987). Devido à existência de relações filogenéticas variadas, houve várias revisões taxonômicas para o gênero *Saccharum*, sempre enfrentando problemas para uma delimitação exata entre as espécies (Irvine, 1999).

Murkherjee (1957) considerou, a partir de dados adquiridos em análises geobotânicas, que os gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*, formam um grupo de intercruzamentos muito próximo, provavelmente envolvidos na origem da cana-de-açúcar. Daniels *et al.* (1975) expandiram este grupo incluindo o gênero *Miscanthus*. As espécies destes gêneros, conjuntamente, formam o informalmente chamado “Complexo *Saccharum*”.

2.2.2 Características das espécies *Saccharum ssp.*

A cana-de-açúcar cultivada evoluiu com base em seis espécies do gênero *Saccharum*: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule* (Brandes, 1958).

Para fins de classificação didática, podemos reunir os exemplares existentes em basicamente 3 categorias: espécies selvagens, cultivares tradicionais e cultivares modernas.

2.2.2.1 Espécies selvagens

Duas espécies selvagens são incluídas no gênero *Saccharum*: *S. spontaneum* e *S. robustum*. Estas duas espécies, quando consideradas em situação de alopatria, baseando-se em critérios da biologia molecular, apresentam-se bastante distintas, evidenciando uma bipartição botânica do gênero. Entretanto, esta distinção genética não é completamente clara considerando situações de simpatria (Grivet *et al.*, 2001). Apresentamos a seguir uma breve descrição dessas espécies.

***S. spontaneum* Linnaeus:** espécie rústica, altamente polimórfica, apresentando grande adaptabilidade. Pode ser encontrada em ambientes diversos, resultando em ampla distribuição geográfica. É encontrada na faixa tropical dos continentes africano, asiático e na Oceania (Panje e Babu, 1960). Exemplares desta espécie contém baixo teor de açúcar, porém são detentoras de características interessantes para o melhoramento da cultura como: vigor, número de perfilhos, capacidade de rebrota de soqueira, resistência a estresses, doenças e pragas (Naidu e Sreenivasan, 1987). Esta espécie possui grande participação no genoma de novas cultivares.

***S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl:** segunda espécie selvagem com maior participação nas cultivares modernas. É distinguida de *S. spontaneum* pela ausência de

rizomas, inflorescência grande, haste mais espessa e maior altura. Apresenta-se extremamente vigorosa, formando touceiras bem fechadas. Sua distribuição é limitada ao sudeste da Ásia. Supõe-se que esta espécie seja diretamente responsável pelo aparecimento das cultivares nobres, e acredita-se que *S. robustum* originou-se da introgressão de *S. spontaneum* com outros gêneros na região da Nova Guiné (Stevenson, 1965; Daniel e Roach, 1987). Apesar de vários estudos moleculares já terem sido efetuados, ainda existem dúvidas quanto à origem exata desta espécie (Grivet *et al.*, 2001a).

2.2.2.2 Cultivares tradicionais

As cultivares tradicionais de cana-de-açúcar têm quase desaparecido como variedades de cultivo, mas mantêm-se importantes como progenitores das cultivares modernas e como fonte de características desejáveis em programas de melhoramento. Pode-se considerar 4 espécies:

S. officinarum Linnaeus: espécie conhecida como “cana nobre”, devido às suas cores brilhantes, colmos grossos e suculentos, alto teor de sacarose e baixo teor de fibra, que são características apreciadas para industrialização. Seu possível centro de origem é a Nova Guiné, baseando-se na observação de um máximo de diversidade (Brandes *et al.*, 1939; Jannoo *et al.*, 1999). Clones desta espécie são pouco utilizados de forma direta na agricultura atual, mas pode-se encontrar seu cultivo em regiões restritas, especialmente na Melanésia. Admite-se que *S. officinarum* possua *S. spontaneum*, *Erianthus* e *Miscanthus* como genitores originais (Daniels e Daniels, 1975), incluindo também *S. robustum*. Outra possibilidade seria a pressão seletiva por manejo humano sobre *S. robustum* originando *S.*

officinarum (Daniel e Roach, 1987). Em recente revisão, Grivet *et al.* (2001a) reuniram fortes evidências moleculares, as quais dão base para a hipótese de uma descendência direta dos clones nobres de *S. officinarum* a partir da espécie selvagem *S. robustum*.

***S. barberi* Jeswiet e *S. sinense* Roxburgh:** ambas as espécies possuem quantidades de sacarose aceitáveis para o consumo humano direto (*S. sinense*) ou para a extração industrial (*S. barberi*) (Daniels and Daniels, 1975a). São distingüidas dos clones de *S. officinarum* através de características florais, colmos finos e medianos, concentração moderada de açúcar, alto teor de fibras, grande resistência ao estresse e tolerância à algumas doenças. Brandes (1958) formulou a hipótese de origem para *S. barberi* e *S. sinense*, que seriam derivadas de introgressões de *S. officinarum* com outras espécies do “Complexo *Saccharum*”. A hipótese de que a origem de ambas as espécies fosse independente de *S. officinarum* também foi levantada (Grassl, 1977; Rao, 1980). Daniel e Roach (1987) apresentaram evidências geográficas e culturais levantando a hipótese de origem independente, mas a hipótese de participação de *S. officinarum* na origem de *S. barberi* e *S. sinense* não é excluída baseando-se em estudos com isoenzimas (Waldron e Glasziou, 1972). Dados moleculares mostram que cultivares indianos e chineses são resultados de hibridações interespecíficas entre representantes de dois pólos: *S. spontaneum* de um lado e a cana selvagem domesticada *S. robustum*, hibridada com clones nobres do outro (Grivet *et al.*, 2001a). Estes dados também demonstraram que qualquer participação de espécies dos gêneros *Erianthus* ou *Miscanthus* para a genealogia deles parece bastante incomum (Alix *et al.*, 1998 e 1999).

***S. edule*:** esta espécie representa menor interesse para os melhoristas. Seu cultivo é reduzido, possuindo inflorescência comestível, a qual é consumida como hortaliça por nativos da Melanésia. Alguns autores sugerem que seu aparecimento seja proveniente de

mutações a partir de *S. robustum* (Lennox, 1939; Brandes *et al.*, 1939). Williams *et al.* (1974), através de análises de compostos flavonóides, indicou que o processo de domesticação que conduziu ao aparecimento de *S. edule* poderia não ser muito diferente daquele efetuado para a obtenção de clones nobres. Entretanto, a melhor hipótese baseia-se em uma origem intergenérica, como produto de introgressões de *S. officinarum* ou *S. robustum* com outros gêneros (Daniel e Roach, 1987).

2.2.2.3 Cultivares modernas

As cultivares modernas foram progressivamente substituindo as cultivares tradicionais durante o século XX. No começo deste século, hibridações de *S. spontaneum* com *S. officinarum* na Índia e Java resultaram em melhoramento no vigor da cana-de-açúcar. A partir de resultados promissores, tal metodologia ganhou destaque na obtenção de canas cultivadas. Buscando melhores características dos híbridos interespecíficos, os cruzamentos tornaram-se mais complexos, originando o processo de nobilização. Neste processo, a cana-de-açúcar cultivada derivou do intercruzamento entre cultivares tradicionais e a espécie selvagem *S. spontaneum*, seguido por vários retrocruzamentos para *S. officinarum* (Stevenson, 1965).

Na constituição das cultivares plantadas hoje, predomina a contribuição de *S. officinarum*, com participação de *S. spontaneum*, *S. sinense* e *S. barberi* e, em menor proporção, *S. robustum*. Os melhoristas ainda utilizam, predominantemente e com sucesso, a base genética obtida dos programas de melhoramento de cana do início do século passado, através de cruzamentos interespecíficos e retrocruzamentos para *S. officinarum*. Atualmente, duas linhas de pesquisa são seguidas: 1) tentativas de hibridações com

gêneros similares (*Miscanthus sp.*, *Erianthus sp.*, *Narenga sp.* e *Sorghum sp.*); 2) regresso à área de origem provável do gênero *Saccharum spp.*, com o objetivo de realizar coletas de germoplasma (Grivet *et al.*, 2001a).

2.2.3 Complexo *Saccharum*

Os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga* possuem uma ampla distribuição, abrangendo do Himalaia até a Melanésia e, muitas vezes, estendendo-se para as ilhas do Pacífico e Sibéria. Geralmente eles não contêm açúcar e a morfologia do caule é variável, dependendo da espécie.

Estudos baseados em técnicas moleculares têm analisado as relações entre espécies dos gêneros que englobam o "Complexo *Saccharum*" e seu suposto envolvimento com a origem da cana-de-açúcar. Considerando aspectos referentes à genética e baseados em seqüências distintas de diferentes compartimentos genômicos, os atuais representantes dos gêneros *Saccharum*, *Erianthus* e *Miscanthus* apresentam padrões altamente contrastantes (Glaszmann *et al.*; 1990; Lu *et al.*; 1994, D'Hont *et al.*, 1995). O acúmulo de dados obtidos por biologia molecular nos últimos 10 anos, permite a formulação da hipótese de surgimento do gênero *Saccharum* como um grupo definido, independente dos gêneros *Erianthus* e *Miscanthus*.

A conclusão desses estudos sugere que o conceito de "Complexo *Saccharum*" (Murkherjee, 1957) é uma superestimativa da contribuição de outros gêneros para o surgimento de canas cultivadas (Grivet *et al.*, 2001a).

2.3 Características citológicas

2.3.1 Número cromossômico em *Saccharum spp.*

A classificação de uma espécie pode ser realizada através de estudos citológicos, onde informações sobre tamanho e número de cromossomos podem ser obtidos e usados para distinção entre as espécies (Roach, 1969; Sreenivasan *et al.*, 1975). O número cromossômico tem portanto, um importante papel na taxonomia da cana-de-açúcar, que não é simples de se realizar.

Foi sugerido por Bremer (1961) três números básicos de genoma $x = 6, 8$ e 10 para espécies *Saccharum spp.* Em gramíneas observam-se dois genomas predominantes: número básico $x = 7$ para espécies de clima temperado e $x = 10$ para tropicais. Os genomas básicos $x = 6$ e $x = 8$, poderiam resultar de perdas ou ganhos de um conjunto básico de $x = 7$, e ambos os genomas explicariam a poliploidia em *Saccharum* (Sreenivasan, 1987).

Desde a primeira contagem de cromossomos realizada para a espécie *S. spontaneum* por Kuwada (1915), vários outros pesquisadores estudando aspectos citológicos desta espécie, relataram uma ampla variação no número de cromossomos. Dentro da espécie *S. spontaneum* são encontrados 31 tipos de clones com diferentes números de cromossomos entre $2n = 40$ a $2n = 128$, sendo os citótipos mais frequentes os múltiplos de 8 cromossomos, sugerindo que o número básico desta espécie é $x = 8$ (Panje e Nabu, 1960; Sreenivasan *et al.* 1987; Burner 1987). O mapeamento físico de dois genes rRNA realizado por D'Hont *et al.* (1998) confirmou esta hipótese. A possibilidade de cruzamentos entre grupos presentes em *S. spontaneum*, com diferentes números de cromossomos, resulta em irregularidades variadas durante a meiose (Panje e Nabu, 1960).

S. officinarum é uma espécie euplóide com $2n = 80$ cromossomos (Bremer, 1930; Li e Prince, 1967; Prince e Daniels, 1968). A meiose é geralmente normal considerando a formação regular de bivalentes. D'Hont *et al.* (1998) apresentou o número básico $x = 10$ para esta espécie.

Para as espécies *S. barberi* e *S. sinense*, observa-se $2n = 116-120$ e $2n = 82-124$, respectivamente. Observações citológicas demonstram meioses extremamente irregulares (Sreenivasan *et al.*, 1987).

Prince (1965) relatou cinco grupos dentro da espécie *S. robustum*, considerando o número de cromossomos possíveis de serem visualizados, sendo que três deles apresentam $2n = 60$ e dois $2n = 80$. Daniel e Roach (1987) consideraram a existência de um sexto grupo contendo $2n = 114-205$.

Os clones pertencentes a *S. edule* constituem uma série poliplóide de $2n = 60, 70$ e 80 cromossomos (Roach, 1972).

A característica singular de formação das cultivares modernas resulta em grande complexidade, alta ploidia com número de cromossomos $2n = 80-100 + 5-30$, aneuploidia e mosaicismo cromossômico (Sreenivasan *et al.*, 1987).

Na tabela 1 é apresentado um resumo do número de cromossomos atribuído a cada uma das espécies de *Saccharum*.

Tabela 1. Números de cromossomos envolvendo o gênero *Saccharum* spp.

Número Cromossomos	
<i>S. spontaneum</i>	2n = 48 – 128
<i>S. officinarum</i>	2n = 80
<i>S. barberi</i>	2n = 82, 90-92, 107, 116, 124
<i>S. sinense</i>	2n = 118
<i>S. robustum</i>	2n = 60
<i>S. edule</i>	2n = 60, 70 e 80
Variedades Comerciais	2n = 80 - 100 (+) 5 - 30

2.3.2 Nobilitação

O processo de nobilitação envolve cruzamentos interespecíficos seguidos de etapas de retrocruzamentos para a espécie *S. officinarum*, designada como "cana nobre". As canas da chamada 1ª nobilitação correspondem aos híbridos F₁ resultante do cruzamento entre a espécie *S. officinarum* (cana nobre) e outra espécie do gênero *Saccharum*. As canas da 2ª nobilitação são resultantes do primeiro retrocruzamento (BC₁) dos híbridos F₁ com a espécie *S. officinarum*, e as canas da 3ª e 4ª nobilitação resultam, respectivamente, do segundo (BC₂) e terceiro retrocruzamentos (BC₃) com *S. officinarum* (Bremer, 1961; Pires, 1993;).

Em cruzamentos interespecíficos de *S. officinarum* com *S. spontaneum* observa-se a ocorrência de peculiaridades citológicas na transmissão dos gametas, quando *S. officinarum* é utilizada como genitor feminino. No processo de nobilitação, os clones de *S. officinarum* transmitem 2n = 80 cromossomos no cruzamento F₁ e no BC₁, ao invés do

número gamético normal. Somente a partir da 3^a nobilização é que os gametas dos clones de *S. officinarum* transmitem $n = 40$ cromossomos. Esse mecanismo resultou em um aumento do número de cromossomos entre os produtos das sucessivas nobilizações e também levou a uma rápida redução do número relativo de cromossomos de *S. spontaneum* (Bhat e Gill, 1985). Hoarau (2000) estimou que *S. spontaneum* participa com 10% no genoma das cultivares modernas.

Para explicar tal fenômeno, as seguintes hipóteses foram formuladas: 1) Duplicação cromossômica através de endoduplicação durante a meiose; 2) Duplicação cromossômica depois da primeira divisão méiotica; 3) Fusão pós-meiótica de dois núcleos no estágio de tétrade (Prince, 1957; Bremer, 1961).

O mecanismo exato da transmissão $(2n + n)$ cromossomos não é perfeitamente entendido (Bhat e Gill, 1985). Na figura 1 há um esquema ilustrando um exemplo de como ocorre o processo de nobilização.

Cruzamento Interspecífico

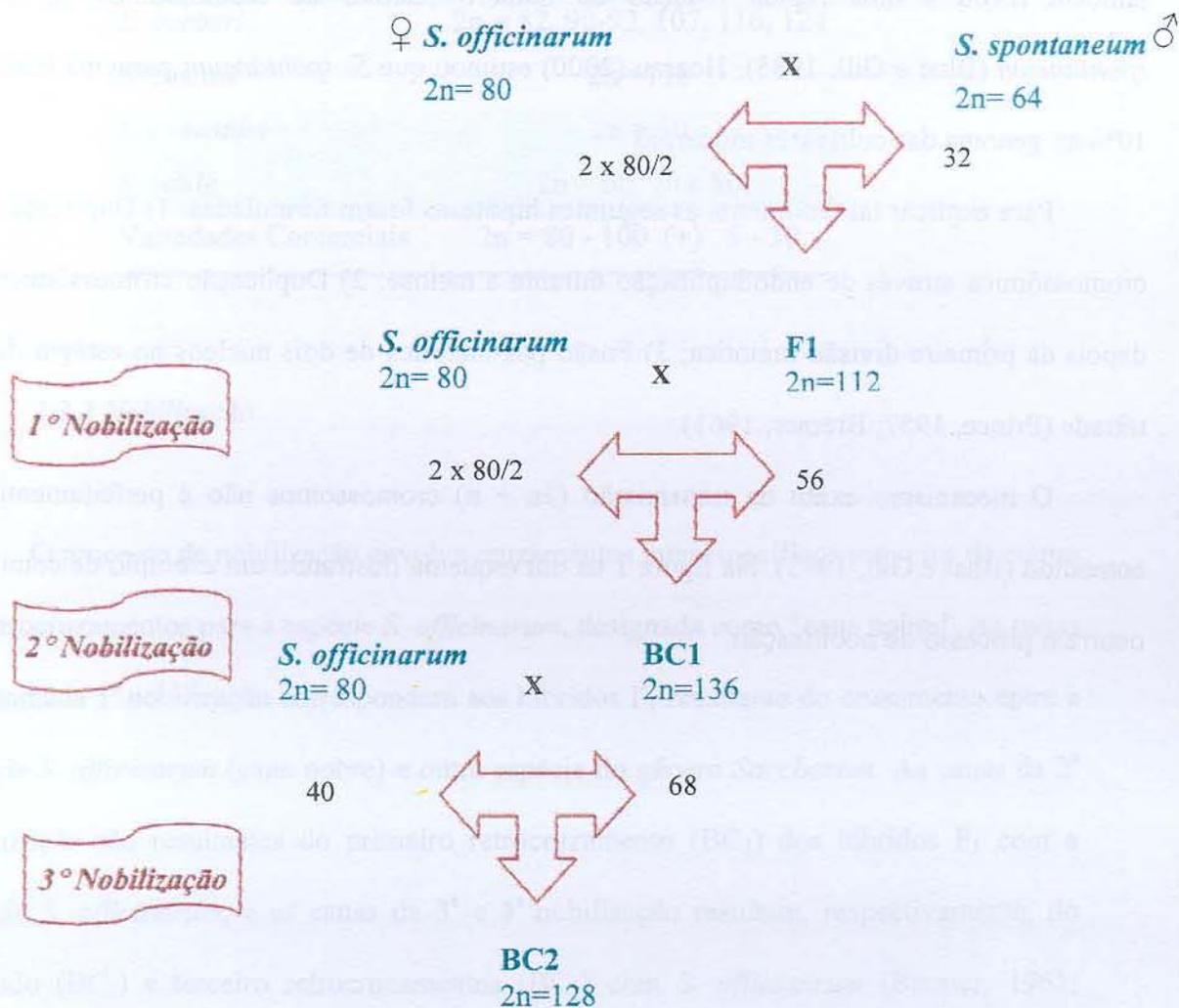


Figura 1. Esquema da transmissão dos cromossomos no processo de nobilitação em cruzamento envolvendo *S. officinarum* (2n=80), como genitor feminino, e *S. spontaneum* (2n=64).

2.4 Marcadores moleculares

Mendel, em 1865, descobriu a segregação genética de características simples realizando cruzamentos entre genótipos de ervilhas fenotipicamente diferentes. Entretanto, a corroboração desse estudo somente ocorreu com a redescoberta das Leis de Mendel por Tschermak, DeVries e Correns em 1900, e a observação do comportamento de pares de cromossomos homólogos, através de métodos citológicos, por Sutton e Boveri em 1902 (Griffitts, 1996).

A partir deste momento, os estudos na área de Genética foram impulsionados e surgiram novas descobertas, entre as quais a ligação gênica, que precedeu e propiciou a construção de mapas de ligação (Correns, Batenson e Punnett, 1905; Morgan, 1912; Sturtevant, 1913 citados por Liu, 1997).

Considerando esses princípios e baseando-se em conceitos formulados sobre a relação de um gene/uma enzima com a estrutura física e hereditária da molécula de DNA (Beadle e Tatum 1941, Watson e Crick 1953 citados por Griffiths, 1997), têm-se utilizado as variações entre genótipos dentro de uma espécie para análise genética e construção dos mapas genéticos. Essas variações podem ser consideradas em diferentes níveis biológicos, desde um simples fenótipo até a detecção de uma alteração em um único nucleotídeo (Liu, 1997).

Trabalhos pioneiros de estudos de mapeamento concentraram-se em características fenotípicas de fácil identificação visual com herança mendeliana simples, tais como cor e forma. Apesar da inquestionável contribuição proveniente desses trabalhos, a utilização desses marcadores morfológicos é restrita devido ao seu número limitado, não fornecendo uma cobertura ideal do genoma. Além disso, a existência de associações desses marcadores

fenotípicos com efeitos drásticos para as plantas que os apresentam, torna-os indesejáveis em programas de melhoramento (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos solucionou em parte alguns desses problemas. Tais marcadores são resultantes da presença de mutações nos genes, as quais alteram aminoácidos da proteína codificada. Como resultado, há a formação de múltiplas formas moleculares da mesma enzima, provocando alteração na mobilidade dessas quando submetidas à eletroforese em campo elétrico. Essa técnica ampliou o número de marcadores possíveis de serem utilizados, os quais são considerados neutros e podem ser estudados em várias espécies. Entretanto, quando uma cobertura mais ampla do genoma é necessária, como no caso de mapeamento genético ou caracterização detalhada do germoplasma, as isoenzimas apresentam limitações relacionadas ao pequeno número total de locos e baixo nível de polimorfismo detectável em cada loco (Gottlieb, 1982).

Com o advento da tecnologia de DNA recombinante, resultante do desenvolvimento de técnicas modernas em Biologia Molecular, surgiram novos métodos para análise que aumentaram o poder de detecção da variabilidade existente diretamente no DNA.

Os marcadores moleculares do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), baseiam-se na detecção de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição do DNA (Tanksley *et al.*, 1989; Zehr *et al.*, 1992) e permitem detecção da variabilidade existente no DNA. A disponibilidade de um grande número de marcadores RFLP, dispersos ao acaso no genoma de muitas espécies de plantas, tornou possível a confecção de mapas de ligação saturados (muitas marcas), com inúmeros locos informativos (Hoisington e Coe, 1990). Este marcador é representado por uma sonda molecular (fragmento de DNA) hibridizada com DNA genômico digerido por uma enzima

de restrição e impresso em membranas. Assim, a associação sonda/enzima define um marcador molecular e, ao mesmo tempo, um loco cromossômico (Botstein *et al.*, 1980). Essa é uma técnica que apresenta repetibilidade dos resultados, e pode proporcionar cobertura total do genoma, pois o número de marcadores obtidos é praticamente ilimitado. Os marcadores são fenotipicamente neutros e a quantidade de polimorfismo alélico em cada loco pode ser grande, além dos marcadores não interagirem de forma epistática (Milach, 1998).

A variabilidade detectável por marcadores do tipo RFLP em plantas foi observada em várias espécies economicamente importantes, além da cana-de-açúcar, tais como: milho (Rivin *et al.*, 1983; Burr *et al.*, 1983; Helentjaris *et al.* 1985), cevada (Saghai-Marooof *et al.*, 1984), ervilha (Polans *et al.*, 1985), alface (Landry *et al.*, 1987), batata (Bornierbale *et al.*, 1988), arroz (McCouch *et al.*, 1988), soja (Apuya *et al.*, 1988) entre outras.

A implementação desta técnica de RFLP para análise do polimorfismo ao nível do DNA, na rotina de um programa de melhoramento de plantas, apresenta maior dificuldade que as demais técnicas desenvolvidas posteriormente, tais como microssatélites e RAPD (Random Amplified Polymorfism DNA). Isto ocorre devido ao tempo e trabalho envolvidos na obtenção dos resultados, além do custo elevado.

A reação de polimerização em cadeia (PCR - polymerase chain reaction), a qual permite a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (Mullis & Faloona, 1987), possibilitou a análise de novas classes de polimorfismo, permitindo que novos métodos de estudo do polimorfismo ao nível do DNA sejam realizados de forma rápida e menos laboriosa.

Williams *et al.* (1990), com base na amplificação de DNA, desenvolveram a técnica denominada Random Amplified Polymorfism DNA (RAPD), que consiste na

utilização de "primers" arbitrários (oligonucleotídeos com cerca de 10 bases). A natureza molecular do polimorfismo deriva de diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) como suficientes para causar a não complementaridade do "primer" com o DNA molde. Este fato impede a amplificação de um segmento de DNA pelo não anelamento do "primer" à sequência molde. Apesar da simplicidade envolvida nesta técnica, a sua baixa repetibilidade provoca dificuldades em comparações de dados obtidos em diferentes locais, resultando em grande desvantagem na sua utilização.

Um dos marcadores mais informativos baseado em PCR, tem sido denominado por vários acrônimos, tais como: microssatélites, SSRs (Simple Sequence Repeats) ou STRs (Short Tandem Repeats) (Litt e Luty, 1989; Tautz, 1989). Sequências microssatélites de DNA são compostas por unidades repetidas em cadeia com 1 a 6 pares de bases. O polimorfismo é resultante da variação no número das unidades repetidas em um dado segmento de DNA. Estas variações são detectadas por amplificação desta região do DNA utilizando-se "primers" complementares às regiões flanqueadoras das unidades repetidas. Os microssatélites são marcadores loco específico, codominantes e apresentam herança mendeliana. Nos últimos anos, vem sendo desenvolvidos trabalhos envolvendo análise genética em diferentes espécies de plantas utilizando-se microssatélites (Condit e Hubbell, 1991; Zhao e Kochert, 1992; Yang *et al.*, 1994; Mangolin, 2002; Sibov, 2002). A maior dificuldade para a implementação da técnica dos marcadores microssatélites é a necessidade do desenvolvimento de "primers" específicos, que exige elevado investimento.

Outra forma de detecção de polimorfismo é através da análise por marcadores moleculares do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), os quais envolvem a amplificação seletiva, por PCR, de fragmentos de restrição do DNA genômico

(Zabeau, 1993). Os polimorfismos são detectados pela diferença de tamanho dos fragmentos digeridos e amplificados diferencialmente. A superioridade desta técnica é a capacidade de detecção simultânea de um número elevado de marcadores em uma única análise, sendo os mesmos estáveis e reprodutíveis. Os marcadores AFLP são do tipo dominante, isto é, os heterozigotos não são distinguíveis dos homozigotos. Desta forma, perdem-se informações na genotipagem quando comparados a marcadores co-dominantes como RFLP e microssatélites. Os marcadores do tipo AFLP vêm sendo empregados tanto para análise de diversidade genética (Lima *et al.*, 2002) como para construções de mapas genéticos (Castiglione *et al.*, 1999; Ajmone-Marsan *et al.*, 2001).

2.4.1 Mapas genéticos

Talvez a aplicação mais difundida dos marcadores moleculares seja na construção de mapas genéticos, os quais são usados para determinar a localização cromossômica de genes afetando caracteres simples ou complexos de interesse agrônomico (Paterson *et al.*, 1988).

Para a construção dos mapas, formam-se grupos com marcadores ligados, isto é, associam-se marcadores localizados num mesmo cromossomo. Essa construção envolve tanto ordenar estes marcadores ao longo dos cromossomos quanto medir a distância entre eles (Lynch e Walsh, 1997)

A formação dos grupos de ligação, bem como a ordenação dos marcadores neles, é realizada a partir de testes estatísticos considerando dois marcadores de cada vez. Assume-se uma hipótese H_0 na qual os marcadores não estão ligados, o que equivale dizer que a frequência de recombinação entre ambos é igual a 0,5. Considerando a teoria de ligação genética (Griffiths, 1997) os mapas genéticos podem ser elaborados considerando-se a

probabilidade de ocorrência de diferentes classes genotípicas, ou seja, utilizando a frequência de recombinação existente entre dois locos. Sturtevant (1913), sugeriu padronizar a unidade de distância genética, definindo um centimorgan como sendo equivalente a 1% de recombinação. Entretanto, esta medida de distância apresenta uma característica inconveniente: a frequência de recombinação utilizada como medida da distância entre os marcadores não é aditiva. Se forem considerados por exemplo 3 marcadores ligados na ordem ABC, sendo utilizada a frequência de recombinação como escala para a distância, a soma das distâncias AB e BC será diferente da distância entre AC. Tal fato é explicado quando se considera que a presença de um “crossing-over” em uma região do genoma tem efeito na frequência de “crossing-overs” em regiões adjacentes. O acréscimo de novos marcadores, conseqüentemente, exige um ajuste de todas as distâncias já obtidas, tornando a frequência inadequada como medida de distância. Esse efeito, chamado de interferência (δ), varia de 0 (ausência de interferência) a 1 (interferência completa) (Pinheiro e Carneiro, 2000). Outro aspecto a ser considerado é que a distância entre os locos é também uma medida da probabilidade de ocorrência de um “crossing-over” naquela região. Como as probabilidades não têm a propriedade de soma, é necessário converter essa medida usando alguma transformação (funções de mapeamento).

A frequência de recombinação, por definição, considera apenas o número ímpar de eventos recombinantes, ou seja, que um “crossing-over” interfira completamente nas regiões adjacentes a ponto de impedir a ocorrência de outros “crossing-overs”. É, portanto, uma medida que considera apenas parte dos eventos de recombinação. A medida de distância que considera o número total de eventos recombinantes é comumente chamada de “m” e várias funções de mapeamento são propostas para obtê-la a partir das frequências de recombinações observadas. Funções freqüentemente usadas são a de Haldane (1919),

que assume ausência de interferência, e a de Kosambi (1944), que assume uma quantidade moderada de interferência (Pinheiro e Carneiro, 2000)

Diferentes programas computacionais, como MapMaker (Lander *et al.*, 1987) e JoinMap (Stam, 1993), utilizam diferentes algoritmos de estimativa multiponto e ordenação de marcadores dentro dos grupos de ligação. Ambos têm sido rotineiramente utilizados para a construção de mapas genéticos, permitindo a utilização das duas funções de mapeamento citadas para calcular a distância entre marcadores.

O número de marcadores necessários para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação genética. Um mapa pode ser considerado completo quando o número de grupos de ligação obtido pela análise dos marcadores for igual ao número de cromossomos do organismo e, também, quando todos os marcadores genéticos mapeados estiverem ligados, indicando que todas as regiões do genoma estão representadas (Guimarães e Moreira, 1999).

Os marcadores empregados na construção dos mapas podem ser escolhidos com base em testes estatísticos da segregação dos alelos na população de mapeamento, comumente usando a estatística Qui-quadrado. O nível de significância considerado para a realização dos testes é escolhido pelo pesquisador, sendo os valores mais comuns 5% e 1%. Entretanto, a exclusão de marcadores para a análise de mapeamento baseando-se somente nesses níveis de significância pode levar à ocorrência de erro do Tipo I, que implica em rejeitar uma hipótese nula verdadeira. Este problema é incrementado quando se considera que são realizados múltiplos testes de hipóteses, para cada marca individualmente.

Adotando-se um nível de significância (α) para cada teste, é observado um nível de significância conjunto do teste (α^*) que se apresenta crescente à medida que aumenta o

número de testes realizados, como indicado na equação 1 (supondo independência entre os testes).

$$\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^t \quad , \text{ em que} \quad (1)$$

α^* = nível conjunto de significância

α = nível individual de significância de cada marca

t = número de marcadores

Assim sendo, se por exemplo o pesquisador fixa 5% para cada teste ($\alpha=0,05$) e realiza 200 testes ($t = 200$), o nível de significância conjunto é $\alpha^* = 0,999965$, ou seja, há certeza em detectar falsos positivos nesse teste.

Uma alternativa para contornar este problema é a utilização da correção de Bonferroni (equação 2) (Rice, 1989). Esta correção consiste em determinar o valor do nível de significância individual (α) que proporcionará o nível de significância conjunto (α^*), e assim contornar os problemas resultantes da realização de múltiplos testes.

$$\alpha = - \exp \left(\frac{\ln (1 - \alpha^*)}{t} \right) + 1 \quad (2)$$

Os significados dos termos são os mesmos já apresentados.

2.5 Poliplóides

Inúmeras plantas de interesse econômico são poliplóides, como é o caso da cana-de-açúcar. Os organismos poliplóides podem ser divididos em aloploplóides e autoploplóides com base em sua origem, nas relações filogenéticas e na evolução. Os autoploplóides são derivados por multiplicação do número básico de cromossomos do indivíduo e os aloploplóides envolvem uma origem ou domesticação a partir de hibridações intergenéricas e, portanto, são constituídos por conjuntos de cromossomos de espécies distintas (da Silva, 1996). Entretanto, muitas vezes o caminho evolutivo de determinadas espécies não é bem definido por ausência dos diplóides ancestrais, devido à extinção dos mesmos ou devido ao fato destes não serem conhecidos e também pode haver ausência de estudos de relações filogenéticas que possam determiná-los.

Jackson e Casey (1980) concluíram que o comportamento dos cromossomos durante o pareamento cromossômico representava uma chave para o entendimento da evolução dos poliplóides. Assim, baseando-se em fatores que afetam o pareamento cromossômico, considera-se que todo aloploplóide tem interação dissômica. Para autoploplóides é esperada a interação polissômica, a qual quase não é detectada em autogamia, porém é bem evidente em alogamia, propiciando a heterozigosidade e a heterose (Mac Key, 1987; Uhl, 1992). Entretanto, novos estudos demonstraram que o comportamento genético em poliplóides parece ser mais complexo, particularmente dentro das gramíneas, sugerindo o desenvolvimento de mecanismos de controle de pareamento de bivalentes (Jackson, 1982).

Da Silva *et al.* (1993b, 1995) e Al Janabi *et al.* (1993) observaram que a espécie *S. spontaneum* ($2n=64$) comportava-se como um autoploplóide com herança polissômica, apesar de apresentar pareamento de bivalentes na meiose (encontrado na caracterização de aloploplóides).

A constituição genômica de muitos poliplóides, com alto nível de ploidia, ainda não é completamente entendida. Análises com metodologias desenvolvidas especialmente para poliplóides promoveram auxílio no entendimento e distinção entre autopoliplóides e alopoliplóides (Wu *et al.*, 1992).

2.5.1 Detecção de polimorfismo em poliplóides

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Este marcador tem herança co-dominante devido à sua capacidade de distinguir entre os homozigotos e heterozigotos para o loco em questão. A existência de grande disponibilidade desses marcadores ao longo do genoma, abriu perspectivas relevantes para vários estudos genéticos, entre eles, a possibilidade da construção de mapas genéticos.

Entretanto, quando se trata de organismos poliplóides, a complexidade envolvida no uso de marcadores do tipo RFLP aumenta. A grande quantidade de fragmentos gerados, que podem representar os diferentes alelos do mesmo loco nos vários cromossomos homólogos envolvidos, não permite a identificação dos genótipos pelo fenótipo visualizado.

Vários estudos foram realizados para tentar superar tal dificuldade, como a metodologia proposta por Wu *et al.* (1992), em que é considerado o pareamento de bivalentes na meiose. O mapeamento é realizado através de fragmentos de dosagem única

no genoma, denominados marcadores em dose simples ou SDRF (Single Dose Restriction Fragment) detectados pela segregação na proporção 1:1 (Figura 2). O padrão de polimorfismo é representado pela ausência ou presença de bandas individuais. Nesse caso, o marcador RFLP perde a vantagem da co-dominância e passa a funcionar como um marcador dominante. No entanto, no caso de segregação 1:1, isso não representa nenhuma desvantagem.

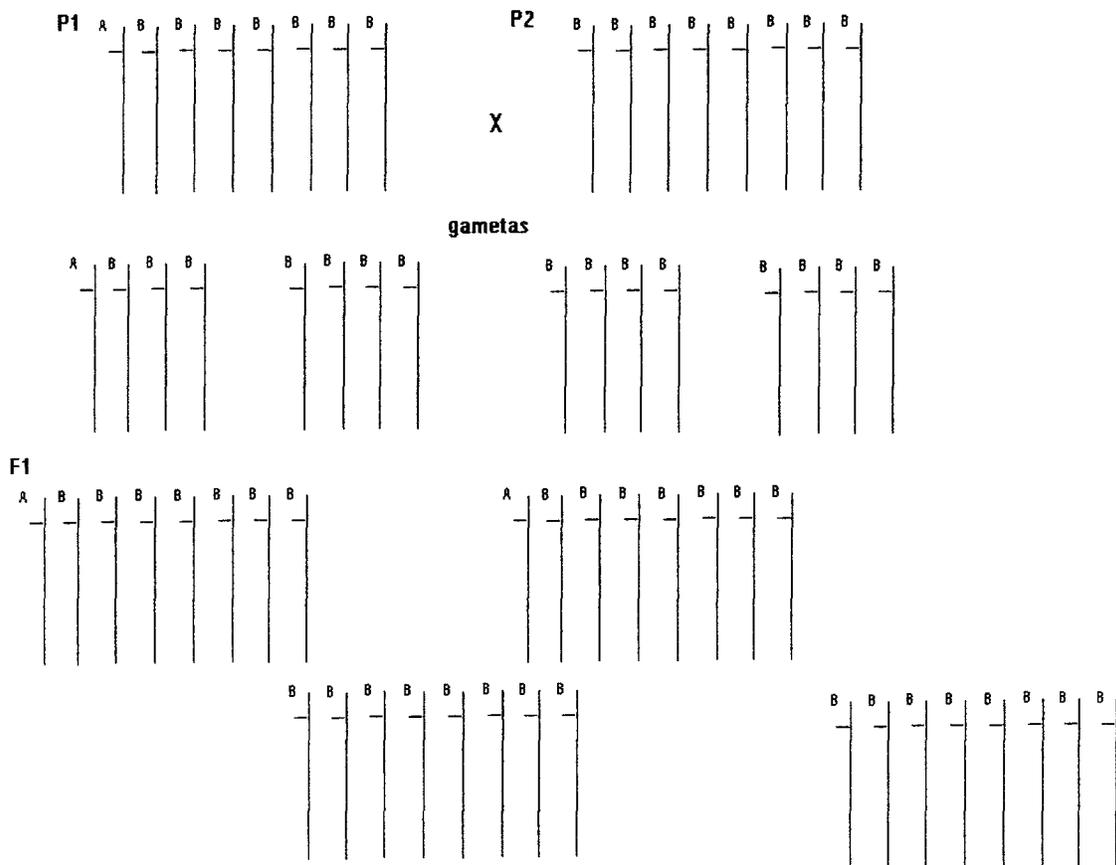


Figura 2. Esquema ilustrando a distribuição dos alelos A e B, pertencentes ao mesmo loco, entre os gametas formados por cada um dos genitores (P_1 e P_2) e possíveis genótipos observados entre os descendentes F_1 do cruzamento. O alelo A é representado como cópia única entre os cromossomos homólogos no genitor P_1 . Considerando o pareamento de bivalentes na meiose, haverá somente formação de dois tipos de gametas: um tipo de gameta contendo o alelo A e o outro não apresentando este alelo. No caso do genitor P_2 , o alelo A não está presente, resultando em formação de gametas sem este alelo em seu genótipo. O alelo B está em doses múltiplas e presente na constituição genômica dos dois tipos de gametas formados pelos dois genitores. Baseando-se no encontro aleatório dos possíveis gametas originados na meiose por cada um dos pais, em F_1 estão representados os possíveis genótipos da progênie originada. Os gametas do genitor P_2 combinam-se de duas formas diferentes: com um gameta do P_1 que contém o alelo A ou um gameta sem a presença deste alelo. Dessa forma, espera-se que metade dos indivíduos formados pela união desses gametas tenham o alelo A e a outra metade não. A relação esperada para um alelo em dosagem única no genoma, obedece portanto à relação 1:1. O alelo B está em dosagens variadas no genoma, possuindo um padrão de segregação mais complexo.

Um SDRF é equivalente a um único alelo em autopoliplóides, ou a um alelo no estado heterozigoto em um genoma diplóide em alopoliplóides. Sua segregação equivale a um alelo simples ou no estado de heterozigoto nos gametas: metade dos gametas contém o DNA de um fragmento e a outra metade não. Estes tipos de gametas podem ser visualizados na progênie de um determinado cruzamento, onde tal fragmento está presente em um genitor e ausente no outro. Assim, o fenótipo dos marcadores SDRF representa o

“tipo de gameta” de um genitor ao invés de apresentar a combinação dos gametas de ambos (Wu *et al.* 1992).

Como se trata de genética de poliplóides, outras alternativas de segregação são possíveis de ser observadas. Por exemplo, observa-se a presença de um mesmo alelo nos dois genitores, estando ele ou não em dosagem semelhante no genoma de cada um dos genitores (da Silva *et al.*, 1993a).

Marcadores SDRFs também podem ser detectados com um comportamento segregante diferente do qual foi exposto até o momento. Tal situação é encontrada quando um mesmo alelo está presente nos dois genitores em dosagem única e a segregação deles na progênie F₁ obedece à proporção 3:1 (da Silva *et al.*, 1993b; Grivet *et al.*, 1996). A Figura 3 ilustra a situação citada.

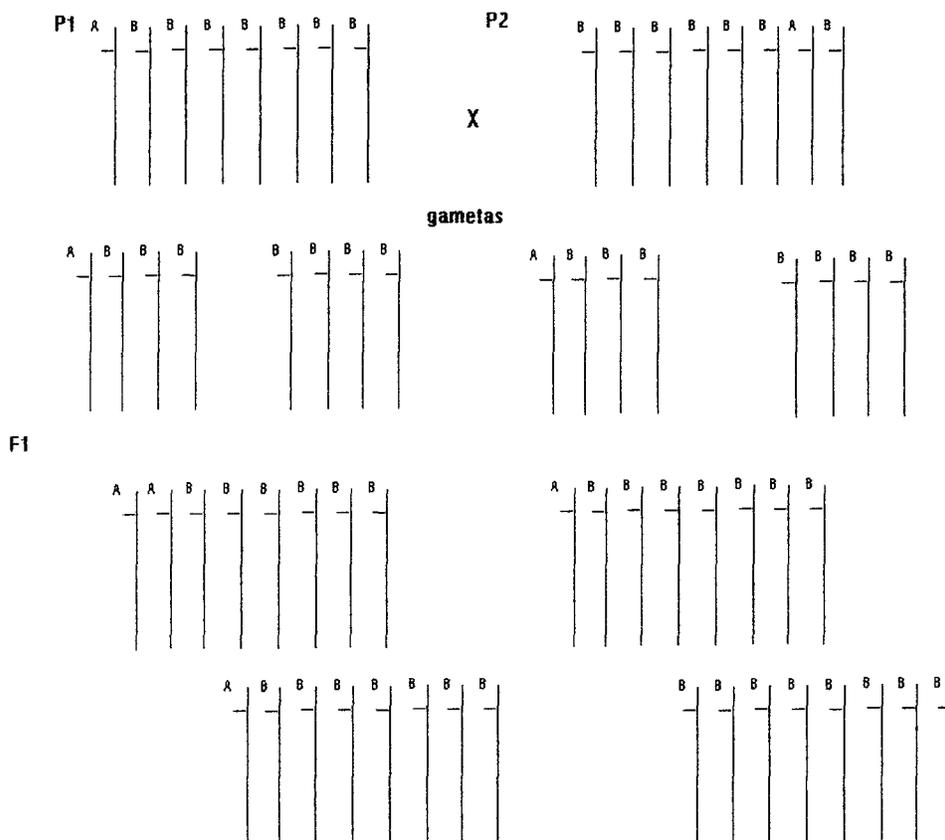


Figura 3. Esquema ilustrando a distribuição dos alelos A e B, pertencentes ao mesmo loco, entre os gametas formados por cada um dos genitores (P₁ e P₂) e possíveis genótipos observados entre os descendentes F₁ do cruzamento. O alelo A é representado como cópia única entre os cromossomos homólogos tanto no genitor P₁ como no genitor P₂. Baseando-se em pareamento de bivalentes na meiose, haverá somente formação de dois tipos de gametas para os genótipos representados por esses genitores: um tipo de gameta contendo o alelo A e o outro não apresentando este alelo. Considerando os gametas formados por cada genitor analisado, metade dos gametas provenientes do P₁ possui o alelo A e a outra metade dos gametas não tem esse alelo representado. Situação semelhante é observada para P₂. Verificando os possíveis genótipos formados para a progênie F₁ de um cruzamento deste tipo, constata-se que o alelo A, estará presente na proporção de 3:1 indivíduos. Assim, quando verificamos um fragmento monomórfico entre os genitores com segregação 3:1 entre os indivíduos da progênie F₁, o alelo será considerado em dose única e será utilizado para a construção do mapa. O alelo B está em dosagens variadas no genoma, possuindo um padrão de segregação mais complexo e de difícil análise.

Os tipos de marcadores representados pelo alelo A, expõem a limitação do método de mapeamento baseado em marcadores em dose simples para poliplóides. Os marcadores SDRF identificados na proporção 3:1 são dominantes e assim exploraram somente ligações em fase de acoplamento. A estimativa da distância e a ordenação dos SDRFs em fase de repulsão, através dos dados de segregação, é ineficiente em interações dissômicas e praticamente impossível em interações polissômicas, pois neste caso seria necessária uma população extremamente grande para o mapeamento (Allard, 1956; Wu *et al.*, 1992). Esta questão pode ser solucionada com marcadores em dose dupla ou dose tripla (da Silva,

1996), complementando a análise de marcadores em dose simples. Tais marcadores facilitam a identificação dos grupos homólogos, permitem a detecção indireta de SDRFs em fase de repulsão e potencializam a utilização dos dados. Entretanto, a inexistência de pacotes computacionais envolvendo este tipo de análise, retarda os estudos utilizando marcadores em dose dupla ou tripla.

Wu *et al.* (1992) calcularam que para considerar um marcador como SDRF com 95, 98 ou 99% de nível de confiança são necessários 54, 75 ou 92 indivíduos constituindo a família a ser estudada. Tanto para auto como para alopoliplóides, a detecção de ligação em fase de acoplamento de SDRFs é uma função da fração de indivíduos recombinantes em uma população. Esses marcadores permitem a identificação de alelos em uma população relativamente pequena.

Alguns exemplos são encontrados na literatura. Através da metodologia de SDRFs, foi desenvolvido um mapa de ligação para a espécie *S. spontaneum*, onde 216 marcadores RFLP foram identificados por 116 sondas, gerando 44 grupos de ligação (da Silva *et al.*, 1993a). Posteriormente, da Silva *et al.* (1993b), propuseram uma análise para marcadores em dose dupla e tripla. No mesmo período, outro mapa para *S. spontaneum* foi construído, utilizando marcador RAPD (Al Janabi *et al.*, 1993). Em seguida, esses dados foram agrupados em um único mapa, onde os resultados sugeriam que *S. spontaneum* seria um autopoliplóide (da Silva *et al.* 1995). Esses estudos preliminares, deram impulso a outras análises envolvendo as espécies do complexo *Saccharum*, onde foram sugeridas possíveis correlações entre cana-de-açúcar, sorgo e milho, espécies pertencentes à tribo Andropogoneae (Grivet *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 1997; Dufour *et al.*, 1997). Buscando mais informações sobre a cana-de-açúcar, foram ainda desenvolvidos mapas

para *S. officinarum* e *S. robustum*, sendo que a primeira destas é uma das principais espécies que compõem as variedades comerciais (Ming *et al.* 1998; Guimarães *et al.*, 1999)

Outros trabalhos foram desenvolvidos analisando a coexistência genômica dos genes derivados de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, sendo vários grupos de ligação identificados. Infelizmente o número de progênies utilizado não foi suficiente para ordenar os marcadores (D'Hont *et al.*, 1994; Grivet *et al.*, 1996). Em extensão à essas pesquisas, Grivet *et al.* (1996) construíram um mapa de ligação utilizando uma população resultante da autofecundação da variedade R570, conhecida como variedade elite. O mapa foi construído utilizando marcadores RFLP.

Recentemente, identificou-se o gene de resistência à ferrugem nesta população de autofecundação, através da saturação do mapa genético com marcadores na região de localização do gene (Daugrois *et al.*, 1996). Para esta saturação, foram também consideradas as relações de sintenia entre a cana-de-açúcar e outras gramíneas (Asnaghi *et al.*, 2000).

Baseando-se ainda na progênie derivada de autofecundação desta variedade, outro mapa foi construído recentemente, utilizando marcadores AFLP. Este mapa é mais representativo que o anterior, por conseguir uma maior cobertura do genoma. Neste estudo, foi confirmada a proporção de participação de cada progenitor ancestral no clone R570: 80% para *S. officinarum* e 20% para *S. spontaneum* (Hoarau, 2000). Entretanto, para a obtenção de respostas conclusivas sobre o comportamento cromossômico das cultivares de cana-de-açúcar são requeridos outros estudos.

3. Objetivo

Construção de um mapa genético de ligação para população oriunda do cruzamento de híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), que representam variedades comerciais, SP80-180 e SP80-4966, empregando-se marcadores moleculares do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

4. Artigo

Construção de um mapa genético para híbridos interespecíficos de variedades comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) empregando-se marcadores moleculares do tipo RFLP.

Andréia Navarro Meza¹; Cynthia Saraiva Leite¹; Antonio Augusto F. Garcia²; Jorge Alberto G. da Silva³; Eugênio César Ulian³; Anete Pereira de Souza^{1,4*}

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Cidade universitária Zeferino Vaz, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil

² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), CP 83, CEP 13400, 970, Piracicaba-SP, Brasil.

³ Centro de Tecnologia Copersucar, Fazenda Santo Antônio s/n, CEP 13400, 970, Piracicaba- SP, Brasil.

⁴ Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil

*Para quem as correspondências devem ser enviadas: E-mail: anete@unicamp.br

Telefone (55-19) 3788-1132 ou 3788-1090.

Resumo

Marcadores moleculares são utilizados como uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genéticos de plantas. Entre as diferentes aplicações dos marcadores, está a construção de mapas genéticos, os quais possibilitam a aquisição de informações importantes sobre uma espécie estudada, auxiliando os programas de melhoramento. Um exemplo importante de aplicação é o mapeamento de QTL's.

Considerando a importância econômica da cultura e a inexistência de um mapa genético oriundo de cruzamento entre variedades comerciais de cana-de-açúcar, o presente trabalho apresenta um estudo utilizando 189 marcadores RFLP em dose simples no genoma (SDRFs) originados de 55 combinações diferentes de sonda genômica/enzima de restrição em uma população de mapeamento F_1 , sendo esta proveniente do cruzamento entre duas variedades comerciais de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos), denominadas SP80-180 e SP80-4966. Com estes marcadores foi gerado um mapa genético de 480 cM com 33 grupos de ligação envolvendo 72 marcadores, sendo que 117 marcadores permaneceram não ligados. A utilização de vários marcadores provenientes de uma mesma sonda mostra-se eficaz na identificação de grupos homólogos, apresentando resultados satisfatórios para a cobertura vertical do genoma de cana-de-açúcar. Entretanto, uma vez que o número de cromossomos da cana-de-açúcar é elevado, variando de 80 a 130 marcadores, marcadores com essa característica fornecem uma baixa cobertura horizontal do genoma, pois o mapeamento enfoca apenas as regiões cosegregantes. Em híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar, a coexistência de alelos simples e múltiplos e a presença de número de cromossomos irregular, resultado da aneuploidia nos genitores, dificultam a interpretação correta das classes homólogas.

O mapa construído representa uma estrutura básica inicial para o mapeamento com outros tipos de marcadores, como AFLP e microssatélites, visando a sua saturação. Tal procedimento será necessário para o mapeamento de características quantitativas e qualitativas de interesse agrônômico em cana-de-açúcar.

Palavras Chaves: Mapa Genético, Híbrido Interespecífico, Cana-de-Açúcar,

Marcadores Moleculares RFLP, Variedades Cultivadas.

Introdução

A cana-de-açúcar é cultivada em muitos países do Velho e Novo Mundo, sendo estes últimos responsáveis por 60% da produção mundial de açúcar. No Brasil ela é utilizada desde a década de 70 como fonte renovável de combustível alternativo ao petróleo, o álcool, sendo esta uma aplicação pioneira em termos mundiais.

A inquestionável importância dessa cultura esbarra em várias peculiaridades genéticas que vêm retardando os progressos para um entendimento completo do genoma da cana-de-açúcar. Entre os obstáculos a serem transpostos está a complexidade do genoma, derivada do alto nível de ploidia presente no gênero *Saccharum* (Sreenivasan *et al.*, 1987). O melhoramento genético teve como base a geração de variedades comerciais derivadas de cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum*, usualmente com $2n = 80$ cromossomos e, *Saccharum spontaneum* com $2n = 40-128$ cromossomos. Essas hibridações interespecíficas foram seguidas de vários retrocruzamentos do híbrido com *S. officinarum*, processo denominado de "nobilização" (Bremer, 1961; Butterfield *et al.*, 2001; D'Hont and Glaszmann, 2001). Portanto, as cultivares modernas apresentam na sua constituição genômica parcelas do genoma de diferentes espécies. Estima-se que 10% a 25% do genoma das variedades cultivadas modernas tenha contribuição de *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 1996; Hoarau, 2001). As características estruturais dos cromossomos de *S. spontaneum* levam a uma organização genômica complexa com eventos aleatórios de recombinação, resultando em aneuploidia, com cerca de $2n = 100 + 5-30$ cromossomos nestes híbridos interespecíficos com elevada ploidia. (Grivet e Arruda, 2002).

A confecção de mapas genéticos é importante para a aquisição de informações relevantes para o melhoramento de uma espécie, por permitir o acesso e a avaliação da variabilidade genética, bem como o conhecimento de associações significativas entre os

marcadores e genes para caracteres qualitativos e quantitativos importantes para o melhoramento.

A aplicação da tecnologia de mapeamento em poliplóides não tem sido tão intensa quanto a de plantas diplóides, sendo dificultado por haver multiplicidade de segregação dos cromossomos, vários tipos possíveis para formação de gametas e, pelo fato da frequência dos diferentes genótipos não poder ser identificada por um teste de retrocruzamento (Fisher, 1949). Como resultado, há formação de um padrão de segregação genética na progênie de difícil análise. Os benefícios dos estudos de mapeamento só puderam ser alcançados para *Saccharum spp.*, após o desenvolvimento da metodologia de mapeamento direto em poliplóides proposta por Wu *et al.* (1992), que se baseia na análise de fragmentos de restrição em dose única no genoma (SDRF), considerando pareamento de bivalentes na meiose.

Marcadores do tipo RFLP são, até o momento, os mais informativos para determinar as relações de homologia entre mapas de espécies diferentes. Tal fato é decorrente da possibilidade de hibridizações heterólogas das sondas utilizadas no mapeamento. Além disso, para cana-de-açúcar, até o momento, este é o marcador que tem mais informações disponíveis entre diferentes espécies do gênero *Saccharum spp.* (Grivet *et al.*, 1994; da Silva *et al.*, 1995; Dufour *et al.*, 1997; Guimarães *et al.*, 1997).

O mapa genético para a espécie selvagem *S. spontaneum*, construído com base em marcadores RFLP (da Silva *et al.*, 1993a; Al-Janabi *et al.* 1993; da Silva *et al.* 1995; Ming *et al.*, 1998) indicou que a espécie é autopoliplóide, considerando a característica de herança polissômica. Tal resultado contrariou as expectativas iniciais de classificação em poliplóides considerando o pareamento bivalente como comportamento cromossômico na metáfase I da meiose desta espécie (Jackson, 1982). Acredita-se que tal situação deve-se a

atuação de mecanismos genéticos promotores de direcionamento dos pareamentos cromossômicos em autopoliplóides (Timmis e Rees, 1971; Avivi, 1976). Guimarães (1999) apresentou fortes evidências sobre polissomia incompleta em *S. officinarum* e *S. robustum*, baseado-se em pareamento preferencial parcial dos cromossomos de alguns grupos. Os mapas de ligação existentes atualmente para cana-de-açúcar representam alguns genótipos das espécies do gênero *Saccharum*. Entretanto, não existe um mapa construído a partir de uma população oriunda de cruzamento entre variedades comerciais, o que é de fundamental importância para a aplicação direta em programas de melhoramento e, também, para utilização dessas informações em programas de seleção assistida.

O estudo que mais se aproxima do mapeamento de variedades comerciais, foi desenvolvido por Grivet *et al.* (1996), no qual efetuou-se a construção de um mapa genético baseado em progênie resultante de autofecundação da variedade R570. O número de indivíduos da progênie utilizados para o mapeamento impossibilitou a visualização do comportamento cromossômico, mas resultou, através dos 408 marcadores SDRF mapeados, na formação de 96 grupos co-segregantes que puderam ser reunidos em 10 grupos homólogos. Os subsídios necessários para o mapeamento do gene de resistência à ferrugem tiveram base nesse estudo (Daugrois *et al.*, 1996, Asnaghi *et al.*, 2000). Em extensão aos estudos realizados para a população derivada de autofecundação da variedade R570, Hoarau (2000) promoveu cobertura de 1/3 do genoma utilizando 939 marcadores do tipo AFLP. Entretanto, estes marcadores apresentaram deficiência de cobertura da porção do genoma referente à *S. officinarum*. Um outro ponto refere-se ao fato desse tipo de cruzamento não ser utilizado na prática, uma vez, que a cana-de-açúcar é uma espécie alógama que apresenta elevada depressão por endogamia (Matsuoka, 1999a).

Apesar do grande número de estudos que vêm sendo realizados, os resultados obtidos ainda são incapazes de delinear o completo comportamento genômico da cana-de-açúcar. Assim, são ainda necessários trabalhos que venham a auxiliar na elucidação dos aspectos genéticos desta espécie.

O presente trabalho apresenta um mapa preliminar para híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar, obtidos a partir de variedades comerciais, SP80-180 e SP80-4966, construído com base em 189 marcadores SDRF.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foi utilizada uma progênie F_1 , constituída por 100 indivíduos, derivada do cruzamento entre duas variedades comerciais de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos). O cruzamento foi realizado na Estação Experimental da Copersucar em Camamu, BA-Brasil, entre as variedades comerciais SP80-180 (genitor feminino) e SP80-4966. Estas variedades apresentam comportamento contrastantes para características de importância agrônômica e industrial. A variedade SP80-180 apresenta alta produtividade de colmos, baixo teor de sacarose e suscetibilidade à doença denominada escaldadura (causada pela bactéria *Xanthomonas albilinean*). O genitor masculino, SP80-4966, apresenta baixa produção de colmos, alto teor de sacarose e resistência à escaldadura. A progênie F_1 resultante deste cruzamento foi plantada na estação experimental da Copersucar em Piracicaba-SP e serviu como fonte de material foliar para extração de DNA. Destas plantas também obteve-se as mudas para o plantio dos ensaios de produção.

Sondas

As sondas utilizadas foram selecionadas aleatoriamente de um Banco Genômico de *Saccharum spp.* construído por Burnquist (1991), e são denominadas de sondas SG, seguidas de um número de ordenação. Esta biblioteca é mantida pelo Centro de Tecnologia Copersucar, onde se encontra armazenada sob a forma de cultura bacteriana (*E.coli*) em glicerol, a - 70°C.

Para a confecção das sondas, os insertos de DNA foram obtidos dos plasmídeos pUC18 onde estavam clonados, através de amplificação por PCR. A reação consistiu de 0,5U de *Taq* polimerase (GIBCO/BRL), 1X a concentração do tampão para a enzima *Taq* polimerase, MgCl₂ 25 mM, dNTP 10mM, 0,75µM de cada primer CV72 (5'- ACGACGT TGTAACGACGGCCAGT-3') e CV76 (5'- AACAGCTATGACCATGATTACGCC-3'), e água para completar o volume final de 25µl. O programa utilizado para a amplificação envolveu um 1º ciclo de desnaturação por 2,5 min a 94°C seguidos de 30 ciclos, sendo cada um deles constituído por desnaturação por 1 min a 94°C, anelamento dos "primers" a 55°C por 2 min e extensão a 72°C durante 3 min, com 1 ciclo final de extensão a 72°C por 7 min. O produto amplificado foi quantificado em gel de agarose e posteriormente utilizado em marcações radioativas através do método de "Random Hexamer Labelling" (Feinberg e Vogelstein, 1983), usando-se o kit Rediprime II (Amersham), empregado de acordo com o protocolo do fabricante.

Extração de DNA e confecção das membranas

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo descrito por Hoisington *et al.* (1994), com modificações. A metodologia envolve basicamente extração do DNA em tampão CTAB, seguida de duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e uma extração final com fenol. O DNA foi ressuspendido em TE, quantificado e sua qualidade analisada em gel de agarose 0,8% (p/v).

O DNA extraído foi digerido separadamente, com quatro enzimas de restrição diferentes: *Dra* I, *Eco* RI, *Eco* RV e *Xba* I. As reações foram preparadas utilizando 20µg de DNA, 30µl do tampão da enzima (10X); 7,5µl de espermidina (0,1M); 6U de enzima de

restrição (10U/ μ l) e água esterilizada para completar o volume de 300 μ l. Em seguida efetuou-se a incubação à temperatura de 37°C “overnight”.

Para a confecção das membranas necessárias ao desenvolvimento da técnica de RFLP, foram aplicados 20 μ g de DNA (de cada amostra digerida) em géis de agarose 0,8% (p/v) e submetidos à eletroforese a 20mA por aproximadamente 22h. O DNA contido no gel foi transferido para membrana de Nylon (Hybond-N+, Amersham), baseando-se na técnica de transferência por capilaridade descrita por Southern (1975).

Na hibridização, as membranas foram incubadas por 18-24h à temperatura de 65°C em 5 ml da solução HYB (Na₂PO₄ 0,5M pH 7,2; BSA 1%; SDS 7%, esperma de salmão 100 μ g/ml) contendo a sonda SG selecionada e previamente marcada radioativamente com α -dCTP³². Posteriormente, as membranas foram submetidas a 3 soluções de lavagem: Solução I (SSC 2X, SDS 5%), Solução II (SSC 1X, SDS 5%) e Solução III (SSC 0,5X, SDS 5%), onde cada lavagem teve duração de 20 min à temperatura de 65°C. As membranas foram envolvidas em envelopes plásticos e expostas a um filme autoradiográfico X-Omat (Kodak) por pelo menos 7 dias.

Análises dos Marcadores Polimórficos e Construção do Mapa Genético

A análise de mapeamento em poliplóides foi baseada na metodologia de identificação de marcadores RFLP em dosagem única no genoma, desenvolvida por Wu *et al.* (1992), os quais são denominados "Single Dose Restriction Fragments" (SDRF).

Foram consideradas as melhores combinações entre as sondas selecionadas do Banco de DNA Genômico, denominadas SG, e 4 diferentes enzimas (*Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV e *Xba*I), quanto à visualização de bandas individuais presentes em um genitor e ausentes

no outro. Os marcadores foram avaliados para a segregação na proporção 1:1 por meio do teste estatístico χ^2 . Os marcadores foram avaliados para a segregação na proporção 1:1 por meio do teste estatístico χ^2 . Considerando-se o tipo de progênie estudada, marcadores em dosagem única segregando na progênie F₁ também podem ser encontrados quando o fragmento mostra-se monomórfico entre os genitores. Neste caso a segregação na progênie apresenta a proporção 3:1. Todos os marcadores encontrados foram identificados com o número da sonda previamente estabelecido na construção do Banco Genômico, seguido de letras do alfabeto em ordem decrescente de tamanho dos referidos fragmentos. Complementando essa identificação, acrescentou-se a proporção da segregação do marcador representadas por (1:1) ou (3:1). Conjuntamente aos marcadores declarados como possuindo segregação (1:1) na progênie de cruzamento, especificou-se a origem do fragmento com os símbolos P₁ e P₂ representando os genitores. Além disso, houve a adição das letras d (*Dra*I), ei (*Eco*RI), ev (*Eco*RV) ou x (*Xba*I) informando qual a enzima utilizada para a geração do marcador específico em combinação com determinada sonda. Todos os testes de segregação (1:1 ou 3:1) foram analisados considerando a correção Bonferroni para evitar o erro tipo I (Rice, 1989), ou seja, para controle do nível conjunto de significância.

Uma matriz de dados foi construída baseada na genotipagem de 100 indivíduos da progênie F₁, utilizando os marcadores SDRFs. Os marcadores apresentando os dois tipos de segregação foram analisados e integrados em um mesmo mapa utilizando o programa JoinMap v 3.0 para Windows (Ooijen e Voorrips, 2001). Os grupos de ligação foram construídos utilizando-se um "Lod Score" mínimo de 3 e máximo de 50% de recombinação. As frequências de recombinação, estimadas em análises multiponto foram convertidas em distância genética através da função de Kosambi (1944).

Resultados e Discussão

Polimorfismo

Foram utilizadas 83 sondas SG na avaliação de polimorfismo entre os genitores, digeridos com 4 enzimas de restrição. Consideraram-se apenas as melhores combinações sonda/enzima a serem empregadas na genotipagem da população segregante.

A seleção consistiu-se no número de bandas polimórficas visualizadas e na intensidade delas. Considerou-se que um número maior de fragmentos polimórficos em uma mesma hibridização aumenta a chance de encontrar pelo menos um marcador SDRF dentre eles em menor unidade de tempo. As bandas apresentando menor intensidade de sinal possuem maior probabilidade de serem a representação de uma região com baixo número de cópias, sendo possível estarem na dosagem única desejada.

Desta forma, cinquenta e cinco combinações sondas/enzima (66,3%) foram escolhidas. Foram gerados 112 fragmentos polimórficos. As outras 28 sondas (33,7%) avaliadas não demonstraram qualquer polimorfismo entre os genitores em combinação com nenhuma das 4 enzimas utilizadas (Figura 1).

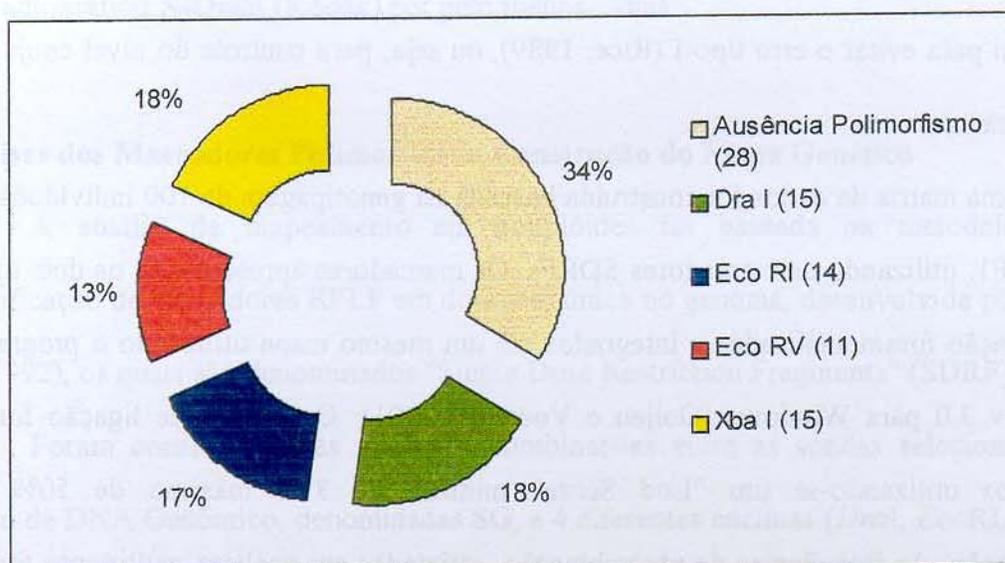


Figura 1. Comportamento de sondas SG em combinação com as enzimas *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* e *XbaI*. Ausência Polimorfismo, representa a porcentagem referente às 28 sondas que não demonstraram nenhum fragmento polimórfico entre os genitores. *DraI* (15), *EcoRI* (14), *EcoRV* (11) e *XbaI* (15), representam a proporção de sondas que geraram os melhores resultados com cada uma destas enzimas. Os números entre parentêses representam as quantidades de sondas para as quais foram utilizadas cada uma das enzimas.

Marcadores SDRFs

Os fragmentos polimórficos foram inicialmente avaliados quanto à dosagem com que se apresentavam no genoma em genotipagem realizada envolvendo apenas 14 indivíduos da população F_1 . Nesta avaliação, dos 112 fragmentos polimórficos observados entre os genitores, foram identificados 100 (89,3%) como marcadores SDRFs.

Considerando o tipo de progênie estudada, esta etapa permitiu a detecção de fragmentos monomórficos entre os genitores, mas que apresentavam-se segregantes nos indivíduos genotipados. Marcadores com essa característica também podem estar em dosagem única no genoma poliplóide de cana-de-açúcar quando a segregação na progênie apresenta a proporção 3:1.

Houve a detecção de mais 109 novos marcadores. Entretanto, o número de 14 indivíduos utilizados nesta etapa não fornece com confiança estatística a distinção de marcadores SDRFs de marcadores em outras dosagens. Assim, somente quando toda a progênie foi estudada, pôde-se ter o número exato de marcadores SDRF detectados.

Durante a genotipagem dos 100 indivíduos da população F_1 e baseado-se no comportamento segregante esperado para marcadores em dose única no genoma neste tipo de progênie, dos 109 novos marcadores identificados, 89 (81,7%) eram marcadores SDRFs.

Considerando um total de 221 marcadores encontrados, 189 marcadores eram marcadores em dosagem única (SDRF) no genoma da população F_1 estudada (Figura 2). Os outros marcadores detectados estavam em doses múltiplas no genoma (MDRF).

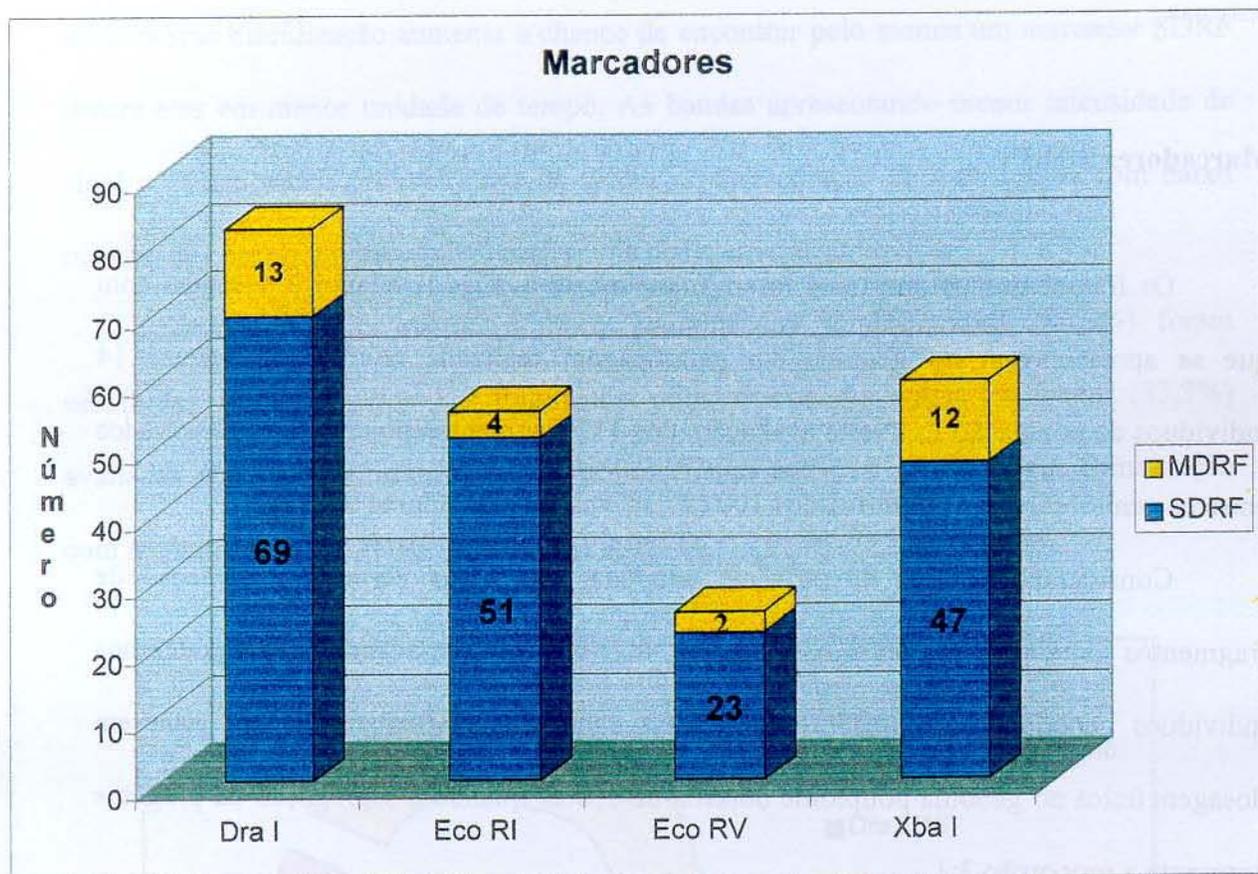


Figura 2. Número de marcadores detectados no mapeamento de uma população F_1 derivada do cruzamento entre duas variedades comerciais. MDRF, indica número de marcadores em doses múltiplas no genoma. SDRF, número de marcadores em dose simples. *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* e *XbaI*, enzimas utilizadas na hibridização com sondas SG geradoras de marcadores MDRF e SDRF.

Em comparação com os mapas construídos para as espécies *Saccharum spp.*, constatou-se que o número de marcadores em dose simples obtidos neste estudo em relação ao número de sondas utilizadas, é relativamente maior do que o inicialmente esperado. O índice elevado 85,5% (221/189) de marcadores RFLP em dosagem única no genoma da população F₁ derivada do cruzamento entre híbridos interespecíficos, supera os 73% encontrados por da Silva *et al.* (1993) para a espécie selvagem *S. spontaneum*, os 68% para *S. officinarum* (Guimarães, 1999), sendo similar ao encontrado para a variedade R570 (85%) estudada por Grivet *et al.* (1996).

Em um primeiro momento, estes resultados podem sugerir que há grande diversidade genética entre as variedades utilizadas no cruzamento para obtenção da população de mapeamento do projeto. Entretanto, a porcentagem de SDRFs semelhante a encontrada para a variedade R570 motivou a procura da origem das variedades envolvidas no cruzamento realizado para obtenção da população F₁ utilizada neste trabalho. A genealogia das variedades SP80-180 e SP80-4966 mostrou a existência de alguns clones ancestrais em comum (dados não mostrados). Este fato não é surpreendente considerando o pequeno número de genótipos envolvidos na geração de novas cultivares de cana-de-açúcar (Lima *et al.*, 2002).

A variabilidade genética é maior entre os clones de *S. spontaneum* que entre os de *S. officinarum* (Lu *et al.*, 1994). Assim, grande parte dos marcadores utilizados no estudo da população F₁ obtida por autofecundação da variedade R570 representou a variabilidade encontrada na porção de *S. spontaneum*, a qual participa do genoma das variedades comerciais (Hoarau, 2000). No presente estudo, não é possível saber se a porção polimórfica revelada pelas sondas RFLP são predominantemente de *S. spontaneum* ou não.

Desta forma, são necessárias investigações mais detalhadas para verificar se o grau médio de similaridade genética entre os genitores envolvidos no cruzamento F_1 utilizado neste trabalho pode interferir na obtenção de marcadores da porção *S. officinarum*. Estes estudos são necessários, uma vez que a autofecundação parece ter dificultado a avaliação da parte *S. officinarum* do genoma da variedade R570 (Hoarau, 2000), significando que a similaridade entre genitores leva à avaliação preferencial da porção do genoma representada por *S. spontaneum*.

Mapa Genético

A utilização de 189 marcadores SDRF no presente trabalho resultou na construção do primeiro mapa de ligação baseado em cruzamento entre duas variedades comerciais (híbridos interespecíficos) de cana-de-açúcar. Seguindo os critérios estabelecidos no desenvolvimento de outros mapas de ligação em cana-de-açúcar, definiu-se "Lod Score" 3 como sendo o melhor critério para formação dos grupos de ligação e frequência de recombinação 0,5.

Nestas condições, 61,9% (117/189) dos marcadores permaneceram sem ligação com qualquer outro marcador após análise multiponto. Essa situação é perfeitamente esperada quando considera-se que a constituição do genoma de um cruzamento entre variedades comerciais de cana-de-açúcar envolve cerca de 100 a 200 cromossomos, sendo necessária a formação de até 400 grupos de cosegregações para promover a saturação de um mapa deste tipo. Desta forma, há grande probabilidade de que o baixo número de marcadores (189) utilizados na construção do mapa represente regiões diferentes e localizadas em porções distanciadas no genoma, ou mesmo em cromossomos diferentes.

A Tabela 1 apresenta o comportamento geral dos 221 marcadores RFLP gerados por 55 diferentes combinações sonda genômica/enzima de restrição. O mapa apresentou uma cobertura de 480 cM do genoma de cana-de-açúcar, efetuados por 33 grupos de ligação, englobando 72 marcadores ligados. Considerando a origem similar (mesma sonda/enzima) de pelo menos 1 dos marcadores que constituíram os grupos, 27 destes grupos foram reagrupados em 7 prováveis grupos homólogos (Figura 3).

Tabela 1. Detalhamento das características dos marcadores encontrados nas hibridizações envolvendo cada uma das combinações sonda/enzima utilizadas.

Enzima	Sonda SG	Número de marcadores	Número de marcadores com segregação 1:1	Número de marcadores com segregação 3:1	número de marcadores em doses múltiplas	Número de marcadores não ligados	Número de marcadores ligados
DraI	SG4	2 (A-B)*	2 (A,B)	-	-	-	2 (A,B)
	SG16	10 (A-J)	6 (A,B,C,D,I,H)	2 (E,F)	2 (G,I)	6 (A,B,C,E,F,H)	2 (D,I)
	SG21	8 (A-H)	6 (A,C,D,E,G,H)	2 (B,F)	-	8 (A,B,C,D,E,F,G,H)	-
	SG38	7 (A-G)	2 (A,C)	2 (B,D)	3 (E,F,G)	3 (B,C,D)	1 (A)
	SG25	2 (A-B)	-	2 (A,B)	-	2 (A,B)	-
	SG50	8 (A-H)	5 (A,B,D,G,H)	2 (E,F)	1 (C)	3 (A,B,F)	4 (D,E,G,H)
	SG66	6 (A-F)	2 (A,B)	3 (C,E,F)	1 (D)	2 (A,E)	3 (C,B,F)
	SG91	9 (A-I)	5 (A,C,E,F,G)	4 (B,D,H,I)	-	1 (D)	8 (A,B,C,E,F,G,H,I)
	SG96	9 (A-I)	5 (A,C,E,F,G)	4 (B,D,H,I)	-	1 (E)	8 (A,B,C,D,F,G,H,I)
	SG105	6 (A-F)	2 (A,E)	2 (B,D)	2 (C,F)	2 (A,D)	2 (B,E)
	SG121	4 (A-D)	3 (A,B,D)	1 (C)	-	4 (A,B,C,D)	-
	SG134	3 (A-C)	-	1 (A)	2 (B,C)	1 (A)	-
	SG140	4 (A-D)	1 (D)	2 (B,C)	1 (A)	3 (B,C,D)	-
	SG148	2 (A-B)	1 (B)	1 (A)	-	2 (A,B)	-
	SG212	2 (A-B)	-	1 (A)	1 (B)	-	1 (A)
EcoRI	SG11	6 (A-F)	3 (A,B,D)	3 (C,E,F)	-	6 (A,B,C,D,E,F)	-
	SG22	1 (A)	1 (A)	-	-	-	1 (A)
	SG26	7 (A-G)	4 (A,B,D,E)	1 (G)	2 (C,F)	3 (A,E,G)	2 (B,D)
	SG29	3 (A-C)	-	3 (A,B,C)	-	3 (A,B,C)	-
	SG39	5 (A-E)	1 (E)	4 (A,B,C,D)	-	5 (A,B,C,D,E)	-
	SG46	3 (A-C)	2 (A,B)	1 (C)	-	3 (A,B,C)	-
	SG57	2 (A-B)	2 (A,B)	-	-	1 (A)	1 (B)
	SG99	5 (A-E)	-	3 (A,C,D)	2 (B,E)	3 (A,C,D)	-
	SG111	9 (A-I)	5 (A,C,D,H,I)	4 (B,E,F,G)	-	7 (C,D,E,F,G,H,I)	2 (A,B)
	SG141	4 (A-D)	1 (C)	3 (A,B,D)	-	4 (A,B,C,D)	-
	SG187	3 (A-C)	3 (A,B,C)	-	-	3 (A,B,C)	-
	SG334	1 (A)	1 (A)	-	-	1 (A)	-
	SG338	3 (A-C)	3 (A,B,C)	-	-	2 (A,C)	1 (B)
	SG351	3 (A-C)	2 (B,C)	1 (A)	-	3 (A,B,C)	-
	EcoRV	SG1	2 (A-B)	2 (A,B)	-	-	1 (A)
SG8		3 (A-C)	1 (B)	1 (A)	1 (C)	1 (A)	1 (B)
SG12		4 (A-D)	-	3 (A,C,D)	1 (B)	2 (A,C)	1 (D)
SG18		2 (A-B)	1 (B)	1 (A)	-	2 (A,B)	-
SG23		3 (A-C)	2 (B,C)	1 (A)	-	-	2 (C,A)
SG44		2 (A-B)	1 (B)	1 (A)	-	2 (A,B)	-
SG55		3 (A-C)	2 (A,B)	1 (C)	-	-	3 (A,B,C)
SG62		1 (A)	1 (A)	-	-	-	1 (A)
SG135		1 (A)	1 (A)	-	-	1 (A)	-
SG192		3 (A-C)	2 (B,C)	1 (A)	-	3 (A,B,C)	-
SG224		1 (A)	-	1 (A)	-	1 (A)	-
Xba I	SG2	1 (A)	1 (A)	-	-	1 (A)	-
	SG6	2 (A-B)	2 (A,B)	-	-	2 (A,B)	-
	SG7	3 (A-C)	1 (B)	2 (A,C)	-	1 (C)	2 (B,A)
	SG13	2 (A-B)	1 (A)	-	1 (B)	1 (A)	-
	SG30	4 (A-D)	1 (C)	2 (B,D)	1 (A)	3 (B,C,D)	-
	SG41	10 (A-J)	4 (B,E,G,J)	6 (A,C,D,F,H,I)	-	3 (B,C,G)	7 (A,D,E,F,H,I,J)
	SG48	3 (A-C)	2 (A,B)	1 (C)	-	1 (A)	2 (B,C)
	SG58	1 (A)	1 (A)	-	-	1 (A)	-
	SG61	2 (A-B)	2 (A,B)	-	-	2 (A,B)	-
	SG93	12 (A-L)	1 (D)	6 (C,E,H,I,J,L)	5 (A,B,F,G,M)	-	7 (C,D,J,E,H,I,L)
	SG94	8 (A-H)	1 (D)	4 (C,E,G,H)	3 (A,B,F)	-	5 (C,D,E,G,H)
	SG131	4 (A-D)	1 (D)	2 (A,B)	1 (C)	3 (A,B,D)	-
	SG155	3 (A-C)	1 (A)	1 (B)	1 (C)	1 (B)	1 (A)
	SG157	2 (A-B)	-	2 (A,B)	-	1 (A)	1 (B)
	SG359	2 (A-B)	-	2 (A,B)	-	2 (A,B)	-
Total	4	55	221	100	89	32	117

* 2 (A-B): As letras maiúsculas estão em ordem alfabética e são a identificação dos marcadores. A quantidade de letras corresponde ao número na frente do parêntese, o qual indica a quantidade de marcadores obtidos para cada combinação sonda/enzima.

Grupos de Ligação Independentes

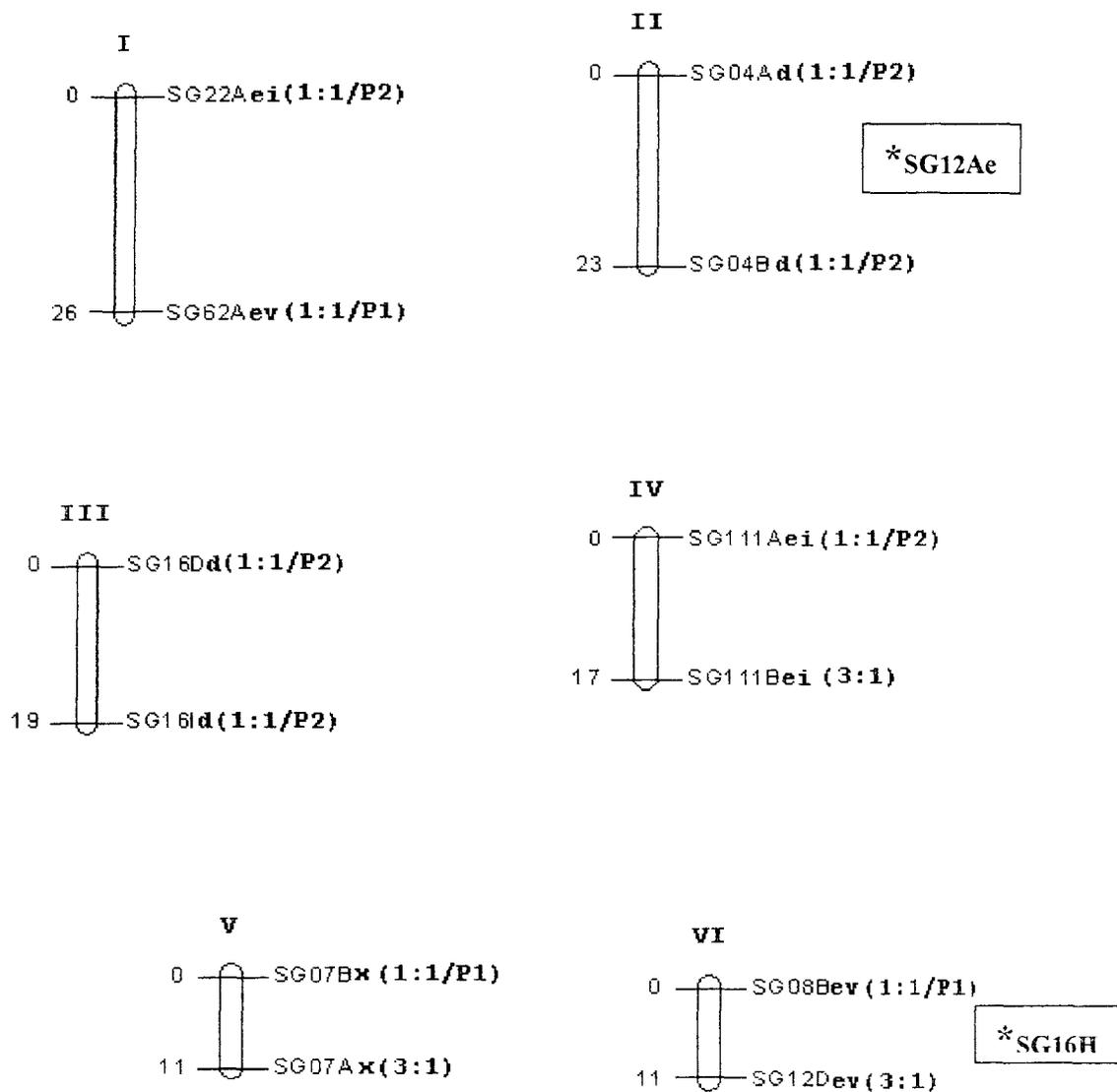


Figura 3. Continuação na próxima página...

* marcadores não ordenados

Grupo Homólogo VII

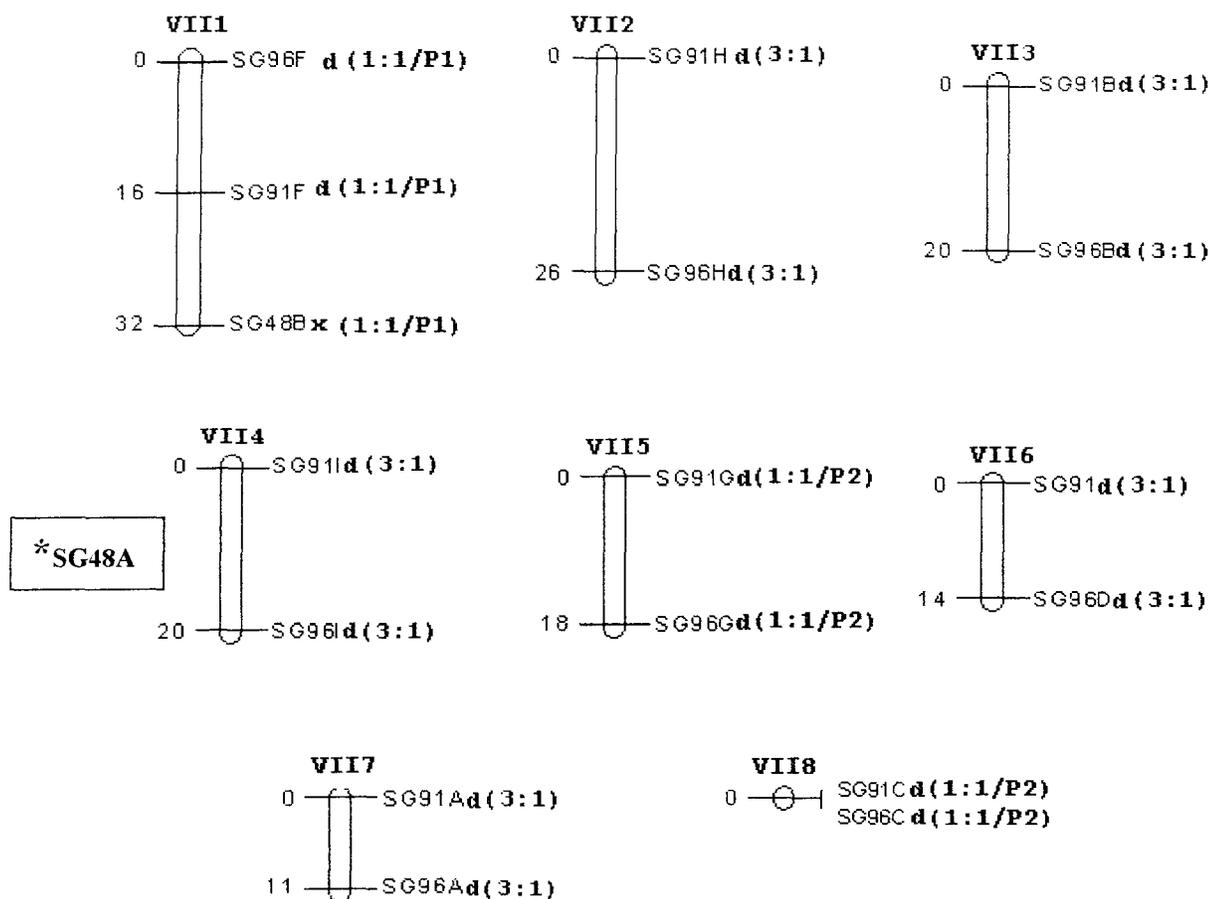
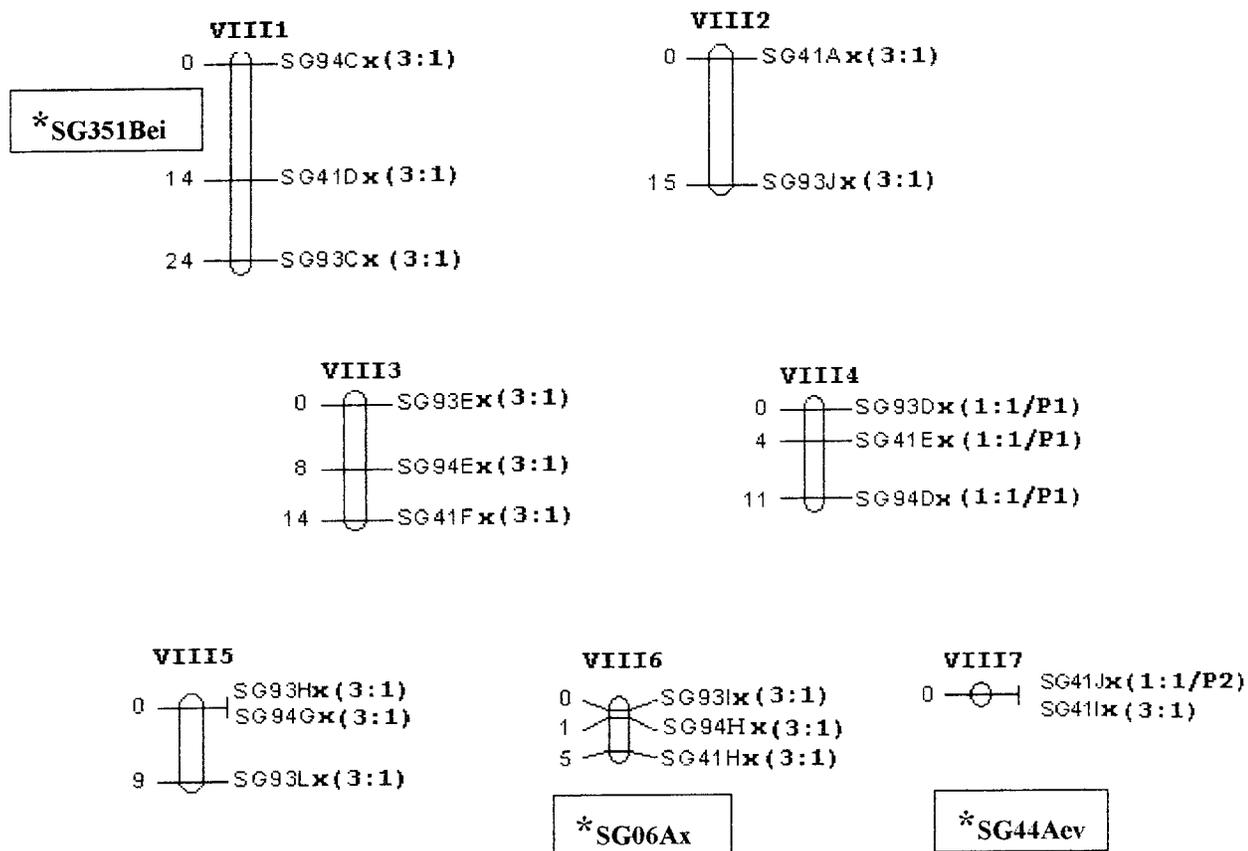


Figura 3. Continuação na próxima página...

* marcadores não ordenados

Grupo Homólogo VIII



Grupo Homólogo IX

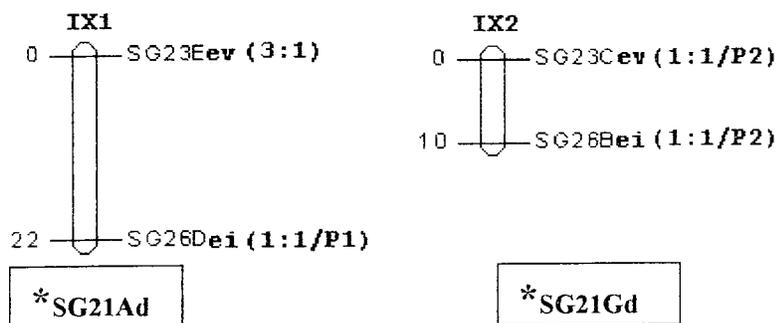
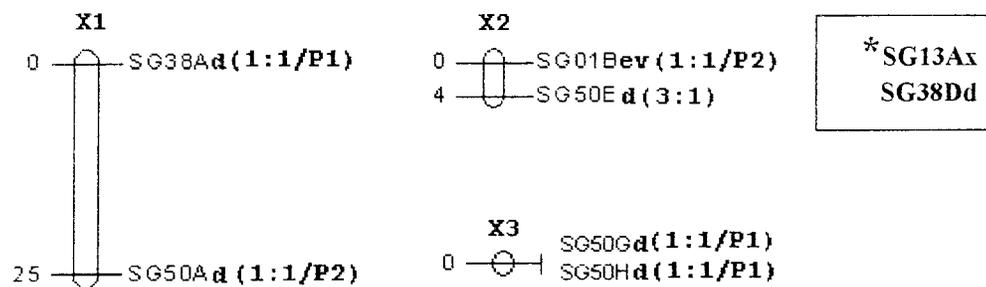


Figura 3. Continuação na próxima página...

* marcadores não ordenados

Grupo Homólogo X



Grupo Homólogo XI

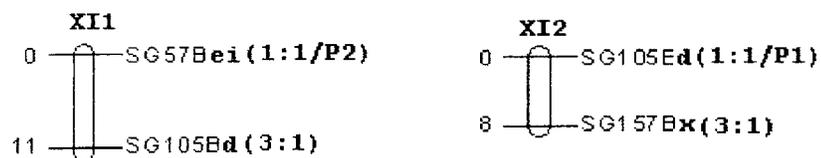
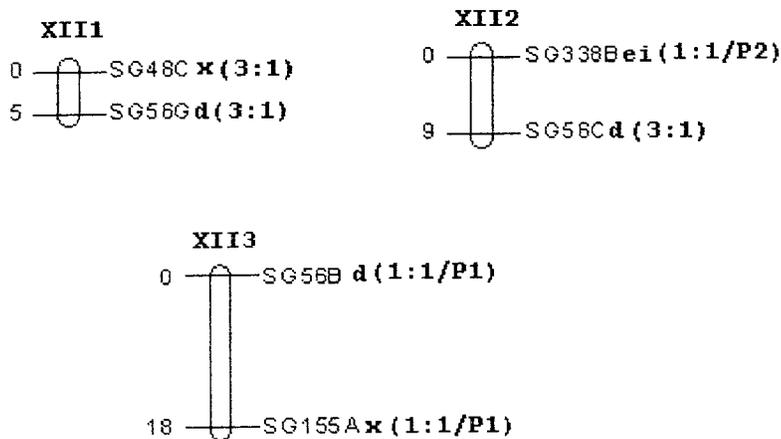


Figura 3. Continuação na próxima página ...

* marcadores não ordenados

Grupo Homólogo XII



Grupo Homólogo XIII

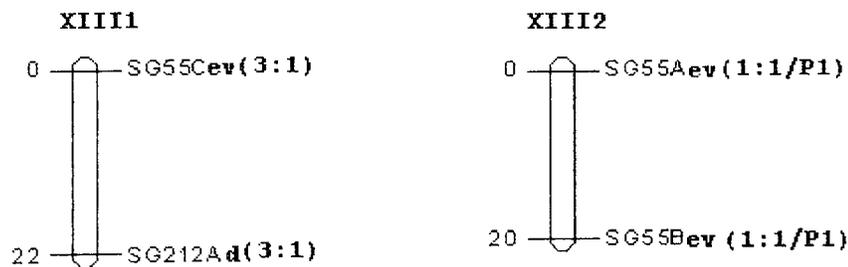


Figura 3. Mapa genético de ligação obtido a partir da análise da progênie F1 do cruzamento entre as variedades comerciais de cana-de-açúcar SP80-180 e SP80-4966. Este mapa foi obtido a partir da análise de 189 marcadores SDRFs, utilizando-se "Lod Score" 3 e frequência de recombinação 0,5. Houve formação de 33 grupos pela ligação envolvendo 72 marcadores. Destes grupos, 27 foram reagrupados em 7 prováveis grupos homólogos. Cento e dezessete marcadores permaneceram não ligados a nenhum outro marcador.

* marcadores não ordenados

Baseando-se na propriedade transitiva (Mather, 1938), determinados marcadores SDRF foram agrupados em um mesmo grupo de ligação. Entretanto, somente o agrupamento de marcadores pode favorecer superestimativas sobre a constituição dos grupos de ligação, além de negligenciar informações sobre o efetivo posicionamento deles. A perda deste tipo de informação é relevante em estudos de melhoramento envolvendo mapas genéticos, como a utilização desses marcadores em processos de seleção assistida (MAS) (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Assim, após a formação dos grupos de ligação, é essencial que seja requisitado um rearranjo linear dos marcadores genéticos nesses grupos.

O conjunto dessas análises permitiu que ligações entre determinados marcadores fossem desconsideradas, sendo estes seguramente excluídos dos grupos de ligação. Porém, em alguns casos, mesmo com confirmação estatística da ligação entre determinados marcadores houve dúvidas sobre a presença desses marcadores na constituição de determinados grupos. Isso ocorreu quando foi requisitado uma ordenação destes marcadores em seus respectivos grupos de ligação. Em outras palavras, foi possível detectar grupos de ligação, mas nem sempre conseguiu-se ordenar os marcadores dentro deles.

A Tabela 2 apresenta 10 marcadores que foram excluídos do mapa construído. Os marcadores especificados não puderam ser ordenados inequivocamente com os demais marcadores de seus grupos de ligação. Esses marcadores não apresentaram coerência na ordenação efetuada com os marcadores de seus grupos, mesmo tendo sido respeitados os critérios envolvidos na ligação desses marcadores com os outros do grupo formado.

Tabela 2. Marcadores que não puderam ser ordenados.

Marcadores sem ordenação coerente ao grupo a que estavam ligados	Grupos que apresentaram marcadores que não obtiveram ordenação
SG12Aev(3:1)	II
SG16Hd(1:1)	VI
SG48Ax(1:1)	VII4
SG351Bei(1:1)	VIII1
SG06Ax(1:1)	VIII6
SG44Aev(1:1)	VIII7
SG21Ad(1:1)	IX1
SG21Gd(1:1)	IX2
SG13Ax(1:1)	X2
SG38Dd(3:1)	X2

A ocorrência desses fenômenos pode ser explicada com base em aspectos estatísticos envolvidos no tipo de marcador (dominante ou co-dominante) e segregação esperada em mapeamento de uma população específica.

Em uma população F_1 , derivada de cruzamento entre variedades comerciais de cana-de-açúcar, a detecção de marcadores SDRFs apresenta aspectos peculiares que devem ser considerados. Uma limitação do método de mapeamento baseado em marcadores em dose simples para poliplóides é a capacidade que eles têm de explorar somente ligações em fase de acoplamento (Al Janabi *et al.*, 1993; Da Silva *et al.*, 1993).

A utilização de marcadores RFLP em população derivada de cruzamento de indivíduos altamente heterozigotos possibilita muitas configurações de alelos. Assim, em uma população F_1 obtida do cruzamento entre variedades de cana-de-açúcar dois tipos de segregações podem representar os marcadores SDRF. A segregação esperada assemelha-se

as mesmas obtidas em uma análise de retrocruzamento (1:1) ou como provenientes de uma população F_2 (3:1) derivadas de linhagens puras (Tabela 1).

Os marcadores SDRFs 1:1 e SDRF 3:1 distinguem-se quanto a sua característica informativa. Tal situação deve-se ao fato de um marcador SDRF 1:1, funcionar como uma estratégia "pseudo-testcross", evitando a condição dominante na fase de repulsão em uma progênie F_1 (Liu, 1998). Assim, este tipo de marcador fornece a mesma quantidade de informação que um marcador co-dominante em modelo de retrocruzamento.

Entretanto, quando consideram-se os marcadores SDRF 3:1, que apresentam-se como se fossem derivados de uma progênie F_2 , não há informações para a separação dos heterozigotos de homozigotos. Assim, perde-se os dados sobre as classes recombinantes que identificariam ligações em fase de repulsão desses marcadores (Wu *et al.*, 1992; Liu, 1998).

A análise conjunta considerando o agrupamento de marcadores co-dominantes e dominantes, ou para marcadores dominantes em fase de repulsão, pode criar vários problemas para a construção do mapa devido à multiplicidade de classes a serem consideradas para a formação dos grupos de ligação, sendo necessário um número elevado de indivíduos na progênie a ser analisada (Liu, 1998).

A fase de ligação para marcadores dominantes é aleatória, representando dois grupos apresentando os marcadores ligados em fase de acoplamento. Entretanto, a ligação entre marcadores desses dois grupos sempre estará em fase de repulsão. Assume-se que os dois grupos possam ser claramente identificados, quando construídos mapas individuais para cada grupo pois, os marcadores dentro dos grupos de ligação, em cada um dos mapas, estão em acoplamento. Entretanto, quando tenta-se estabelecer uma conexão entre os dois

mapas, as fases de repulsão apresentam-se como uma barreira pela não informação dos heterozigotos (Liu, 1998).

Acredita-se que os eventos de não ordenação observado nos marcadores da Tabela 2 tem explicação quando consideram-se as dificuldades de agrupamento dos marcadores em situações onde os locos ligados estão em múltiplas fases de ligação (Ritter *et al.* 1990; Liu, 1998).

A estimativa da distância e a ordenação dos SDRFs em fase de repulsão, através dos dados de segregação, é ineficiente em interações dissômicas e praticamente impossível em interações polissômicas, pois neste caso seria necessária uma população extremamente grande para o mapeamento (Wu *et al.*, 1992). Esta questão pode ser solucionada com marcadores em dose dupla ou dose tripla (da Silva, 1996), complementando a análise de marcadores em dose simples. Entretanto, a inexistência de pacotes computacionais envolvendo este tipo de análise retarda os estudos utilizando marcadores em dose dupla ou tripla.

Uma segunda explicação para a não ordenação baseia-se em aspectos biológicos. Estudos de comparação dentro da tribo Andropogoneae demonstraram a existência de grande colinearidade entre cana-de-açúcar e sorgo. O sorgo apresenta muitas regiões do genoma duplicadas, tendo como padrão de duplicação cromossômica a persistência da ordem dos genes nos segmentos cromossômicos. Como a cana-de-açúcar é um parente muito próximo do sorgo e, considerando que eventos de duplicação tenham ocorrido anteriormente à divergência destas duas espécies, acredita-se que a organização de seus genomas seja semelhante (Paterson, 1996). Uma forma de averiguar tal suposição, é a constatação de presença de ligações entre mesmos marcadores (designados com mesmo número e letra) em diferentes grupos de ligação no mapa construído para cana-de-açúcar.

O mapa obtido (Figura 3) apresenta poucos grupos de ligações formados e com número pequeno de marcadores ligados, sendo insuficiente para detectar regiões repetidas no genoma de cana-de-açúcar. Conseqüentemente, não é possível verificar se há um padrão de ordenação dos genes nessas regiões. Entretanto, situações particulares obtidas na configuração de alguns grupos de ligações fornecem indícios de prováveis duplicações.

Para explicar este fenômeno de marcadores ligados 2 a 2 que não foram ordenados 3 a 3, será utilizado o exemplo a seguir, considerando-se os marcadores X, Y e Z, sendo que X está ligado a Y e Z.

As frequências de recombinação existentes entre X e Y e entre X e Z estão dentro do limite esperado para supor-se, com confiança, a ligação entre esses marcadores. Porém, quando tentou-se ordenar esses 3 marcadores não foi possível obter um alinhamento coerente. Para a ordenação, os marcadores Y e Z são considerados como não localizados na mesma região, apesar de se apresentarem fortemente ligados a um marcador em comum (o X). Além disso, a distância existente entre Y e Z em relação às distâncias apresentadas entre Y-X e Z-X mostrou-se discordante, havendo portanto, dificuldades para colocá-los em um mesmo grupo. Estas controvérsias poderiam sugerir baixa qualidade dos dados, porém, a formação de grupos de ligação contendo marcadores provenientes dessas mesmas sondas sem a presença de problemas de ordenação de marcadores e, considerando a presença de grupos homólogos, (marcador SG48B no grupo homólogo VII; marcador SG38A no grupo homólogo XI; marcadores 16D e 16I no grupo de ligação independente III/Figura 3), demonstraram que este fenômeno é específico a tais regiões, sendo necessários maiores estudos para compreendê-los.

Sugere-se que a ordenação em tais regiões foi impossível devido a coexistência de ligação de um marcador (ou de uma sequência de marcadores ligados) à diferentes grupos de ligação.

Uma região homeóloga pode ser rastreada com base no comportamento de pelo menos 3 marcadores, sendo 1 dos marcadores comum à constituição de dois grupos de ligações distintos, representando detecção de duplicações de locos no genoma. Isto é, X e Y realmente estão ligados e X e Z também apresentam ligação correta, porém o marcador X, nos dois casos, não corresponde a uma mesma região, e sim, a segmentos cromossômicos que estão em repetições ao longo do genoma. Os grupos de ligação que apresentaram problemas de ordenação dos marcadores provavelmente possuem a presença de regiões homeólogas, identificadas com base na co-ocorrência de apenas 1 dos marcadores. A baixa saturação do mapa obtido não permite a identificação correta das duplicações em regiões homeólogas, impedindo assim a confirmação da hipótese anteriormente descrita para explicar a ausência de ordenação de alguns marcadores.

Observando somente os grupos que apresentaram marcadores ligados, não ocorrendo variação dos grupos mesmo com variação dos critérios estatísticos utilizados para obtê-los, como por exemplo aumento de "Lod Score", foram observadas várias particularidades, relatadas a seguir. Informações disponíveis obtidas a partir de outros estudos de mapeamento de cana-de-açúcar e espécies a ela relacionadas também foram consideradas (da Silva *et al.*, 1993a; da Silva *et al.*, 1995; Grivet *et al.*, 1996; Paterson, 1996; Guimarães *et al.*, 1997; Ming *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 1999; Hoarau, 2000).

Algumas combinações sonda/enzima utilizadas nesse trabalho, identificaram grande número de marcadores SDRF em uma única genotipagem.

Uma vez obtido o total de grupos de ligação, eles foram reorganizados considerando-se os prováveis cromossomos homólogos, os quais foram detectados observando-se os grupos de ligação que estabelecem ligações entre marcadores provenientes de mesmas sondas (da Silva *et al.*, 1993a). Assim, os 33 grupos de ligação formados foram rearranjados em 13 grupos (Figura 3), com base na origem (sonda) dos marcadores que se apresentaram ligados.

A alogamia e a poliploidia presentes em cana-de-açúcar podem resultar na existência de locos com elevada heterozigosidade entre os diferentes conjuntos de cromossomos homólogos. Estas regiões podem ser identificadas quando se estabelece uma função bijetora entre diferentes marcadores de mesmas sondas, identificados inicialmente como fazendo parte de grupos homólogos.

Os grupos I a VI (Figura 3) apresentaram marcadores ligados que não foram encontrados em nenhum dos outros grupos formados, portanto, cada um dos grupos contém somente 1 grupo de ligação em sua constituição. Quatro grupos de ligação (II, III, IV e V), apresentaram ligação entre marcadores provenientes de uma única sonda. Os marcadores individuais, provenientes de uma mesma combinação sonda/enzima, detectam diferentes regiões no genoma de poliplóides com mesma homologia. Assim, estes marcadores podem representar um mesmo loco em cromossomos homólogos. Entretanto, além da existência de regiões semelhantes, a configuração de ligação dos grupos II, III, IV e V indica proximidade destas regiões, uma das outras, em cada grupo de ligação. Imagina-se que este tipo de padrão obtido, nos grupos acima destacados, não represente regiões pertencentes a cromossomos homólogos, mas indique duplicações no genoma.

Nos demais grupos de ligação obtidos foi observado que grupos de ligação apresentavam marcadores diferentes, mas provenientes de uma mesma sonda/enzima, sendo, desta forma, agrupados no que denominou-se grupo homólogo.

O conjunto denominado como grupo homólogo VII envolveu 8 grupos de ligação, os quais são constituídos pela ligação de dois marcadores provenientes das sondas SG91 e SG96. Um dos grupos de ligação do grupo homólogo VII, classificado como VIII1, apresentou também o marcador SG48B. O grupo de ligação VII4 também apresentou um terceiro marcador ligado, proveniente dessa mesma sonda, o qual foi identificado como SG48I. Entretanto, não foi possível estabelecer uma ordenação coerente entre os marcadores do grupo de ligação VII4 devido à insuficiência de marcas para confirmar a posição correta do marcador (Tabela 2).

Provavelmente outros marcadores obtidos com a sonda SG48 também estejam ligados aos marcadores obtidos com as sondas SG96 e SG91, porém, a baixa saturação desta região e a grande distância existente entre os marcadores, inviabilizou a observação de ligação entre os marcadores obtido das sondas SG48 e SG96-SG91 (dados não mostrados).

O grupo homólogo VIII apresentou a reunião de 7 grupos de ligação. Destes, 4 apresentaram ligação de marcadores identificados com 3 sondas SG: SG93, SG94 e SG41 (grupos de ligação VIII1, VIII3, VIII4, VIII6/Figura 3). Os outros grupos de ligação do grupo homólogo VIII não apresentaram ligação envolvendo marcadores obtidos das 3 sondas relatadas. Eles foram considerados como sendo do grupo homólogo VIII, devido à presença de combinações de ligações entre os marcadores destas 3 sondas (grupos de ligação VIII2;VIII5, VIII7/Figura 3).

Nos grupos de ligação VIII5, VIII7, do grupo homólogo VIII, encontraram-se ligações entre marcadores proveniente de uma mesma sonda. O grupo de ligação VIII5 apresentou o mesmo tipo de ligação encontrada nos grupos de ligação independentes II, III, IV e VI, podendo portanto, considerar que provavelmente, ele possui uma região duplicada. No grupo de ligação VIII7, apesar de haver 2 marcadores obtidos da mesma sonda SG41 (SG41J e SG41I), eles não estavam ligados, mas colocados em mesma posição sem apresentar frequência de recombinação. Tal situação provavelmente indica que as 2 seqüências reveladas pelas sondas SG41 não são repetidas, não havendo portanto duplicações nesta região. Se o 3º marcador (SG44A), indicado na Tabela 2, estivesse ligado a esse grupo de ligação, possivelmente representaria a identificação de cromossomos homólogos, onde SG41I e SG41J seriam alelos de um loco em heterozigose ligados a um loco em homozigose (SG44A).

Além dos marcadores que caracterizaram os grupos de ligação pertencentes ao grupo homólogo VIII, se não houvesse problemas de ordenação em alguns grupos de ligação deste grupo homólogo, seriam encontrados os marcadores SG44A e SG6A nos grupos VIII6 e VIII7 (Tabela 2), respectivamente. Como não foram observadas ligações entre outros marcadores provenientes dessas duas sondas (SG6 e SG44) nos outros grupos de ligação que compõem o grupo homólogo VIII, é difícil identificar repetições de seqüências associadas às duas sondas nos diferentes grupos de ligação deste grupo homólogo. Provavelmente este fato ocorreu devido ao pequeno número (2) de marcadores gerados por estas duas sondas (SG6A e SG6B; SG44A e SG44B/ Tabela 1).

O grupo homólogo IX, apresentou ligação entre os marcadores identificados pelas sondas SG23 e SG26. Há possibilidade de que marcadores originados da sonda SG21 também estejam ligados aos dois grupos formados (Tabela 2). Entretanto, devido ao

pequeno número de marcadores originados pela sonda SG23 (somente 3 marcadores: SG23A, SG23B e SG23C/ Tabela 1), estas ligações não puderam ser confirmadas.

Observou-se que mesmos marcadores ligados, presentes em diferentes grupos de ligação de um mesmo grupo de homólogos, podem se apresentar diferenças entre si. Tal fato é atribuído a diferentes frequências de recombinação entre as mesmas regiões dos grupos de ligação de um grupo homólogo.

A análise dos grupos de ligação obtidos supõe que os marcadores provenientes de uma mesma sonda possam identificar alelos nos diferentes grupos de ligação. Entretanto, nos grupos homólogos X a XIII não se verificou ligações entre marcadores provenientes de pelo menos duas mesmas sondas. Assim, cada um destes grupos homólogos foi constituído baseando-se na presença de marcadores provenientes de 1 única sonda, a qual participou do grupo de ligação. A saturação dessas regiões permitirá o acréscimo de marcadores com origem coincidente. Por exemplo, o marcador SG38D, apesar de ligado ao grupo de ligação X2 do grupo homólogo X não apresentou ordenação, tendo portanto, sido desconsiderado. Se ele pudesse ter sido ordenado, o resultado obtido indicaria ligação entre marcadores da sonda SG38 e SG50 (grupo XI).

O grau de conservação entre as seqüências repetidas nos cromossomos homólogos e homeólogos, encontradas nos genomas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* e presentes em variedades comerciais, ainda é desconhecido. O modelo evolutivo proposto para *Saccharum spp.* pode apresentar variações e distorções da organização genômica verificada em outras espécies como observada no genoma do sorgo.

A baixa saturação do mapa obtido neste trabalho não é um fator ligado apenas ao pequeno número de marcadores utilizados (189), mas também é resultante da dificuldade de detecção de marcadores informativos em um genoma onde há a coexistência de alelos

simples e múltiplos e número de cromossomos irregular nas várias possíveis classes homólogas. A natureza híbrida das variedades de cana-de-açúcar também interfere na razão de segregação devido ao comportamento dos cromossomos no pareamento durante a meiose. Outro ponto a ser considerado é que marcadores com segregação 3:1 ligados em repulsão podem não permitir a estimativa da frequência de recombinação entre eles.

Inferências definitivas sobre alelismos e regiões repetidas só poderão ser apresentadas quando houver maior saturação do mapa aqui desenvolvido para híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar e, assim, as especulações feitas neste trabalho poderão ser ampliadas e confirmadas.

Se os grupos homólogos formados utilizando como base a ligação de marcadores provenientes da mesma sonda forem confirmados, conclui-se que apesar de uma grande quantidade de marcadores RFLP gerados pela mesma sonda não ampliarem as regiões mapeadas do genoma, estes podem auxiliar em análises de regiões e grupos de cromossomos homólogos. Isto ocorre porque ligações entre marcadores provenientes de uma mesma sonda podem identificar grupos de cromossomos homólogos.

Assim, duas possibilidades, não mutuamente exclusivas, foram sugeridas para explicar os grupos de ligações obtidos neste trabalho: 1) detecção de regiões repetidas no genoma e 2) detecção de alelos.

Comparação de marcadores com outros mapas do gênero *Saccharum*.

O pequeno tamanho relativo dos cromossomos em *Saccharum spp.*, observado citologicamente, sugere que com o uso de poucos marcadores é possível efetuar a cobertura de um cromossomo inteiro, simplificando o processo de localização dos genes ou

a identificação integral de cromossomos (Prince, 1963). Além disso, a possibilidade de existirem muitas regiões com duplicação de genes no genoma (Dufour *et al.*, 1997; Guimarães *et al.*, 1997; Ming *et al.*, 1990) sugere que a eficiência de cobertura do genoma com a utilização de poucas sondas geradoras de muitos marcadores do tipo SDRFs seria comparada ao uso de muitas sondas geradoras de mesmo número de marcadores.

Os estudos de mapeamento envolvendo *Saccharum spp.* e marcadores RFLP, realizados até o momento, utilizaram diferentes fontes de DNA como sonda. Considerando somente as sondas provenientes do banco de sondas genômicas constituído por Burquinst (1991) e a característica de transferibilidade desse tipo de marcador, foram feitas comparações do mapa e resultados obtidos no presente trabalho com outros mapas construídos. Tais comparações buscaram verificar a ocorrência de grupos de ligação envolvendo associações entre mesmos marcadores nos diferentes mapas.

A localização de marcadores em comum permite estabelecer vínculos entre os mapas, possibilitando a identificação do padrão de contribuição das diferentes espécies nas variedades comerciais (híbridos interespecíficos) de cana-de-açúcar. Grivet, *et al.* (2002) estimaram que um gene com localização em um único loco, ou seja, sem considerar existência de repetições em regiões homeólogas, apresenta aproximadamente 10 cópias, das quais 8 ou 9 seriam herança de *S. officinarum* e 1 ou 2 de *S. spontaneum*.

A Tabela 3 mostra as relações entre o mapa construído em nosso estudo e os mapas existentes para 2 espécies do gênero *Saccharum spp.*: *S. spontaneum* e *S. officinarum* (da Silva *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 1999), as quais têm participação na formação do genoma das variedades cultivadas de cana-de-açúcar. O mapa construído para a variedade R570 (Grivet *et al.*, 1996), que possui os dois genomas em sua constituição, tendo sido originada por autofecundação, também foi analisado junto com demais mapas.

Tabela 3. Relações entre as sondas SG utilizadas em trabalhos de mapeamentos para genótipos de espécies do gênero *Saccharum* spp..

Sondas SG (Boupairst, 1991)	Grupos de Ligação mapeado construído para <i>S. spontaneum</i> (Da Silva <i>et al.</i> , 1995)	Grupos de Ligação no mapa construído para <i>S. officinarum</i> (Gamarões <i>et al.</i> , 1996)	Grupos de Ligação no mapa construído a partir da autofecundação da Varietal 1570 (Cavet <i>et al.</i> , 1996)	Grupos de Ligação do mapa construído para Hibridos interespecíficos (e presençantes de variáveis com-reais)
SG4	LG15(GH8)	#	#	II(G)
SG12	LG1(GH1)/LG(GH1)/LG8(GH1)	#	(GHV),IV2(GHV)/IV1(GHV)/V5V1(GHV)/V6V1(G-	V(G)
SG21	LG2(G1)	#	#	não ordenado(GHIX1)
SG26	LG2(GH2); LG45(GH7); LG61(GH7)	GRUPO1;GRUPO4;GRUPO11	#	IX1(GHIX1)/IX2(GHIX)
SG29	LG4(GH8)/LG8(GH8)	#	V1(GH-V),V2(GH-V),V3(GH-V),V4(GH-V)	-
SG30	LG8(GH8)/LG11(GH8)/LG12(GH8)	GRUPO22;GRUPO38	V11(GH-V)/V12(GH-V),V14	-
SG34	LG3(GH1)	GRUPO65	VIII2(GH-III); X3(GH-X),U10(G)	-
SG39	LG2(GH2); G15(GH6); LG22(GH8)	#	III2, III3, III4, III5, III6, III7(GH-II)	-
SG140	LG59(G)	#	#	-
SG155	LG8(GH8)/LG11(GH8)	#	V11(GH-V)/V12(GH-V)	XII3(GH-XII)
SG161	LG8(GH8)	#	#	-
SG168	LG1(GH1)	#	#	-
SG192	LG8(GH8)	#	#	-
SG212	LG17(GH8)	#	#	XIII1(GH-XIII)
SG224	LG26(GH5)	#	#	-
SG234	LG3(GH1)	GRUPO74	#	ϕ
SG298	LG7(GH4)/LG8(GH4)	#	X3(GH-X),X4(GH-X)	ϕ
SG302	LG1/LG5(GH1)	#	#	ϕ
SG305	LG3(GH1)	#	IX1(GHIX),IX2(GHIX),IX5(GHIX),IX6(GHIX),IX8(GHIX)	ϕ
SG322	LG5(GH1); LG9(GH1)	#	#	ϕ
SG370	LG13(GH2)	#	#	ϕ
SG406	LG18(GH5)	#	#	ϕ
SG426	LG22(GH6)	GRUPO14;GRUPO36	V1(GH-V)/V2(GH-V); VII1(GH-VII); VII3(GH-VII); UB(G)	ϕ
SG442	LG2(GH2); LG16(GH2)	#	#	ϕ

GH Grupo homólogo

GI Grupo Independente

- marcador proveniente de determinada sonda SG que não foi encontrado em qualquer grupo de ligação no genótipo estudado.

ϕ marcador não genotipado no presente estudo.

não é possível saber se o marcador não está ligado ou não foi genotipado no trabalho citado.

O mapa construído para *S. spontaneum* (da Silva *et al.*, 1995) apresentou 24 sondas SG mapeadas. Destas, 14 (SG04, SG12, SG21, SG26, SG29, SG30, SG54, SG99, SG140, SG155, SG161, SG192, SG212, SG224) também foram utilizadas no mapeamento efetuado para progênie F₁ derivada de cruzamento entre os híbridos interespecíficos (Tabela 3) deste trabalho.

Verificou-se que a distância envolvida entre os marcadores SG utilizados na construção de nosso mapa que apresentavam-se em um mesmo grupo de ligação em *S. spontaneum*, superava 0,40% de fração de recombinação na nossa população F₁. Isto pode ser encontrado no grupo de ligação LG2 para os marcadores das sonda SG04 e SG99; no grupo de ligação LG8G para os marcadores das sondas SG155/SG29/SG192 e no grupo de ligação LG15 para marcadores da sondas SG26 e SG99. Desta forma, conclui-se que em *S. spontaneum*, somente houve a detecção de ligação destes marcadores com outros por haver maior saturação das regiões onde eles estão localizados. Tal saturação foi efetuada com marcadores RFLPs empregando-se sondas provenientes de outras fontes de DNA (cDNA de cana-de-açúcar, sondas genômicas de milho), bem como outros tipos de marcadores (RAPD e AFLP).

No estudo realizado por da Silva *et al.* (1995), houve a detecção de 1 grupo de ligação apresentando marcadores ligados originados pelas sondas SG04 e SG99 (LG15/GH8, Tabela 3). Também foi observado a participação de um outro marcador proveniente da sonda SG99 em um grupo de ligação homólogo ao anterior (LG22/GH8, Tabela 3). Neste grupo de ligação (LG22, Tabela 3) o marcador não apresentou ligação com nenhuma outra sonda SG. A sonda SG99 ainda forneceu neste estudo, um marcador ligado a marcadores vindos da sondas SG26 e SG442 (LG2/GH2). A constituição global deste grupo de ligação não permitiu que o mesmo fosse agrupado ao grupo homólogo

GH8, sendo ele melhor inserido no grupo homólogo GH2, devido ao conjunto de marcadores nele ligados (Tabela 3).

No mapa para híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar, apesar da presença de marcadores provenientes destas duas mesmas sondas, não foi observada nenhuma ligação entre eles. Os marcadores da sonda SG99 apresentaram-se não ligados aos grupos de ligação obtidos. A sonda SG04 apresentou ligados dois de seus marcadores ligados formando o grupo II (Figura 3). Tal resultado pode representar regiões duplicadas, conforme discutido anteriormente.

As demais sondas utilizadas em comuns aos dois estudos apresentaram seus marcadores ligados a marcadores SG utilizados somente no estudo de *S. spontaneum* e não utilizados para híbridos interespecíficos ou vice-versa. Este fato dificultou a interpretação de prováveis regiões comuns aos 2 mapas.

Em resumo, a posição dos marcadores apresentou-se distinta com os dados disponíveis na literatura, para as 14 sondas em comum em *S. spontaneum* e o presente mapa construído com base em híbridos interespecíficos comerciais de cana-de-açúcar.

Em comparação com o mapa para *S. officinarum*, Guimarães *et al.* (1999) apresentaram marcadores provenientes de 5 sondas SG (SG26, SG54, SG99, SG293, SG426), os quais posicionaram-se em grupos de ligações independentes (Tabela 3). Em nosso estudo, marcadores comuns a três dessas sondas (SG26, SG54 e SG99) também foram genotipadas. Em nosso mapa foram encontrados marcadores vindos da sonda SG26 presentes em dois grupos homólogos, ligados a marcadores da sonda SG23 (Grupo Homólogo IX/Figura 3). Marcadores das outras duas sondas (SG54 e SG99) não estavam presentes em nenhum dos grupos formados apresentados na Figura 3, permanecendo não-ligados.

Considerando que o genoma de variedades comerciais apresenta contribuições de *S. spontaneum* e de *S. officinarum*, foi realizada a comparação entre os 3 mapas. Verificou-se a existência de marcadores comuns aos 3 genótipos, entretanto, somente marcadores de duas sondas (SG26 e SG99) puderam ser avaliados comparativamente. No mapa de *S. officinarum*, os marcadores originados por estas duas sondas localizaram-se em grupos de ligação independentes: SG26 estava presente no grupo 1, 4 e 11 e SG99 presente no grupo 55. Em *S. spontaneum*, os marcadores originados das sonda SG26 e SG99 estavam ligados no grupo LG2 (Tabela 3). Verificou-se também que o grupo homólogo 7 apresentou 2 grupos de ligação contendo marcadores da sonda SG26 ligados a outros tipos de marcadores. O mesmo foi observado em relação aos marcadores da sonda SG99, sendo eles encontrados em dois grupos de ligação no grupo homólogo 8, em ligação com marcadores originados de sondas SG não utilizadas simultaneamente nos 2 trabalhos (da Silva, 1995; Guimarães, 1999) e/ou ligados a outros tipos de marcadores. Na construção do mapa deste trabalho, observou-se que os marcadores originados das sondas SG26 e SG99 não se localizaram no mesmo grupo de ligação, sendo que os marcadores da sonda SG26 estão localizados em dois grupos de ligação de um mesmo grupo homólogo e marcadores da sonda SG99 não apresentaram ligação com nenhum dos 33 grupos de ligação obtidos neste estudo (Figura 3).

Nas comparações efetuadas com os resultados obtidos na construção do mapa a partir da autofecundação da variedade R570 e aqueles obtidos no presente trabalho, constatou-se a utilização de 6 sondas SG em comum (SG12, SG29, SG30, SG54, SG99 e SG155). Todos os marcadores originados destas sondas foram mapeados em diferentes grupos de ligação no mapa construído por Grivet *et al.* (1996). Isto significa que não foi observada nenhuma ligação entre os marcadores originados dessas sondas em um mesmo

grupo de ligação. Tal situação também foi observada para as sondas SG12 e SG155 no mapa para híbridos interespecíficos. Os demais marcadores de sondas coincidentes, em ambos os mapas, apresentaram-se não ligados. Em relação às sondas utilizadas para os 3 genótipos (*S. spontaneum*, R570 e o híbrido interespecífico), somente os marcadores originados das sondas SG155 e SG30 apresentaram o comportamento acima citado. Em *S. spontaneum*, os marcadores originados das sondas SG155 e SG30 foram observados no mesmo grupo de ligação (LG11), nos mapas para os outros dois genótipos não foi observado o mesmo comportamento (Tabela 3).

Em linhas gerais, os resultados obtidos com os 221 marcadores utilizados no mapeamento do híbrido interespecífico (o qual representa um exemplo de genótipo de variedades comerciais), apresentou-se próximo daqueles obtido no estudo do genoma de *S. spontaneum* (216 marcadores) (da Silva *et al.*, 1993a). Apesar da quantidade de marcadores ser semelhantes nos dois estudos, o número de sondas geradoras destes marcadores foi distinto. Enquanto 55 combinações sonda/enzima utilizadas na análise do genoma de híbrido interespecífico em estudo forneceu em média 4 marcadores por sonda, para *S. spontaneum* (da Silva *et al.*, 1993a) essa média foi de 1,8 marcador por sonda, a partir de 116 combinações sonda/enzima. Essa diferença mostrou-se importante em relação à cobertura do genoma para o mapeamento. As 116 sondas foram suficientes para analisar 86% do total do genoma. Entretanto, as 55 sondas utilizadas neste trabalho, as quais geraram número semelhante de marcadores às 116 sondas anteriores, foram mais eficazes na detecção de porções homólogas presentes no genoma, mas restringiram a avaliação completa do genoma.

O mapeamento da variedade R570 envolveu 408 marcadores SDRFs (Grivet *et al.* 1996), os quais correspondem a aproximadamente o dobro do utilizado em nosso estudo.

Estes marcadores foram obtidos a partir de 128 sondas RFLP. Apesar da observação de grupos co-segregantes evidentes, a utilização de 128 sondas não permitiu uma cobertura muito abrangente do genoma (Grivet *et al.*, 1996). A análise detalhada de aproximadamente 1/3 do genoma da variedade R570 somente foi possível com número de 939 marcadores AFLP. Esses dados informavam a dificuldade ao acesso de informações sobre o genoma do organismo em estudo. Desta maneira, forneceu experiência prévia sobre a necessidade de um número elevado de marcadores para saturação e monitoramento genômico de variedades de cana-de-açúcar (Hoarau, 2000). Além disso, a cobertura genômica deficiente observada na porção corresponde a *S. officinarum*, indicou que houve maior dificuldade no estudo da parcela do genoma referente à esta espécie, mesmo utilizando-se elevado número de marcadores. Este fato sugere que tal dificuldade também pode estar presente na análise de outros genótipos de híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar.

O número de marcadores utilizados no mapeamento do híbrido interespecífico no presente trabalho não possibilitou a cobertura completa do genoma. Desta forma, a distância elevada entre os marcadores utilizados impediu que fossem formados grupos de ligação, diminuindo assim a informatividade do mapa. Assim, o mapa obtido contém 33 grupos de ligação (Figura 3), os quais são insuficientes para distinguir as porções *S. officinarum* e *S. spontaneum* no genoma. Porém, não foi detectado nenhum impedimento ao acesso de ambos os genomas que compõem o híbrido interespecífico, efetuando-se a utilização de maior número de marcadores. No caso do estudo realizado para a variedade R570, sugere-se que a autofecundação efetuada para obtenção da progênie, resultou em barreiras ao acesso à porção *S. officinarum* por promover maior homozigose nos locos gênicos desta espécie. O maior grau de homozigose nesta espécie é resultante da elevada

similaridade genética entre os clones de *S. officinarum* quando comparado à variabilidade existente entre os clones de *S. spontaneum*.

Tal situação não corresponde a realidade em cana-de-açúcar, considerando-se que a maioria absoluta das variedades comerciais são híbridos interespecíficos, como os genótipos mapeados neste trabalho, e não sofreram autofecundações durante o processo de obtenção. Espera-se, assim, que o presente trabalho contribua para que estudos futuros possam ser conduzidos, visando a obtenção de mapas genéticos mais saturados e até mesmo o mapeamento de QTL's.

Referência Bibliografia

- Al-Janabi, S.M; Honeycutt, R.J.; McClelland, M. and Sobral B.W.S. (1993) A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* (L.) 'SES 208'. *Genetics* 134: 1249-1260.
- Asnaghi, C.; Paulet, F.; Kaye, C.; Grivet, L.; Deu, M.; Glaszmann, J.C. and D'Hont, A. (2000) A application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: (5-6) 962-969.
- Avivi, L. (1976) Colchicine induced bivalent pairing of tetraploid microsporocytes in *Triticum longissimum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 18: 357-364.
- Bremer, G. (1961) Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of *Saccharum*. *Euphytica* 10: 59-78.
- Burnquist, W.L. (1991) Development and application of RFLP technology in sugarcane (*Saccharum spp*) breeding. Ph. D. Dissertation, Cornell University, Ithaca N.Y. 154 p.
- Buterfield, M.K.; D'Hont, A; Berding, N. (2001) The sugarcane genome: A synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. *Proc.S. Afr. Sug. Technol. Ass.* 75: 1-5
- da Silva, J.A.G.; Sorrells, M.E.; Burnquist, W.L.; and Tanksley, S.D. (1993) RFLP linkage map of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791.
- da Silva, J.A.G.; Honeycutt, R.J.; Burrenquist, W.; Al-Janabi, S.M.; Sorrells, M.E.; Tanksley, S.D. and Sobral, B.W.S. (1995):*Saccharum spontaneum* L.'SES 208'genetic linkage map combining RFLP-and PCR- based markers. *Mol.Breed.* 1: 165-179.
- Daugrois, J.H.; Grivet, L.; Roques, D.; Hoarau, J.Y.; Lombard, H; Glaszmann, J.C.; D'Hont, A. (1996) A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570". *Theor. Appl. Genet.* 92: 1059-1064.

- D'Hont, A; Rao, P.S.; Feldmann, P.; Grivet, L.; Islam-Faridi, N.; Taylor, P., and Glaszmann, J.C. (1995) Identification and characterization of surgacane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 91: 320-326
- D'Hont, A.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Rao, P.S., Berding, N., Glaszmann, J.C. (1996) Characterization of the double genomic structure of modern sugarcane cultivars, *Saccharum spp*, by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 250:405-413.
- D'Hont, A; Glaszmann, J.C. (2001) Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *Proc. Int. Soc. Sugarcane. Technol.* 24:556-559.
- Dufour, P.; Deu, M.; Grivet, L.; D'Hont, A; Paulet, F.; Bouet, A; Lanaud, C.; Glaszmann, J.C. and Hamon, P. (1997) Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a relate complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.* 94: 409-418.
- Feinberg, A P.; Volgelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Fisher, R.A. (1949) The linkage problem in a tetrasomic wild plant, *Lythrum Salicaria*. *Proc. 8th Intern. Congr. Genet.* 225-233.
- Grivet, L.; D'Hont, A; Dufour, P.; Hamon, P.; Roques, D.; and Glaszmann, J. C. (1994) Comparative genome mapping of sugarcane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73: 500-508.
- Grivet, L.; D'Hont, A.; Roques, D.; Feldmann, P.; Lanaud, C. and Glaszmann, J. C. (1996) RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum spp.*): Genome Organization in a Highly Polyploid and Aneuploid interespecific Hybrid. *Genetics* 142: 987-1000.
- Grivet, L. and Arruda, P. (2002) Sugarcane genomics; depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 122-127.

- Guimarães, C.T.; Sills, G.R. and Sobral, B.W.S. (1997) Comparative mapping of Andropogonae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 94: 14261 -14266.
- Guimarães, C.T.; Honeycutt, R.J.; Sills, G.R. *et al.* (1999) Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. *Ex. Grassl. Genet. Mol. Biol.* 22:(1)125-132
- Hoarau, J.Y. (2000) Cartographie génétique d'un cultivar de canne à sucre (*Saccharum spp.*) aux moyens d'ÁFLPs et marquage de caractères agronomiques utiles en sélection. Le titre de Docteur en Biologie et Agronomie de Lénars, France.
- Hoisigton, D.; Khairallah, M. and González-de-León, D. (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. *SEcond Edition*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Jackson, R.C. (1982) Polyploidy and diploidy: New perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *Amer. J. Bot.* 69: 1512-1523.
- Kosambi, D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenet.* 12:172-175.
- Lima, M.L.A; Garcia, A.A.F.; Oliveira, K.M.; Matsuoka, S.; Arizono, H.; Souza Jr, C. L. and Souza, A. P. (2002) Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum spp.*). *Theor. Appl. Genet.* 104 (1) : 30-38.
- Lu, Y.H.; D'Hont, A.; Walker, D.I.T.; Rao, P.S. (1994) Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single-copy maize nuclear probes. *Euphytica* 78: 7-18
- Mather, K (1938) *The Measurement of Linkage in Heredity*. Methuen & Co. Ltd, London.
- 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. and

-
- Paterson, A.H. (1998) Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *genetics* 150: 1663-1682.
- Ooijen, J.W; Voorrips, R.E. (2001) JoinMapVersion 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, Netherlands.
- Paterson, A.H. (1996) Genome mapping in Plants. R.G. Landes Company. 999 Pine Street, Georgetown, Texas, USA. 330p.
- Pinheiro, J.B. e Carneiro, I.F. (2000) Análise de QTL no Melhoramento de Plantas. Goiânia, FUNAPE. 232p.
- Prince, S. (1963) Cytogenetics of modern sugarcane. *Econ. Bot.* 17 (2): 97-106.
- Rice, W.R. (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ritter, E., C. Gerbhardt and F. Salamini (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125:645-654
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sreenivasan, T.V. *et al.* (1987) Cytogenetics. Heinz, D. J. ed. In: Sugarcane Improvement Through Breeding. Amsterdam, Elsevier, p. 211-253.
- Timmis, J.N and Rees, H. (1971) A pairing restrction at pachytene upon multivalent formation in autotetraploids. *J. Hered.* 26:269-275.
- Wu, K.K.; Burnquist, W., Sorrells, M.E.; Tew, T.L.; Moore, P.H. and Tanksley, S.D. (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83: 294.

5. Conclusões

A utilização de 189 marcadores SDRFs gerados por 55 combinações sonda/enzimas promoveu a elaboração de um mapa preliminar, com extensão de 480 cM, representando o primeiro construído a partir de uma população F_1 resultante de um cruzamento entre 2 variedades comerciais de cana-de-açúcar.

Os vários marcadores identificados por uma mesma sonda abrangeram uma porção bastante limitada do genoma. No entanto, a vantagem na utilização de marcadores deste tipo é a possibilidade de análise detalhada da mesma região do genoma em cromossomos homólogos, sendo possível a identificação de translocações e repetições nestas regiões. A análise dos grupos formados não pode ser considerada conclusiva. Entretanto, ela destaca pontos que poderão ser averiguados e confirmados em estudos posteriores.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que, para uma ampla cobertura do genoma de híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar com marcadores RFLP, é necessário utilizar grande quantidade de sondas diferentes em combinações com enzimas que tenham a característica de gerar marcadores múltiplos. Não é suficiente a utilização de um grande número de marcadores originados de poucas sondas. Faz-se necessário também o desenvolvimento de metodologias que permitam o uso de marcadores com outros tipos de segregação nos mesmo mapa

Não é possível acessar o genoma completo de cana-de-açúcar utilizando-se poucos marcadores. O elevado número de cromossomos presente nos genótipos estudados exige

que um número considerável de marcadores seja utilizado visando à obtenção de um número de grupos de ligação correspondente ao número de cromossomos da cana-de-açúcar cultivada e resultando em um mapa saturado.

O marcador RFLP é inadequado para a saturação do genoma de híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar. Técnicas que sejam capazes de gerar grande número de marcadores em menor tempo, são mais eficientes para a obtenção de mapas saturados destes genótipos. Entretanto, o mapa obtido a partir de marcadores RFLP apresenta a vantagem de poder ser comparado com mapas obtidos para outros cruzamentos de cana-de-açúcar, desde que os mesmos marcadores sejam utilizados. Por esta razão, eles são considerados como mapas básicos da espécie, utilizados como arcabouço para o ancoramento de outros tipos de marcadores, tais como os AFLPs.

6. Perspectivas

O mapa preliminar para híbrido interespecífico (representantes de variedades comerciais) de cana-de-açúcar obtido neste trabalho será utilizado como suporte para a inserção de outros marcadores moleculares, tais como AFLP e microssatélites, os quais possibilitarão a saturação do mesmo.

Após a saturação desse mapa, serão mapeados genes associados a características quantitativas e qualitativas de importância agrônômica, priorizando-se o teor de açúcar, peso dos colmos e resistência à escaldadura.

A confirmação da associação entre marcadores e os QTLs para as características anteriormente descritas será efetuada através da construção de um outro mapa genético, utilizando os mesmos marcadores, porém, com base em população F_1 resultante do cruzamento de outros genitores. A progênie a ser utilizada neste estudo posterior já foi obtida e derivou do cruzamento entre as variedades comerciais SP85-7215 e SP80-144.

7. Referências bibliográficas

- Ajmone_Marsan, P.; Gorni, C.; Chittó, A.; Radaelli, R.; Van Vijk, R.; Stam, P. e Motto. (2001) Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using AFLP map, different testers, and cofactor analysis. *Theor. Appl. Genetics* 102: 230-243.
- Alexander, A.G., Allison, W., Chu, Tl., Velz-Santiago, J. and Smith, L. (1982) Production of sugarcane and tropical gasses as a renewable energy source. Final Report to the US Department of Energy, Contract n° DE-AS05-78ET20071.
- Alix, K.; Baurens, F.C.; Paulet, F.; Glaszmann, J.C. and D'Hont, A. (1998) Isolation and characterization of a satellite DNA family in the *Saccharum* complex genome. *Theor. Appl. Genetics* 41: 854-864.
- Alix, K.; Paulet, F.; Glaszmann, J.C. and D'Hont, A. (1999) Inter-*Alu* like species-specific sequences in the *Saccharum* complex. *Theor. Appl. Genetics* 6: 962-968.
- Al-Janabi, S.M.; Honeycutt, R.J., McClelland, M. and Sobral B.W.S. (1993) A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* (L.) 'SES 208'. *Genetics* 134: 1249-1260.
- Allard, R.W. 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in Heredity. *Hilgardia*, 24: 235-278.
- Apuya, N.R.; Frazier, B.L.; Keim, P.; Roth, E. J. and Lark K.G. (1988) Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean (*Glycine max* L) merril. *Theor. Appl. Genetics* 75: 889-901.
- Asnaghi, C.; Paulet, F.; Kaye, C.; Grivet, L.; Deu, M.; Glaszmann, J.C. and D'Hont, A. (2000) A Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rustresistance gene *Theor. Appl. Genetics* 101: (5-6) 962-969.
- Avivi, L. (1976) Colchicine induced bivalent pairing of tetraploid microsporocytes in *Triticum longissimum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 18: 357-364.
- Barnes, A.C. (1953) Agriculture of the sugarcane. London Hill limited 9 Eden Street, M.W
- Bhat, S.R. and Gill, S.S. (1985) The implications of on gametes in nobilization and breeding of sugarcane. *Euphytica* 34: 377-384.

- Bornierbale, M.; Plaisted, R.L and Tanksley, S.D. (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *Na. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Brandes, E.W.; Sartoris, G.B. and Grassl, C. (1939) Assembling wild forms of *Saccharum* and relat plants. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 6: 128-153.
- Brandes, E.W. (1958) Origin, classification and characteristics. In: E. Artschwager & E.W. Brandes (Eds) Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *U.S. Dep. Agric. Handb.* 122: 1-35.
- Bremer, G. (1930) The cytology of *Saccharum*. *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.* 3: 408-415.
- Bremer, G. (1961) Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding – the original forms of *Saccharum*. *Euphytica* 10: 59-78.
- Burner, D. M. (1987) Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (Andropogoneae: Saccharinae). *Euphytica* 54: 125-133.
- Burnquist, W.L. (1991) Development and application of RFLP technology in sugarcane (*Saccharum spp*) breeding. Ph. D. Dissertation, Cornell University, Ithaca N.Y. 154 p.
- Burr, B.; Evola, S.V.; Burr, F.A. and Beckmann, J.S. (1983) The application restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: Genetic engineering: principles and methods, Setlow J. K., Hollaender A., eds. New York: Plenum Press, 5: 45-59.
- Buterfield, M.K.; D'Hont, A. and Berding, N. (2001) The sugarcane genome: A synthensis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* 75: 1-5
- Castiglioni, P.; Pozzi, C.; Heun, M.; Terzi, V.; Muller, K.J.; Rohde, W. e Salamini, F. (1999) Na AFLP- based procedure for the efficiente mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics* 149: 2039-2056.
- Condit, R. and Hubbell, S.P. (1991) Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- da Silva, J.A.G.; Sorrells, M.E.; Burnquist, W.L. and Tanksley, S.D. (1993a) RFLP linkage map of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791.

- da Silva, J.A G. (1993b) A methodology for Genome mapping of Autopolyploids and its Application to Sugarcane (*Saccharum spp*). Ph.D. Dissertation Cornell University, Ithaca, N.Y. 108p.
- da Silva, J.A.G. and Sobral, B.W.S. (1996) Polyploid genetics. In: The Impact of Plant Molecular Genetics (Sobral, B.W.S., ed.). Birkhauser. Boston. p. 3-35.
- da Silva, J.A.G.; Honeycutt, R.J.; Burnquist, W.; Al-Janabi, S.M.; Sorrells, M.E.; Tanksley, S.D. and Sobral, W.S. (1995) *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP - and PCR - based markers. *Mol. Breeding* 1: 165-179.
- Daniels, J. and Daniels, C.A. (1975a) Geographical historical and Cultural Aspects of the Origin of the Indian chinese Sugarcanes *S. Barberi* and *S. Sinense*. *Sugarcane Breeders Newsletter* 36: 1-23.
- Daniels, J.; Smith, P.; Paton, N. and Williams, C.A. (1975b) The origin of the Genus *Saccharum*. *Sugarcane Breeders Newsletter* 36: 24-39.
- Daniel, J. and Roach, B.T. (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz, D. J.(ed). Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amesterdam. p.7-84
- Daugrois, J. H.; Grivet, L.; Roques, D.; Hoarau; Lombard, H; Glaszmann, J. C. and D'Hont, A. (1996) A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar "R570". *Theor. Appl. Genetics* 92: 1059-1064.
- D'Hont, A; Lu Y.H., Gonzáles de Leon D., Grivet L., Feldmann P., Lanaud C. and Glaszmann J.C. (1994) A molecular approach to unravelling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae. *Genome* 37: 222-230.
- D'Hont, A; Rao, P.S.; Feldmann, P; Grivet, L; Islam-Faridi, N.; Taylor, P. and Glaszmann, J.C. (1995) Identification and characterization of surgacane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridization. *Theor. Appl. Genetics* 91: 320-326.
- D'Hont, A.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Rao, P.S.; Berding, N. and Glaszmann, J.C. (1996) Characterization of the double genomic structure of modern sugarcane cultivars, *Saccharum spp*, by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 250: 405-413.
- D'Hont, A; Ison D., Alix K., Roux C. and Glaszmann J.C. (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41: 221-225.

- D'Hont, A and Glaszmann, J.C. (2001) Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *Proc. Int. Soc. Sugarcane. Technol.* 24: 556-559.
- Dufour, P.; Deu, M.; Grivet, L.; D'Hont, A; Paulet, F.; Bouet, A; Lanaud, C.; Glaszmann, J. C. and Hamon, P. (1997) Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a relate complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.* 94: 409-418.
- Feinberg, A P. and Volgelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Fernandes, A.C. and Irvine, J. (1987) The brazilian sugar and alcohol agroindustry. Copersucar International sugarcane Breending Workshop. 233-247. publicado por Coop. Prod. Cana, Açúcar e Álcool do Est. São Paulo - Copersucar. Rua Boa Vista, 280 3º andar, São Paulo, SP, Brasil.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- Fisher, R.A. (1949) The linkage problem in a tetrasomic wild plant, *Lythrum Salicaria*. *Proc. 8th Intern. Congr. Genet.* p. 225-233.
- Gaszmann, J.C.; Lu, Y.H. and Laurand, C. (1990) Variation of nuclear ribosomal DNA in sugarcane. *J. Genet. Breed.* 44: 191-198
- Gottlieb, F. (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373-380.
- Grassl, C.O. (1977) Taxonomy of *Saccharum* relatives: *Sclerostachya*, *Narenga* and *Erianthus*. *Proc. Int. Soc. of Sugarcane Technol.* 14: 240-248.
- Griffiths, A.J.; Miller, J.H.; Suzuki D.T.; Lewontin C.R. and Gelbart.W.M. (1997) *Genetic Analysis: An introduction to genetic analysis.* W.H. Freeman and Company., New York. p. 151-160
- Grivet, L.; D'Hont, A; Dufour, P.; Hamon, P.; Roques, D.; and Glaszmann, J. C. (1994) Comparative genome mapping of sugarcane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73: 500-508.
- Grivet, L.; D'Hont, A.; Roques, D.; Feldmann, P.; Lanaud, C. and Glaszmann, J. C. (1996) RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome Organization in a Highly Polyploid and Aneuploid interespecific Hybrid. *Genetics* 142: 987-1000.

- Grivet, L.; Daniels, C.; Glaszmann, J.C. and D'Hon't, A. (2001a) A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. (in press)
- Grivet, L.; Glaszmann, J.C. and Arruda, P. (2001b) Sequence polymorphism from Est data in Sugarcane: a fine analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase genes. *Gen. and Mol. Biol.* 24 (1-4) 161-167.
- Grivet, L. and Arruda, P. (2002) Sugarcane genomics; depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 122-127
- Guimarães, C.T.; Sills, G.R. and Sobral, B.W.S. (1997) Comparative mapping of Andropogonae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 94: 14261 -14266.
- Guimarães, C.T.; Honeycutt, R.J.; Sills, G.R. *et al.* (1999) Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. *Ex. Grassl. Genet. Mol. Biol.* 22: (1) 125-132.
- Guimarães, C.T. e Moreira, M.A (1999) Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A (ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Editora UFV Viçosa-minas Gerais. p. 715-740.
- Haldane, J.B.S. (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
- Heinz, D.J. and Tew, T.L. (1987) Hybridization procedures. In: Heinz, D.J. ed. *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, Amsterdam. P.313-342.
- Helentjaris, T.; King, G.; Slocum, M.; Siedenstrang, C. and Wegman, S. (1985) Restriction Fragment Polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. S.* 5: 109-118
- Hoarau, J.Y. (2000) Cartographie génétique d'un cultivar de canne à sucre (*Saccharum spp.*) aux moyens d' AFLPs et marquage de caractères agronomiques utiles en sélection. Le titre de Docteur en Biologie et Agronomie de Lénars, France.
- Hogarth, D.M.; Cox, M.C and Bull, J.K. (1997) Sugarcane improvement: Past achievements and future prospects. *Crop improvement*. ed. Manjit S. King, Louisiana State University.
- Hoisington, D.A. and Coe Jr., E.H. (1990) Mapping in maize using RFLPs. *Gene Manipulation in Plant Improvement II*. Gustafson JP. ed. Plenum Press, New York. p. 331-352.

- Hoisigton, D.; Khairallah, M. and González-de-León, D. (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Irvine, J.E. (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. *Theor. Appl. Genet.* 98: 186-194.
- Jackson, R.C.; Casey, J. (1980) Cytogenetics of polyploids. In: Polyploidy: Biological Relevance, Lewis, W.H., ed. Plenum Press, New York.
- Jackson, R.C. (1982) Polyploidy and diploidy: New perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *Amer. J. Bot.* 69: 1512-1523.
- Jannoo, N.; Grivet, L.; Seguin M.; Paulet, F.; Domainge, R.; Rao, P.S.; Dookun, A; D'Hont, A. and Glaszmann, J.C. (1999) Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 99: 171-184
- Junqueira, A.A.B. e Dantas, B. (1964) A cana-de-açúcar no Brasil. In: Cultura e Adubação da cana-de-açúcar. Instituto Brasileiro de Potassa. São Paulo. p. 28-60
- Kosambi, D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenet.* 12: 172-175.
- Kuwada, Y. (1915) Uber die chromosomenzahl von *Zea mays*. *L. Bot. Mag.* 29:87.
- Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M.J.; Lincoln, S.E. and Newburg, L. (1987) MAPMAKER: a interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Landry, B.S., Kesseli, R.V., Farrara, B. and Milcheltmore, R.W. (1987) A genetic map of lettuce (*Lactuca stiva* L) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- Lennox, C.G. (1939) Sugarcane collection in New Guinea during 1937. *Proc. Int. Soc. of Sugarcane Technol.* 6: 171-182.
- Li, H.W. and Prince, S. (1967) Chromosome numbers of noble sugarcane clones. *Proc. Int. Soc. of Sugarcane Tecnol.* 12: 884-886.
- Lima, M.L.A; Garcia, A.A.F.; Oliveira, K.M.; Matsuoka, S.; Arizono, H.; Souza Jr, C. L. and Souza, A. P. (2002) Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 104 (1) : 30-38.

- Litt, M. and Luty, J.A. (1989) A Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J. Hum. Genet.* 44: 398-401.
- Liu, Ben-Hui. (1997) Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analyses. New York, 611p.
- Lu, Y.H.; D'Hont, A.; Walker, D.I.T. and Rao, P.S. (1994) Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single-copy maize nuclear probes. *Euphytica* 78: 7-18.
- Lynch, M. and Walsh, B. (1997) Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts. p. 390- 422.
- MacKey, J. (1987) Implications of polyploidy breeding. *Biol. Zent. Bl.* 106:257-266.
- Mangolin, C.A (2002) Mapeamento de Qtls associados com o teor de óleo em linhagens tropicais de milho (*Zea mays* L.). Campinas. SP. 110p. (Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
- Mather, K (1938) The Measurement of Linkage in Heredity. Methuen & Co. Ltd, London.
- Matsuoka, S. (1976) Incidência e efeito do Mosaico na Cultura de Cana-de-Açúcar no Estado de São Paulo. Araras, IAA/Planalsucar. 37p.
- Matsuoka, S., Garcia, A.A.F. e Arizono, H (1999a) Melhoramento da can-de-açúcar. In: Borém, A ed. *Melhoramento de espécies cultivadas*. 2 ed. Viçosa, UFV, p. 205-251
- Matsuoka, S., Garcia, A.A.F.; Arizono, H e Calheiros, G.C. (1999b) Hibridação em cana-de-açúcar. In: Borém, A. ed. *Hibridação artificial em plantas*. Viçosa. UFV
- Matsuoka, S. (1999c) A Evolução recente das variedades Brasileiras de cana-de-açúcar. *PMGCA/CCA-UFSCAR*. 17: 3
- Mc Couch, S.R.; Kobert, G.Y.; Yu, Z.H.; Wang, Z.Y.; Kush, G.S.; Coffman, W.R. and Tanksley, S.D. (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 7 (6): 815-829.
- Milach, S. (1998) Marcadores Moleculares em Plantas. Porto Alegre. 141p.
- 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. and Paterson, A.H. (1998) Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes:

- comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics* 150: 1663-1682.
- Miocque, S. e Machado Jr. (1986) Nomenclatura das Variedades de cana-de-açúcar S. L. Fundação Salim Farah Maluf. 58p.
- Mullis, K. and Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55: 335-350.
- Murkherjee, S. K. (1957) Origin and distribution of *Saccharum*. *Bot. Gaz.* 119: 55-61.
- Naidu, N.M. and Sreenivasan, T.V. (1987) Conservation of sugarcane germplasm. In: Copersucar International Sugar Cane Breeding Workshop. Copersucar Technology Center, São Paulo, p. 33-53.
- Ooijen, J.W e Voorrips, R.E. (2001) JoinMapVersion 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, Netherlands.
- Panje, R.R. and Nabu, C.N. (1960) Studies in *Saccharum spontaneum*. Distribution and geographical association of the chromosome number. *Cytologia* 25: 152-172.
- Paterson, A.H. (1996) Genome mapping in Plants. R.G. Landes Company. 999 Pine Street, Georgetown, Texas, USA. 330p.
- Paterson, A.H.; Lander, S.S.; Hewitt, J.D.; Peterson, S.; Lincoln, S.E. and Tanksley, S. D. (1988) Resolution of quantitative traits into mendelian factors using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism. *Nature* 335: 721-726
- Pinheiro, J.B. e Carneiro, I.F. (2000) Análise de QTL no Melhoramento de Plantas. Goiânia, FUNAPE. 232p.
- Pires, C.E.L.S. (1993) Diversidade genética de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas no Brasil. Piracicaba, Sp, 120p. (Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP).
- Polans, N.O.; Weeden, N.F. and Thompson W.F. (1985) Inheritance, organization, and mapping of *rbcS* and *cab* multigene families in pea. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 82: 5083-5087.
- Prince, S (1957) Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. 3. Chromosome numbers in interespecific hybrids. *Bot Gaz.* 188: 146-159.
- Prince, S. (1963) Cytogenetics of modern sugarcane. *Econ. Bot.* 17 (2): 97-106.

- Prince, S. (1965) Cytology of *Saccharum* and allied genera. II. Geographic distribution and chromosome numbers in *S. robustum*. *Cytologia* 22:40-52.
- Prince, S. and Daniels, J. (1968) Cytology of South Pacific sugarcane and related grasses, with special reference to Fiji. *J. Hered.* 59: 141-145.
- Rao, P.S. (1980) Progress with the use of wild germplasm in the West Indies sugarcane breeding and evaluation network. ISSCT Breeding Workshop “germplasm preservation-accomplishment and prospects”, Montpellier, France.
- Rice, W.R. (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ritter, E., C. Gerbhardt and F. Salamini (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125:645-654.
- Rivin C.J.; Zimmer E.A.; Cullis C.A.; Walbot, V.; Huynh, T.; Davis R.W. (1983) Evaluation of genomic variability at the nucleic acid level. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:9-16
- Roach, B.T. (1969) Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. *Proc. Austr. Soc. Sugar Cane Technol.* p. 34-47.
- Roach, B.T. (1972) Chromosome numbers in *Saccharum edule*. *Cytologia* 37: 155-161.
- Saghai-Marooif, M.A.; Soliman, K.M.; Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. (1984) Ribosomal DNA , spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8014-8018.
- Sibov, S. T.; Souza Jr, C. L.; Garcia, A.A.F.; Silva, A.R.; Garcia, A.F.; Mangolin, C.A; Benchimol, L.L. e Souza, A P. (2002) Mapeamento molecular e análise polimórfica em milho tropical (*Zea mays* L.) usando marcadores microsatelites. (Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sreenivasan, T.V. and Jagathesan, D. (1975) Meiotic abnormalities *Saccharum spontaneum* L. *Euphytica* 24: 543-9.
- Sreenivasan, T.V. *et al.* (1987) Cytogenetics. Heinz, D. J. ed. In: Sugarcane Improvement Through Breeding. Amsterdam, Elsevier, p. 211-253.

- Stam, P. (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant. J.* 3: 739-74
- Stevenson, G.C. (1965) Genetics and breeding of sugarcane. London, Longmans: 284p.
- Sturtevant, A.H. (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in drosophila, as show by their mode of association. *J.Exp.Zoolozy* 14: 43-59
- Tanksley, S.D., Young, N.D.; Paterson, A.H. and Bonierbale, M.W. (1989) RFLP mapping in Plant Breeding: news tools for na old science. *Biotechnology* 7: 257-264.
- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl.Acid Res.* 17: 6463-6471.
- Timmis, J.N and Rees, H. (1971) A pairing restrction at pachytene upon multivalent formation in autotetraploids. *J. Hered* 26: 269-275.
- Tzvelev, N.N. (1989) The System of Grasses (Poaceae) and Their Evolution. *The Botanical Rewiew.* 55: 141-204.
- Uhl, C.H. (1992) Polyploidy, dysploidy, and chromosome pairing in *Echeveria* (Crassulaceae) and its hybrids. *Am. J. Bot.* 79:556-566.
- Waldron, J.C. and Glasziou, K.T. (1972) Isoenzymes as a method of varietal identification in sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugarcane. Technol.* 14:249-256.
- Williams, C.A; Harborne J.B. and Smith, P. (1974) The Taxonomic significane of leaf flavonoids in Saccaharum and related genera. *Phytochemistry.* 13: 1141-1149.
- Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak K.J.; Rafalski, L.A. and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are us eful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wu, K.K.; Burnquist, W., Sorrells, M. E., Tew, T. L., Moore, P. H. and Tanksley, S. D. (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83: 294.
- Yang, G.P.; Shagai-Marroof, M.A; Xu, C.G.; Zhang, Q. and Biyashev, R.M. (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in lanDraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* 245: 187-194.
- Zabeau, M. (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Applications n° 0534858 A1.

- Zhao, X. and Kochert, G. (1992) Characterization and genetic mapping of a short, highly repeat, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 231: 353-359.
- Zehr B.E.; Dudley, J.W.; Chojecjki, J.; Saghai-Marroof, M.A. and Mowers, R.P. (1992) Use of RFLP markers to search for alleles in a maize population for improvement of an elite hybrid. *Theor. Appl. Genet.* 83: 903-911.

Resultados complementares

Com o objetivo de se avaliar previamente a dosagem dos marcadores para sua posterior utilização na população de mapeamento F_1 , efetuou-se a análise dos mesmos empregando-se 14 indivíduos da população F_1 , tomados aleatoriamente. Tal estratégia foi empregada visando a seleção dos marcadores em dose única que seriam utilizados na progênie F_1 .

O número de indivíduos envolvidos nesta etapa, foi definido baseando-se no teste de χ^2 e considerando a segregação de marcadores em dose dupla (DD), a qual é a dosagem passível de ser confundida com os marcadores em dose simples (SD). Como os marcadores DD segregam na proporção 3:1 em alodecaplóides, caso da espécie *S. officinarum* (90% do genoma da SP80-180 e SP80-4966), se a análise fosse realizada empregando-se um número menor que 14 indivíduos, a proporção poderia ser 7:3 ou 8:2 para presença:ausência da banda. Ao ser realizado o χ^2 de um marcador segregando nesta proporção, o valor obtido a 5% de probabilidade, seria não significativo. Assim, o χ^2 calculado não diferenciaria um marcador em dose dupla de um marcador em dose simples, o qual apresenta segregação de 5:5 para presença:ausência. Tal situação ocorre quando se utilizam 10 ou 12 indivíduos. Entretanto, quando as mesmas avaliações são realizadas para 14 indivíduos, o χ^2 consegue diferir 11 presenças para 3 ausências de um marcador DD contra 7 presenças e 7 ausências do marcador SD.

Considerando esses aspectos, as melhores combinações sonda/enzima selecionadas nos genitores, foram analisadas quanto à sua segregação na genotipagem de 14 indivíduos F_1 para a verificação da dosagem de cada marcador. Desta forma, somente marcadores em dose simples seriam empregados na genotipagem da população F_1 completa.

A Figura 1 mostra o padrão de fragmentos adquiridos após hibridização da sonda SG21 com o DNA dos genitores e de 14 indivíduos F_1 digeridos com a enzima *Dra* I.

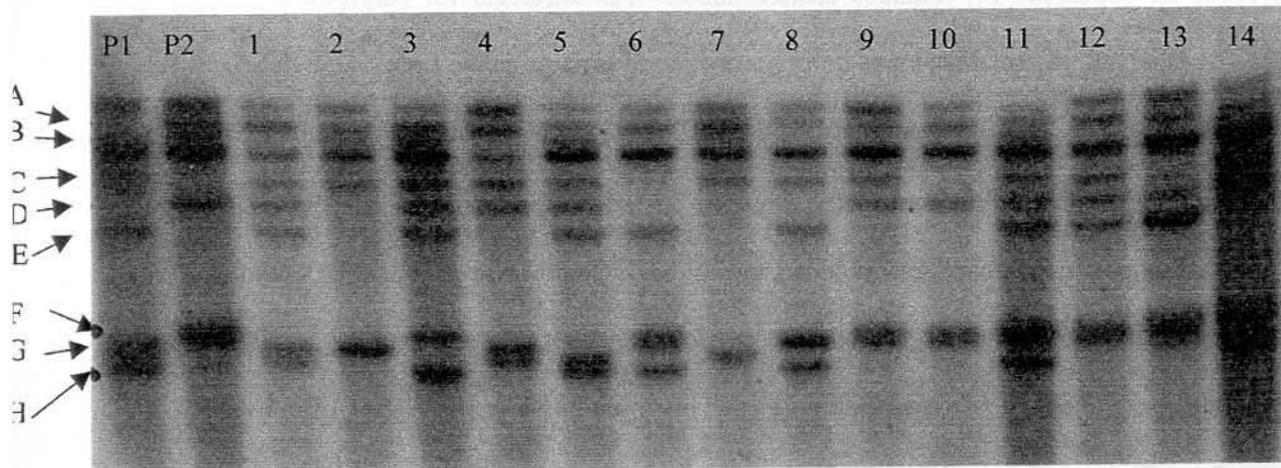


Figura 1. Padrão de fragmentos provenientes da combinação sonda SG021/enzima *Dra* I para os genitores e 14 indivíduos da progênie F_1 digeridos com a enzima *Dra* I. É possível verificar a segregação de cada um dos marcadores nos indivíduos F_1 . Os marcadores A, C, D, E, F e H são polimórficos entre os genitores. Os marcadores B e G apresentam-se monomórficos entre os genitores.

Inicialmente foram analisadas 37 sondas, as quais geraram 163 marcadores (Tabela. 1).

Tabela. 1 Apresentação dos dados obtidos da análise de dosagem de marcadores gerados pela combinação de 56 sondas/enzimas previamente selecionadas.

	n° de sondas	n° de marcadores encontrados	n° de marcadores em Dosagem Simples (DS)	n° de marcadores em outras dosagens	n° de sondas Descartadas
Sondas analisadas Em 14 indivíduos da progênie F ₁	37	163	143	20	1
Sondas não analisadas Em 14 indivíduos da progênie F ₁	19	58	-	-	-
Total	56	221	143	20	1

Dentre os 163 marcadores avaliados nos 14 indivíduos, 99 segregaram na proporção 1:1 (Tabela 2), os quais foram identificados através do polimorfismo apresentado entre os genitores. A avaliação pelo teste χ^2 , demonstrou que 17 marcadores desviaram significativamente da relação esperada.

Tabela 2. Resultado da análise de 99 marcadores para segregação na proporção 1:1, quanto à significância à 5% e 1%, pelo teste de χ^2 .

χ^2	Total Marcadores	Não Significativos	Significativos
5%	99	82	17
1%	99	89	10

Análise similar foi realizada para marcadores segregantes na população F_1 e monomórficos entre os genitores. Para estes casos, foi avaliado o desvio da segregação para a proporção 3:1 por teste χ^2 . Sessenta e quatro marcadores foram considerados nesta avaliação. Destes marcadores, somente 3 desviaram da relação esperada (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado da análise de 64 marcadores para segregação na proporção 3:1, quanto significância à 5% e 1%, pelo teste de χ^2 .

χ^2	Total Marcadores	Não Significativos	Significativos
5%	64	3	61
1%	64	3	61

Sendo assim, de um total de 163 marcadores analisados, 143 não apresentaram desvio significativo das proporções avaliadas 3:1 e 1:1 (monomórfico e polimórfico entre os genitores), sendo considerados em dose simples (SD) no genoma em estudo. (Tabela 1). Os 20 marcadores restantes não estavam em dose simples.

Analisando-se esses resultados, concluiu-se que somente uma sonda das 56 utilizadas seria excluída para prosseguir nas demais etapas de análise. Esta sonda resultou em um único marcador, o qual mostrou segregação muito diferente da esperada para marcadores em dosagem simples. Os 19 marcadores que não estavam em dose única (Tabela 1) foram gerados por sondas que apresentaram SDRFs. Assim, estes marcadores em doses múltiplas foram conduzidos conjuntamente com marcadores em dose simples nas avaliações da população F_1 , mesmo não sendo nela analisados.

Considerando que as análises efetuadas para determinação da dosagem dos marcadores detectou um pequeno número de sondas que possuíam apenas marcadores em doses múltiplas, as quais poderiam ser descartadas, decidiu-se realizar a análise de dosagem dos 29 marcadores restantes diretamente na população de mapeamento.

Assim, a hibridização foi realizada empregando-se as sondas selecionadas em membranas contendo todos os indivíduos da progênie F_1 e os genitores, digeridos com a enzima de restrição (*DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* ou *XbaI*) escolhida para a combinação com a respectiva sonda.

A Figura 2 apresenta um exemplo de genotipagem da população F_1 . A membrana contém os genitores e todos os indivíduos da progênie F_1 , digeridos com a enzima *EcoRI* e hibridizados com a sonda SG11. Os resultados revelaram a presença de 6 marcadores, os quais foram denominados: SG11A, SG11B, SG11C, SG11D, SG11E e SG11F. Os marcadores A, B, D foram avaliados para a segregação 1:1 e os marcadores C, E e F para a relação 3:1. Através do teste χ^2 , foi confirmado a dosagem simples de cada um destes marcadores.

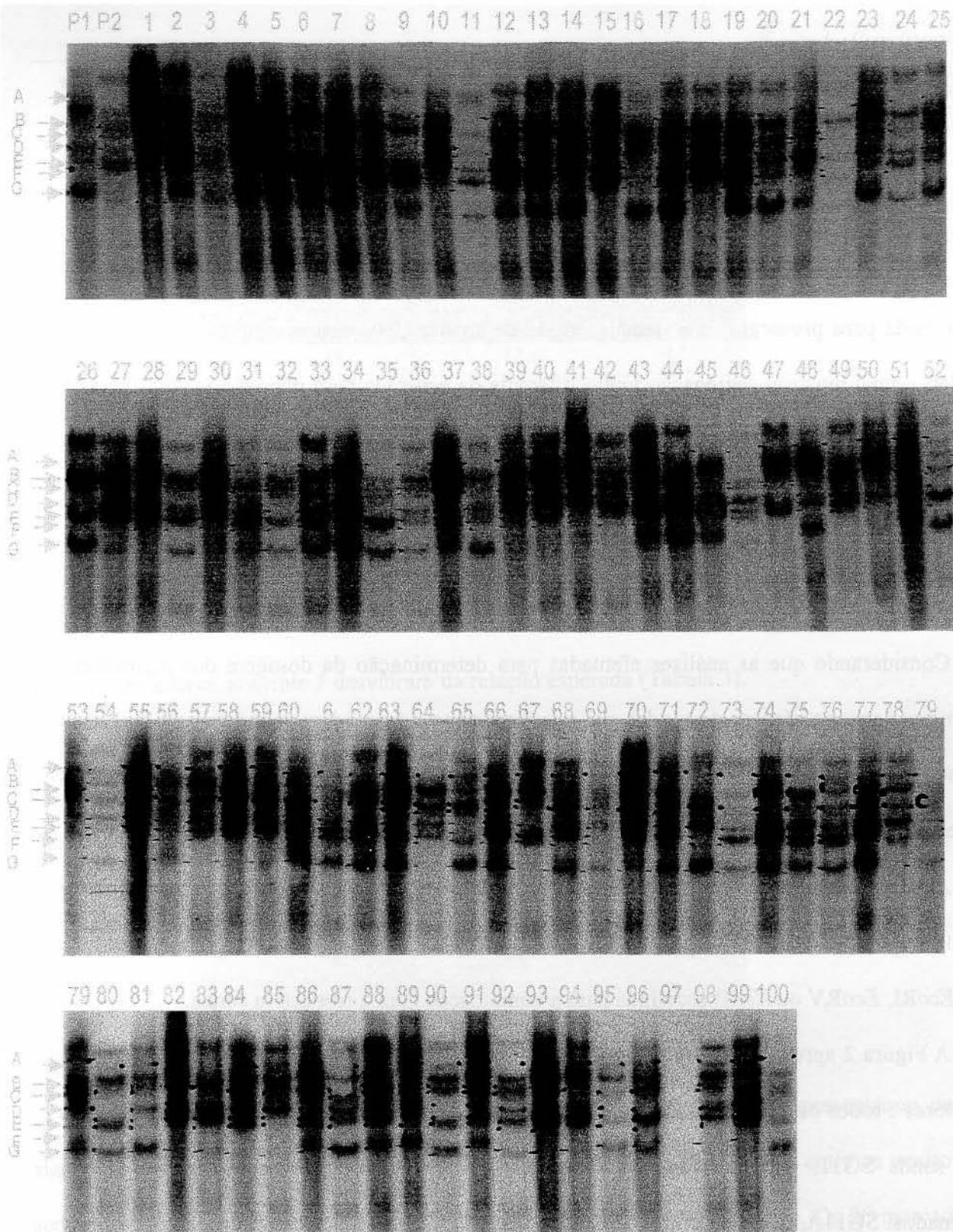


Figura 2. Autoradiografia mostrando o perfil de marcadores RFLP para 100 indivíduos da população proveniente do cruzamento entre duas variedades comerciais. P1 e P2, representam os genitores SP80-180 e SP80-4966 e os números 1-100 correspondem aos indivíduos F1 da progênie utilizada. A genotipagem desses indivíduos foi realizada com a combinação sonda SG011/enzima *Eco* RI. Os marcadores A, B, C, D, E e F são marcadores presentes em dose única no genoma (SDRF).