

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC:45931

IB: 81650

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Milena de Luna Alves Lima

"ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE CANA-
DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) DETECTADA POR AFLP E COEFICIENTE DE
PARENTESCO"

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Milena de Luna Alves Lima
e aprovada pela Comissão Julgadora.

18/10/2000

[Assinatura]

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anete Pereira de Souza

Campinas
2000

UNIDADE	I 13/85650
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	L 628a
V.	Ex.
TOMBO BC	45.731
PROD.	16.3.12/01
C	☐ ☐ ☒
PRECED.	11.00
DATA	10.02.01
N.º CPD	

CM00156388-1

L628a

Lima, Milena de Luna Alves

Análise da similaridade genética entre genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) detectada por AFLP e coeficiente de parentesco / Milena de Luna Alves Lima. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

82f: illus

Orientador : Anete Pereira de Souza
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. *Marcador molecular - AFLP.
3. Coeficiente de parentesco. I. Souza, Anete Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

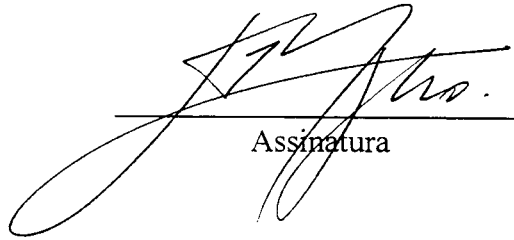
Campinas, 18 de outubro de 2000.

Banca Examinadora

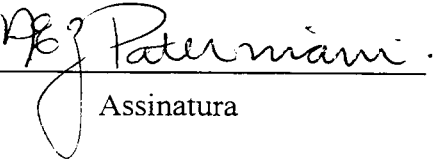
Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko


Assinatura

Prof. Dr. Maria Elisa Ayres Guidetti Zagatto Paterniani


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Júnior

Assinatura

TRILOGIA DA OPERÁRIA DE SI MESMA
Tereza Vignoli (AsaVerso)

I

Sou carne e osso
olho e água

reconstruí em mim
a casa
com o cimento das lágrimas

II

permanece sempre acesa
a fantasia
por mais tijolos
que em mim mesma
eu erga

III

Tenho janelas
agora mais floridas
e uma chaminé a ser acesa

DEDICO

Aos meus pais Elza e Odamil,
pelo exemplo de vida, apoio, incentivo e carinho,
transmitidos durante todas etapas da minha vida

OFEREÇO

À minha orientadora Anete
pela competência e tranquilidade transmitidas
durante todo o desenvolvimento deste trabalho

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza pela oportunidade, incentivo, sobretudo pela grande orientação, essenciais a realização desse sonho.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Garcia (ESALQ/USP), pelos dados fornecidos do coeficiente de parentesco, pelas análises no programa STATISTICA, pelas dúvidas esclarecidas com paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Sizuo Matsuoka (UFSCar), pelas inúmeras sugestões, ensinamentos e comentários sempre bem vindos.

Ao grupo de Pesquisadores do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de São Carlos, pela disponibilidade dos dados, ensinamentos, material vegetal e cooperação em todos os momentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Souza Lopes (ESALQ/USP), pelas sugestões e esclarecimentos.

À Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (UFPE) pela revisão da tese, sugestões e estímulo constante.

Ao Prof. Alexandre Coelho (UFGO), por toda a parte de programação do DBOOT.

À Dra. Maria Elisa Paterniani e ao Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko pelas as importantes sugestões durante o exame da qualificação e pré-banca.

Aos Professores do Departamento de Genética/IB/UNICAMP, pela minha formação acadêmica.

À minha amiga Solange, pela ajuda e paciência nas horas de desabafo.

Às colegas de turma Ana Cláudia, pela amizade e apoio, e à Silvana *in memoriam*.

À toda a turma de São Paulo pelas horas de convivência agradáveis.

Ao Sérgio Sibov e Marlene, pela contribuição na minha formação profissional.

À aluna de iniciação Karine e à técnica Maria Carolina, pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Análises Moleculares/CBMEG, pelos momentos de descontração e apoio.

À Fundação de Apoio Institucional da Universidade Federal de São Carlos (FAI-UFSCar), pelo apoio financeiro para realização desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (FAPESP, 98/01689-0), bem como, pela concessão das bolsas TT3 e MSI (98/10427-0 – 99/01347-5) para a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos Gerais da Cultura da Cana-de-Açúcar.....	5
2.1.1 Histórico da cana-de-açúcar no Brasil e no mundo.....	5
2.1.2 Importância e características gerais da cana-de-açúcar.....	7
2.1.3 Origem e características das espécies <i>Saccharum</i> spp.....	8
2.1.4 Desenvolvimento da cana-de-açúcar através do melhoramento genético.....	11
2.1.5 Classificação taxonômica.....	14
2.1.6 Citologia e citogenética.....	15
2.2 Base Genética da Cana-de-Açúcar.....	18

2.3 Coeficiente de Parentesco.....	20
2.4 Marcadores Moleculares.....	23
2.4.1 RFLP, RAPD e microssatélites.....	23
2.4.2 AFLP.....	25
2.5 Análise dos Dados Moleculares.....	27
2.5.1 Medida de similaridade genética.....	27
2.5.2 Métodos de agrupamento e coeficiente cogenético.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. ARTIGO.....	33
4.1 Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (<i>Saccharum</i> spp.).....	35
5. CONCLUSÕES.....	66
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABELAS

2. Revisão da Literatura

Tabela 1.	Variação do número de cromossomos durante a nobilização”.....	17
-----------	---	----

4. Artigo

Table 1.	Identification of the 83 sugar cane genotypes used in the pedigree and AFLP-based genetic similarity assessments.....	59
----------	---	----

Table 2.	Number of polymorphic AFLP bands observed using twenty one AFLP primer combinations.....	60
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

4. Artigo

- Figure 1. AFLP profiles of 41 sugar cane cultivars generated by E+ACT/M+CTA primer combination..... 62
- Figure 2. Dendrogram of the 83 sugar cane genotypes revealed by UPGMA cluster analysis of AFLP-based genetic similarity (Jaccard's coefficient) estimates ($r_{cof}=0.84$), using 1,121 AFLP polymorphic bands obtained by 21 primer combinations. Two stars indicates the group containing the NA56-79 cultivar and its offsprings; one star indicate the grouping of SP80 cultivars..... 63
- Figure 3. Plot of the coefficient of variation of the complement of Jaccard's coefficient among all accessions estimated by bootstrap analysis for subsamples with different numbers of AFLP bands..... 64
- Figure 4. Plot of AFLP-based genetic similarity (Jaccard's coefficient) and coefficient of parentage for 3,403 pairs of the sugar cane cultivars (Pearson's correlation $r=0.42$)..... 65

RESUMO

O sucesso de qualquer programa de melhoramento genético é dependente das recombinações genéticas superiores geradas pelos cruzamentos que ele executa. Todos os programas procuram, pois, gerar e manter uma diversidade genética na população que garanta as recombinações superiores geradas. Entretanto, na cana-de-açúcar, há muita dificuldade para se assegurar tal providência. Isto se deve principalmente a sua complexidade genética, bem como, pelo fato de muitos genitores serem provenientes de policruzamentos, portanto, sem identificação do genitor masculino. No presente trabalho foram utilizados marcadores moleculares do tipo AFLP para a caracterização genética de um grupo de 83 genótipos do banco de germoplasma de um dos programas de melhoramento genético brasileiro e, a similaridade genética obtida foi comparada com o coeficiente de parentesco (f).

Vinte e uma combinações de *primers* foram utilizadas para a obtenção dos marcadores AFLP, gerando um total de 2.331 bandas, sendo 1.121 polimórficas, com taxa de polimorfismo de 50%, em média, por combinação de *primer*. As bandas polimórficas foram utilizadas para construção da matriz de similaridade, empregando-se o índice de Jaccard. O dendrograma indicando o agrupamento dos genótipos foi construído utilizando-se o método UPGMA. As análises de *bootstrap* revelaram que o número de marcadores utilizados foi suficiente para uma estimativa confiável da similaridade genética, onde o coeficiente de variação (CV) foi inferior a 5%. Observou-se correlação linear positiva moderada ($r=0,42$) ($P<0,001$) entre os dados de distância genética a partir de AFLP e f .

Os valores de similaridade genética através do AFLP e o coeficiente de parentesco baseado na genealogia não foram completamente concordantes, sendo que a estimativa da similaridade genética possibilitou a aquisição de informações aparentemente mais corretas do que aquelas fornecidas pela genealogia. Assim, os marcadores AFLP representam uma

importante ferramenta para o conhecimento da diversidade genética entre clones de cana-de-açúcar, permitindo aos melhoristas a realização de uma escolha mais segura dos parentais a serem utilizados em hibridações nos programas de melhoramento.

SUMMARY

Despite the economical importance of sugar cane, until the present date no studies have been carried out to determine the correlation of the molecular-based genetic similarity (GS) and the coefficient of parentage (f) estimates generated for cultivars. A comprehensive knowledge of the amount of genetic diversity in cultivars, used as parents in crossings, could improve the effectiveness of the breeding programmes. In this study, amplified fragment length polymorphism (AFLP) and pedigree data were used to investigate the genetic relationship in a group of 4 *Saccharum* spp. clones (*S. officinarum*, *S. sinensi* and *S. barberi*) and 79 cultivars (interspecific hybrids) used as parents in one of the Brazilian breeding programmes. The objectives of this study were to (a) assess the level of genetic similarity among the sugar cane cultivars and (b) investigate the correlation between the AFLP-based GS and the f , based on pedigree information. Twenty-one primer combinations were used to obtain the AFLP molecular markers, generating a total of 2,331 bands, of which 1,121 were polymorphic, with a polymorphism rate of 50% for primer combination on average. GS were determined using Jaccard's similarity coefficient, and a final dendrogram was constructed using an unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA). AFLP-based GS ranged from 0.28 to 0.89, with a mean of 0.47, whereas f ranged from 0 to 0.503, with a mean of 0.057. Cluster analysis divided the genotypes into related subgroups suggesting that there is important genetic relatedness among the cultivars. AFLP-based GS and f were significantly correlated ($r = 0.42$, $P < 0.001$), thus the largeness of this r value suggesting that AFLP data may help quantify more accurately the degree of relatedness among sugar cane cultivars.

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, família Poaceae, tribo Andropogoneae. As cultivares modernas de cana-de-açúcar são híbridos interespecíficos entre cinco espécies: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi* e *S. sinense*. As primeiras hibridações interespecíficas foram desenvolvidas no final do século XIX, especialmente pelos programas de melhoramento da Estação Experimental de Java, Indonésia e de Coimbatore (Índia). O método de melhoramento foi chamado de “nobilização” de *S. spontaneum* em *S. officinarum*, pois envolvia a hibridação da *S. officinarum* (cana nobre) com a *S. spontaneum* (cana selvagem), seguida de inúmeros retrocruzamentos com *S. officinarum*. Este método de melhoramento, apesar de ter gerado um desequilíbrio cromossômico, aumentando a complexidade genômica da cultura, possibilitou a obtenção de híbridos que proporcionaram avanços continuados no melhoramento de cana-de-açúcar, através da resolução de problemas de vulnerabilidade genética e possibilitando a associação das características de produção e de adaptabilidade.

As cultivares modernas de cana-de-açúcar, devido à sua natureza híbrida, caracterizam-se por apresentarem variabilidade genética considerável e elevada poliploidia. Contudo, como poucos indivíduos participaram dos cruzamentos interespecíficos iniciais, há seria preocupação de que a sua base genética seja excessivamente estreita. Poucos estudos foram efetuados visando o conhecimento das relações genéticas entre as cultivares modernas. Métodos tradicionais com base nas características fenotípicas, cálculo do coeficiente de parentesco utilizando a genealogia e análise de isoenzimas têm sido empregados com relativo sucesso. Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta adicional a ser empregada nos estudos genéticos da cultura de cana-de-açúcar,

apresentando as vantagens de serem fenotipicamente neutros e detectarem elevado número de polimorfismo.

A análise da similaridade genética pela mais recente classe de marcadores moleculares, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ainda não foi descrita para cana-de-açúcar. Além disso, o germoplasma de cana-de-açúcar utilizado no Brasil ainda não foi analisado quanto à diversidade existente através de técnicas moleculares.

Os resultados obtidos neste trabalho serão empregados na escolha dos parentais a serem utilizados em futuros cruzamentos no Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (PMGCA/CCA/UFSCar). Desta forma será possível efetuarem a escolha de parentais geneticamente divergentes, aumentando a possibilidade de sucesso no processo de seleção.

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico, a ser submetido à revista *Theoretical and Applied Genetics*.

2. REVISÃO DA LITERATURA



2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais da Cultura da Cana-de-Açúcar

2.1.1. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil e no mundo.

A origem da cana-de-açúcar e sua completa história encontram-se perdidas na antigüidade. Foram encontradas referências relatando que a cana se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia, na Indonésia e na Nova Guiné, disseminando-se com as migrações daqueles povos para as ilhas do Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. (Brandes, 1956; Daniels e Roach, 1987). A manufatura do açúcar deve ter aparecido na Pérsia por volta de 500 d.C, indo depois para o Norte da África (600 a 800 d.C.) e de lá levada pelos conquistadores árabes para a Espanha. A primeira cana cultivada nas costas da África e das Américas, de nome Creola, foi levada por Cristovão Colombo (Deer, 1921; Bremer, 1961a). Desde aquela época, seu cultivo vem se estendendo por quase todos os lugares do mundo, principalmente nos países tropicais e subtropicais (Matsuoka *et al.*, 1999).

No Brasil, encontram-se relatos de que a primeira introdução ocorreu em 1532 na Capitania de São Vicente, embora deva ter sido introduzida em expedições anteriores em outras regiões. Durante os três primeiros séculos da colonização, provavelmente a única variedade cultivada foi a Creola, também conhecida por Mirim ou ainda Cana da Terra, o "ciclo da Creola" estendeu-se de 1532 a 1810. Por ser suscetível a várias doenças, seu cultivo ficou limitado em terras virgens, de alta fertilidade, tem-se que esta variedade era um híbrido natural de *S. officinarum*. A variedade Creola começou a ser substituída pela

Cana Caiana a partir de 1810, a qual proporcionou ganhos significativos para a indústria açucareira do Brasil por ser mais produtiva e rica em sacarose (Junqueira e Dantas, 1964; Miocque e Machado Jr., 1977).

Três novas variedades foram importadas das ilhas Bourbon por volta de 1850: Roxa, Salangor e Rosa, pouco depois vieram a cana Mole, Listada e Ubá. A partir de 1879, entraram no Brasil, provenientes da ilha Maurício, as variedades Bois Rouge, Lousier e Kavengire (Junqueira e Dantas, 1964). Na década de 20, uma epidemia de mosaico tornou inviável o cultivo destas variedades nobres, reduzindo acentuadamente a produtividade da lavoura da cana-de-açúcar (Matsuoka *et al.*, 1990).

Os canaviais se recuperaram com a introdução das variedades javanesas POJ, destacando-se POJ36, POJ213, POJ2878 e POJ2714. A partir de 1932 foram importadas de Coimbatore as variedades Co281 e Co290. Por volta de 1940 vieram as variedades Co331, Co413, Co419 e Co421, as quais podem ser encontradas cultivadas marginalmente até hoje em alguns estados brasileiros. Com o surto de carvão se interrompeu este ciclo (Matsuoka *et al.*, 1999).

Um novo período de plantio, graças à dedicação do melhorista Frederico Meneses Veiga, surgiu com as variedades brasileiras obtidas de Campos (RJ), podendo-se destacar a CB41-76, intensamente utilizada na lavoura paulista até 1976 e a CB45-3, a mais cultivada em Minas Gerais e em todo Nordeste brasileiro até os anos 80 (Matsuoka *et al.*, 1998).

Na passagem da década de 60 para a de 70 ocorreu um aumento de produtividade, este período coincidiu com a adoção nas lavouras brasileiras da variedade argentina NA56-79. Esta causou uma revolução na agroindústria brasileira devido a suas várias qualidades, que não havia sido encontradas nas variedades até então cultivadas. Quando a NA56-79

começou a apresentar problemas, dois novos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, passaram a liberar novas e boas variedades. Ambos estabelecidos na década de 70, o programas de melhoramento da COPERSUCAR, liberou as variedades da sigla SP, e do Instituto do Açúcar e do Alcool – IAA/PLANALSUCAR liberou as variedades da sigla RB (Matsuoka, 1991; Matsuoka, 1999).

Entre as novas variedades brasileiras, destacou-se primeiramente a SP70-1143 em 1989, seguida pela SP71-1406. Logo depois, a variedade SP71-6163 ganhou preferência e passou a líder em 1993. Contudo, devido ao seu mau comportamento em soqueiras levou à sua rápida substituição, ocasião que surgiu a RB72454 como muito boa variedade. Esta, logo assumiu a liderança em 1996. A previsão para os novos plantios é de que variedades como RB835486, RB845257, RB855113, RB855536, SP80-1816 e SP81-3250 serão as preferidas, mas complementadas por outras de boas características específicas. Exemplo são as variedades de maturação precoce como RB835054, RB855035, RB855156 e RB855453 (Matsuoka, 1999).

Assim, considerando o cenário nacional dos últimos anos, o Estado de São Paulo assumiu a liderança na produção e na tecnologia da cana-de-açúcar no País, tendo se constituído como a região, assim como outras regiões, que se preocupou com a obtenção de novas variedades (Junqueira e Dantas, 1964; Matsuoka, 1999).

2.1.2. Importância e características gerais da cana-de-açúcar

Tem-se conhecimento de que o caldo da cana-de-açúcar, desde épocas passadas, já era usado na alimentação, na fabricação de vinho e de medicamentos para cura de doenças, no caso, hanseníase, hemorróida, febre e outros (Daniels e Daniels, 1975). Atualmente,

além de ser uma fonte natural de sacarose, também contribui para a fabricação de álcool combustível, considerado menos poluente do que a gasolina. O Brasil é pioneiro na utilização desta tecnologia como combustível (COPERSUCAR, 1988).

As variedades de cana-de-açúcar modernas são híbridos intra e interespecíficos sintetizados a partir das espécies *S. officinarum* (canas nobres), *S. barberi* (canas indianas) e *S. sinense* (canas chinesas), *S. spontaneum* e *S. robustum*, sendo as duas últimas consideradas espécies selvagens (Stevenson, 1965). Berding e Roach (1987), quando revisaram e discutiram a manutenção e o uso do germoplasma, incluíram como sendo de interesse dos melhoristas outros gêneros estreitamente relacionados ao *Saccharum* spp. envolvidos na origem da cana-de-açúcar. O termo “complexo *Saccharum*” foi empregado por Mukherjee (1957) em uma revisão da origem e distribuição da cana-de-açúcar para representar este inter-relacionamento, no qual estão incluídos os gêneros *Erianthus* sect. *Ripidium* Henrard, *Sclerostachya* A. Camus e *Narenga* Bor. O gênero *Miscanthus* sect. *Diandra* Keng foi acrescentado ao complexo *Saccharum* em revisão feita por Daniel *et al.* (1975), sem o qual, as espécies do complexo não conteriam todas as características botânicas que permitiriam o surgimento de *Saccharum*.

2.1.3. Origem e características das espécies *Saccharum* spp.

Para o gênero *Saccharum* são descritas seis espécies (Mukherjee, 1957) que mais recentemente Irvine (1999) sugere considerar como classe hoticultural. A seguir as seis espécies são caracterizadas resumidamente:

***Saccharum officinarum* Linnaeus**

As variedades desta espécie foram denominadas de “canas nobres” (Bremer, 1961a), devido às suas cores brilhantes, colmos longos, espessos (14 a 46 mm de diâmetro), suculentos e com alta concentração de sacarose, baixo teor de fibra, boa despalha natural e alta produção em condições de cultivo favoráveis.

Esta espécie originou as principais variedades comerciais utilizadas na produção de açúcar antes da existência dos programas de melhoramento. O centro de sua diversidade é a Nova Guiné, sendo sua origem não precisamente conhecida. Admite-se que a cana tenha surgido nesta mesma região, a partir dos cruzamentos entre *S. spontaneum*, *Miscanthus* e *Erianthus arundinaceus* (Daniels e Daniels, 1975), passando por *S. robustum*. Brandes (1956), assim como Grassl (1964), levantaram a hipótese que o manejo humano inicial ocasionou uma pressão de seleção sobre *S. robustum* originando *S. officinarum* na mesma região do centro de diversidade da cana-de-açúcar.

***Saccharum spontaneum* Linnaeus**

Principal espécie dentre as selvagens, caracteriza-se por apresentar morfologia variada e ampla capacidade de adaptação ambiental. A Índia é o seu centro de origem e de diversidade, sendo posteriormente transportada para a Ásia pelos indonésios (Daniels e Daniels, 1975). Sua distribuição abrange desde as latitudes de 8° Sul a 40° Norte da África, estendendo-se ao Japão e à Indonésia/Nova Guiné até o Mediterrâneo (Brandes *et al.*, 1939; Mukherjee, 1950; Panje e Babu, 1960). As variedades desta espécie variam com relação à aparência, em tipo pequeno de arbusto sem colmo, a colmos espessos de mais de 5 m de altura, com diâmetro variando de 3 a 15 mm. As folhas caracterizam-se pela ausência de limbo, restringindo-se apenas à nervura central ou, apresentando limbos de até 4 cm de

largura (Artschwager, 1942). Esta espécie tem dado grande contribuição ao melhoramento, através da transmissão de características como vigor, dureza, perfilhamento e capacidade de rebrota de soqueira, especialmente devido ao vigoroso rizoma e à resistência aos estresses, às doenças e às pragas (Naidu e Sreenivasan, 1987).

***Saccharum robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl**

A hipótese de que esta espécie se originou da introgressão de *S. spontaneum* com outros gêneros na região da Nova Guiné e adjacências da Melanésia, surgiu com a revisão de Daniels e Roach (1987), a qual teve como suporte os estudos de Waldron e Glasziou (1972) com isoenzimas.

No seu *habitat* natural, *S. robustum* é extremamente vigorosa, formando touceiras bem fechadas. Os colmos podem ser eretos ou decumbentes, apresentando grandes diâmetros que aumentam nas proximidades do nó. O caule normalmente apresenta-se semelhante à madeira e a medula interna com pouco caldo e alto teor de fibra (Stevenson, 1965).

***Saccharum sinense* Roxburgh e *Saccharum barberi* Jeswiet**

Espécies cultivadas desde os tempos pré-históricos, na China (*S. sinense*) e no Norte da Índia (*S. barberi*). Os clones destes grupos foram separados da *S. officinarum* pelas características florais, colmos finos e medianos, concentração baixa a moderada de açúcar, alto teor de fibra e adaptação às condições adversas. A *S. sinense* surgiu provavelmente da introgressão de *S. officinarum* com *Miscanthus*, ou com *S. spontaneum* na China, após a introdução da primeira em épocas pré-históricas. A *S. barberi* pode ter surgido de forma independente no noroeste da Índia, ou da introgressão de *S. officinarum* com *Erianthus* sect. *Ripidium* (Daniels e Roach, 1987). O uso de *S. sinense* e *S. barberi* em programas de

melhoramento é restrito em função do fraco florescimento e da baixa fertilidade das flores, o que deve estar relacionado à sua origem híbrida, resultando em aneuplóides e meioses altamente irregulares (Sreenivasan *et al.*, 1987).

***Saccharum edule* Hasskarl**

Esta espécie caracteriza-se por ter inflorescência compactada e comestível. É considerada tradicionalmente como hortaliça e cultivada nos jardins das aldeias da Nova Guiné e Fidji. Segundo Daniels e Roach (1987), *S. edule* é considerada como um produto de introgressão de *S. officinarum* ou *S. robustum* com outro gênero, constituído de uma série poliplóide, com $2n=60$, 70 e 80, com formas aneuplóides.

2.1.4. Desenvolvimento da cana-de-açúcar através do melhoramento genético

Antes da descoberta de sua fertilidade sexual, acreditava-se que a reprodução da cana-de-açúcar ocorria apenas via propagação vegetativa. O melhoramento restringia-se à introdução de formas nativas retiradas de seus centros de origem. Segundo Berding e Roach (1987), no ano de 1857 em Barbados, foi observado que as plantas no campo cresciam a partir de sementes de cana-de-açúcar. Apenas em 1888 esta descoberta foi reconhecida com as publicações de Soltwedel, nas quais relata seus experimentos de campo na Estação Experimental de Java durante os anos de 1885, 1886 e 1887. Entretanto, no Brasil, já em 1842, o médico Gervásio Caetano Peixoto Lima em defesa de tese na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, afirmou que a cana-de-açúcar se reproduzia a partir de sementes sexuais nos locais de origem, fato que, na época parecia ser de conhecimento bastante estabelecido (Machado Jr., 1987).

A partir de então se iniciou o desenvolvimento do melhoramento de cana-de-açúcar através dos cruzamentos interespecíficos. O que impulsionou esses cruzamentos foi a grande suscetibilidade às doenças observadas nas variedades resultantes dos cruzamentos intraespecíficos de *S. officinarum*. As pesquisas de melhoramento baseavam-se no aumento do número dos cromossomos e vigor dos híbridos. Os cruzamentos interespecíficos com variedades selvagens favoreciam a combinação de genes favoráveis, como os genes de resistência às doenças e também, o conjunto haplóide da *S. spontaneum* auxiliava a eliminar a queda no vigor devido aos cruzamentos intraespecíficos (Bremer, 1961b). Os pesquisadores da estação acharam necessário retrocruzar os híbridos obtidos com *S. officinarum* (cana nobre) para que as características selvagens indesejáveis fossem “diluídas”, referindo-se a este processo como “nobilização” de *S. spontaneum* por *S. officinarum* (Roach, 1989). Segundo a revisão de Pires (1993), as canas da 1ª nobilização correspondem aos híbridos F₁ resultante do cruzamento entre duas espécies, as canas da 2ª nobilização são resultantes do primeiro retrocruzamento dos híbridos F₁ com a espécie *S. officinarum*, e as canas da 3ª e 4ª nobilização resultam, respectivamente, do segundo e terceiro retrocruzamentos (Bremer, 1961a).

A primeira tentativa de obtenção de um híbrido resistente às doenças, porém fracassada, foi em 1887, quando Soltwedel, utilizou *S. spontaneum* com o gênero *Erianthus arundinaceus*. Contudo, o sucesso veio por Wakker, em 1893, através do cruzamento de *S. officinarum* (Black Cheribon) com um híbrido natural entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Kassoer) que crescia na base do vulcão Tjerimai no Oeste de Java. Kobus em 1897, repetiu o cruzamento, contudo, utilizou *S. officinarum* com *S. barberi* (Chunnee), com o intuito de combinar a alta concentração de sacarose e o alto vigor vegetativo das canas nobres com a

resistência à doença do segundo. Através do processo de nobilitação, alguns anos depois, surgiu o híbrido POJ2878, com qualidades que permitiram ao clone em poucos anos ocupar 90% da área cultivada em Java e se disseminar por todo o mundo (Roach, 1989). Muitos programas de melhoramento no mundo se beneficiam até hoje dos cruzamentos iniciais ocorridos na época em Java.

Segundo Machado Jr. (1987), no Brasil, o Sr. Manoel Cavalcanti de Almeida, que foi senhor de Engenho de Escada, PE, estimulado pelos trabalhos realizados em Java, colheu sementes da inflorescência da cana Caiana criando, entre outras, a primeira variedade de cana-de-açúcar brasileira chamada Manteiga. Esta variedade foi bastante difundida e plantada, predominando em Pernambuco durante 30 anos, o que foi chamado de “ciclo da Manteiga”, até ser substituída devido ao ataque do mosaico (Dantas e Melo, 1960).

Os ataques constante de doenças, a baixa produtividade e concorrência do açúcar produzido em outros países, propiciaram uma preocupação do setor açucareiro brasileiro com relação à melhoria da qualidade da cana como um todo, fazendo-se assim necessárias pesquisas sistematizadas na área. Desta forma, várias Estações Experimentais foram fundadas, como a de Campos (RJ), do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), do PLANALSUCAR e da COPERSUCAR, sendo as três últimas desenvolvidas no Estado de São Paulo. Apesar do encerramento de algumas das Estações, a contribuição das mesmas para o País trouxe saldos bastantes significativos, estabelecendo normas, difundindo tecnologia e promovendo o intercâmbio de germoplasma (Matsuoka *et al.*, 1999).

O PLANALSUCAR foi extinto em 1990. Contudo, durante sua existência, o programa de melhoramento liberou 18 variedades. Em 1991, sete Universidades Federais

absorveram grande parte do seu patrimônio (UFAL, UFS, UFRPE, UFRRJ, UFV, UFSCar e UFPR), possibilitando a continuidade dos trabalhos. Devido a essa continuidade, aliado às parcerias com o setor privado, em setembro de 1992 a UFSCar liberou cinco variedades (Núcleo de Melhoramento/CCA-UFSCar, 1992), em março de 1995, quatro variedades superprecoces (Matsuoka *et al.*, 1995) e mais seis variedades em 1998 (Matsuoka *et al.*, 1998).

2.1.5. Classificação taxonômica

Planta alógama, pertencente à família *Gramineae* (Poaceae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*, a cana-de-açúcar tem passado por extensiva revisão taxonômica, fazendo com que os taxonomistas e evolucionistas enfrentem grandes dificuldades para limitar as espécies desse gênero. Por outro lado, os melhoristas têm, de uma forma geral, aceito a classificação proposta por Jeswiet em 1925 e modificada por Brandes em 1956. Neste caso, as espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* formam o gênero *Saccharum* (Daniels e Roach, 1987). Alguns taxonomistas consideram *S. barberi* e *S. sinense* uma só espécie.

Como a maioria dos cultivares atuais da cana são resultados de cruzamentos e recruzamentos entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum*, a aplicação de um nome específico, ou da designação de um parentesco híbrido, é imprópria e muitas vezes duvidosa. Deste modo, utiliza-se unicamente o nome do clone.

2.1.6. Citologia e citogenética

Os estudos citogenéticos em cana-de-açúcar foram iniciados por Bremer em 1920, os quais colaboraram de forma decisiva para o entendimento dos cruzamentos interespecíficos (Stevenson, 1965). Bremer (1924) estabeleceu que o número típico da espécie *S. officinarum* é de $2n=80$ e que os clones com número de cromossomos diferente eram provavelmente híbridos. Contudo, ocorriam certas irregularidades durante a meiose desta espécie, as quais variavam tanto de célula para célula, quanto de clone para clone (Bremer, 1923; 1924). Com relação a essas irregularidades durante a meiose, os clones da espécie foram separadas em três classes: i) clones que tinham meiose normal com formação regular de bivalentes; ii) clones que tinham baixa frequência de anormalidades meióticas avaliadas pela ocorrência de poucos univalentes; iii) clones que tinham alta frequência de anormalidades meióticas com ocorrência de univalentes, cromossomos atrasados, pontes e anormalidades no fuso (Sreenivasan *et al.*; 1987).

Desde a primeira contagem de cromossomos na espécie *S. spontaneum* ($2n=40-128$) realizada no Japão por Kuwada em 1915, vários pesquisadores têm relatado a ampla variação no número de cromossomos desta espécie. Segundo estudo feito com 450 clones por Panje e Babu (1960) a espécie pode ser separada com relação à distribuição de área e número de cromossomos em três setores. Clones com número de cromossomos variando de $2n=112$ a 128, incluem o setor Oeste das regiões da África com o Mediterrâneo. Número de cromossomos variando de $2n=80$ a 112 são do setor Oriental, incluindo as regiões Sul da Ásia com o Pacífico. O setor Central (subcontinente Indiano) reúne clones com número de cromossomos variando de $2n=40$ a 80, assim, este setor indica uma maior atividade evolucionária na espécie que aquela ocorrida nos outros setores.

Anormalidades decorrentes das interações dos diferentes genomas na espécie *S. spontaneum* podem ocasionar, durante a mitose, o aparecimento de pseudobivalentes, multivalentes, bivalentes heteromórficos ou desiguais, mosaicismo cromossômico e associações secundárias de bivalentes com fracionamento do complemento (Sreenivasan e Jagathesan, 1975).

Na espécie *S. robustum* ($2n=60-205$) existem dois tipos citológicos, um com $2n=60$ e outro com $2n=80$. Prince (1965) reconheceu cinco grupos de híbridos nesta espécie, três deles com $2n=60$, e os outros dois com $2n=80$, mas ocorre ainda um sexto grupo, com $2n=114-205$ (Daniel e Roach, 1987).

D'Hont *et al.* (1998) estudando DNA ribossomal em três espécies principais do gênero *Saccharum*, verificou por hibridação *in situ* que o número básico de cromossomos para *S. officinarum* era 10 e 8 para *S. spontaneum*.

Na espécie *S. sinense* o conjunto de cromossomos varia de $2n=116-120$ e em *S. barberi* de $2n=82-124$. Ambas apresentam meioses altamente irregulares e aneuplóides (Sreenivasan *et al.*, 1987).

Roach (1972) afirma existir evidências sobre a possível origem híbrida da *S. edule* e acusa a existência de uma série de poliplóides com $2n=60$, 70 e 80 cromossomos, além da presença de clones aneuplóides.

Nos cruzamentos interespecíficos de *S. officinarum* com *S. spontaneum* ocorre uma peculiaridade citológica na transmissão do gameta $2n$, quando a *S. officinarum* participa como genitor feminino. Segundo os estudos citológicos elaborados por Bremer (1961b) na Estação Experimental em Java, observou-se que na primeira e na segunda nobilização ocorria um aumento no números de cromossomos nos híbridos, entretanto, na 3ª

nobilização este aumento não ocorria. Seguindo o exemplo de Pires (1993) a Tabela 1 mostra uma visão geral do número de cromossomos durante os três estágios de nobilização.

Tabela 1. Variação do número de cromossomos durante a “nobilização”.

Estágios de Nobilização	Geração	Nº de Cromossomos	Proporção (%)	
			<i>S. officinarum</i> : <i>S.spontaneum</i>	
I	F ₁	2n= 80+32= 112	71,4	28,6
II	RC ₂	2n= 80+56= 136	88,2	11,8
III	RC ₂	2n= 40+68= 108	92,6	7,4

Esta transmissão (2n+n) peculiar de duas séries haplóides do parental feminino *S. officinarum* e outra série do parental masculino foi, de maneira geral, observada entre os híbridos.

Prince (1961) trabalhou com várias hipótese para explicar o mecanismo de transmissão de gametas 2n através da célula ovo, entre as quais estão:

- formação da célula ovo não reduzida;
- duplicação dos cromossomos através da endoduplicação na fase de tétrade;
- fusão pós-meiótica de dois núcleos internos na megáspora;
- endomitose pós-meiótica na célula ovo;
- incompatibilidade dos gametas tipo (n+n), fertilização seletiva ou, ainda, uma combinação da fertilidade seletiva com partenogênese sob a avaliação diferencial dos zigotos sobreviventes dos tipos (2n+n) e (n+n);

- f) falhas na combinação zigótica devido ao desenvolvimento de endosperma defeituoso (seleção por sobrevivência).

2.2. Base Genética da Cana-de-Açúcar

Análises com isoenzimas (Glaszmann *et al.*, 1989; Eksomtramage *et al.*, 1992) e o marcador molecular RFLP (Lu *et al.*, 1994) demonstraram uma forte diferenciação entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Estas análises também revelaram que a maior parte da diversidade entre as variedades de cana-de-açúcar é devida à presença ou ausência de genes de *S. spontaneum* no genoma. Trabalhando com o híbrido interespecífico comercial R570, D'Hont *et al.* (1996) mostraram que 10% do genoma total tem sua origem de duas espécies, *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Esta fração de ambos os cromossomos foi evidenciada por análise de hibridização *in situ* com sonda fluorescente (FISH).

Tai e Miller (1978) estudando a genealogia de 17 variedades CP comerciais de cana-de-açúcar verificaram que apenas três espécies (*S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. barberi*) participaram da origem dessas variedades, sendo o que mais contribuiu foi a espécie *S. officinarum* seguida pela *S. barberi*.

Arceneaux (1967) e Prince (1967), ambos revisando a origem das variedades híbridas modernas de cana-de-açúcar, notaram a base genética limitada em relação à sua diversidade disponível. Daniels e Roach (1987) relataram que a participação das outras espécies é ainda mais limitada. Chang e Lo (1993) investigando a base genética de variedades ROC de cana-de-açúcar em Taiwan, através de medidas de coeficiente de

parentesco, reforçou a tese sobre a base genética restrita da cultura e a necessidade de introdução de novas fontes de diversidade genética nos programas.

Pommer e Bastos (1984) avaliando a base genética do programa de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas, calcularam as percentagens teóricas de transmissão de fatores genéticos de *Saccharum* spp. na genealogia de 23 variedades IAC. Os autores verificaram que apenas as espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. barberi*, num total de 16 genótipos, contribuíram para a formação das variedades, sendo a contribuição percentual da primeira de 57%, mesmo considerando que 40% dos fatores genéticos se originaram de parentais desconhecidos. Os autores concluíram que os resultados apurados levaram a um estreitamento da base genética. A mesma conclusão foi encontrada por Garcia *et al.* (1999) estudando variedades brasileiras cultivadas ou liberadas nos últimos 50 anos. Essas variedades foram originadas a partir de 49 ancestrais, embora apenas 14 deles sejam responsáveis por cerca de 90% dos genes presentes no conjunto de variedades estudadas.

Vello (1988) enfatiza duas situações que podem acarretar problemas quando a base genética é estreita: o estabelecimento de um patamar de produtividade, tornando cada vez mais difícil a obtenção de descendentes superiores aos parentais inter cruzados, e o aumento da vulnerabilidade genética devido ao estresse, como doenças, pragas, toxidez ao alumínio e outros. Além disso, a cana-de-açúcar é praticamente uma monocultura, isto é, extensas áreas são plantadas com o mesmo material vegetal, sendo que a uniformidade genética resultante favorece o ataque de doenças (Arruda, 1946).

A maioria dos centros de melhoramento no mundo preocupa-se em ampliar a base genética de seu material, através dos chamados programas básicos ou Programas de

Alargamento Genético. Uma das estratégias para o aumento da base genética do germoplasma utiliza uma porção de genótipos exóticos selecionados, por exemplo através de hibridações, utilizando outros gêneros do "complexo *Saccharum*", como *Miscanthus*, *Ripidium* e *Erianthus* (Tai e Miller, 1978). Outra estratégia utiliza cultivares adaptados, como parentais geneticamente divergentes que serão utilizados para cruzamentos (Vello, 1988), fato enfatiza a necessidade em se conhecer a base genética dos materiais utilizados para acessar a exata variabilidade disponível (Pommer e Bastos, 1984).

Os programas de melhoramento desenvolvidos após os cruzamentos interespecíficos, embora explorando uma base genética estreita, obtiveram grandes avanços no que diz respeito à produção, à resistência à doenças, ao teor de sacarose, à precocidade, à adaptabilidade e outros. Na verdade, estes resultados refletem a existência de variabilidade genética suficientemente ampla na cultura (Hogarth *et al.*, 1981). Entretanto, Peixoto (1986) afirma que a base genética estreita comum aos parentais avaliados contribui para uma redução na variabilidade genética nas progênies correspondentes, incrementando a endogamia e provocando depressão para os caracteres de produção.

2.3. Coeficiente de Parentesco

Informações sobre a base genética do germoplasma e as relações entre o material elite que será melhorado, com a escolha de parentais para obtenção de híbridos, é essencial em programas de melhoramento (Hallauer e Miranda Filho, 1988). Uma ferramenta proposta para auxiliar o melhorista nessa tarefa é o conhecimento *a priori* do grau de parentesco entre os possíveis progenitores. O grau de parentesco entre as variedades pode

ser estimado pelo coeficiente de parentesco (f) (Kempthorne, 1969), também chamado de coancestralidade ou coeficiente de *kinship* (Falconer, 1989), fornecendo uma estimativa das relações genéticas entre dois genótipos baseado na análise das genealogias (Cox *et al.*, 1985).

O coeficiente de parentesco entre dois genótipos é a probabilidade de que um gene ao acaso de um indivíduo seja idêntico na origem a um gene ao acaso do mesmo loco de outro indivíduo (Malécot, 1969). O cálculo além de requerer a genealogia detalhada de todos os genótipos, admite que os ancestrais originais do germoplasma em estudo não são relacionados ($f=0$). Também admite-se que cada parental contribui com igual proporção de alelos para sua progênie, portanto, não há seleção, fato este que muitas vezes não corresponde à realidade (Vello *et al.*, 1988; Carter *et al.*, 1993).

Esta medida de diversidade é muito utilizada em espécies autógamas. Cox *et al.* (1985) estudando a genealogia dos cultivares de soja entre 1950 e 1970 nos EUA, observou que a relação entre os cultivares subiu 46% ($f=0,13$ a $0,19$). Sua conclusão foi que a diversidade genética entre eles estava declinando. O mesmo autor, em 1986, estudando as relações de parentesco entre variedades de trigo, observou que entre as variedades de trigo de inverno houve diminuição de f nos anos de 1919 e 1984 ($f=1,0$ a $0,4$) e, entre aquelas de trigo de primavera o f permaneceu quase constante ($f=0,30$ a $0,35$), concluindo que a diversidade genética dentro dos cultivares dos dois tipos estava aumentando.

O cálculo do coeficiente de parentesco usado para espécies autógamas, teve que ser adaptado para sua utilização na cultura de cana-de-açúcar. Como todos os ancestrais, cultivares e parentais em cana-de-açúcar são heterozigotos foi admitido o valor de $f=0,5$ no parentesco do genótipo consigo mesmo (Chang e Lo, 1993), diferente das espécies

autógamas, onde este valor é 1,0. Deren (1995), avaliando a diversidade genética das *Saccharum* spp. cultivadas nos EUA fez outra modificação; ele calculou um valor médio de f entre todos os parentais masculinos envolvidos em policruzamento para estimar sua contribuição genética pois, em policruzamentos, apenas os parentais femininos são conhecidos. As conclusões do autor foram que 10 ancestrais contribuíram com 90% ou mais do germoplasma dos cultivares de Louisiana e, que o coeficiente de parentesco médio dos cultivares tanto de Louisiana quanto da Flórida aumentaram.

Garcia *et al.* (1999) calcularam o coeficiente de parentesco entre 137 variedades brasileiras cultivadas nos últimos 50 anos, obtendo uma média de 0,0586, com valores variando de 0,0 a 0,5039. A variedade que mostrou o maior parentesco médio com as demais variedades foi a NA56-79 ($f= 0,1551$), indicando que ela foi muito utilizada em programas de melhoramento genético em anos recentes.

Muitas vezes a cana-de-açúcar apresenta genealogia incompleta ou desconhecida. Além disso, as pressuposições assumidas para cálculo do f normalmente não são atendidas. Portanto, seria de muita utilidade algum método que pudesse determinar de forma mais correta o grau de parentesco entre variedades de cana-de-açúcar, independentemente do conhecimento de sua genealogia. Ao contrário do parentesco medido a partir da análise genealógica, a análise por marcadores moleculares fornece uma medida direta da diversidade.

2.4. Marcadores Moleculares

2.4.1. RFLP, RAPD e microssatélites

A caracterização e quantificação da diversidade genética tem sido, no momento, a principal meta a ser alcançada em biologia evolutiva e melhoramento de plantas. A análise direta do polimorfismo de fragmentos de DNA entre indivíduos, permitiu a comparação direta da variação das seqüências de nucleotídeos e, tem sido uma poderosa ferramenta em vários tipos de análises genéticas.

O primeiro marcador molecular a ser utilizado foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Botstein *et al.*, 1980). Desde então, este tipo de marcador tem sido usado para investigar a diversidade em plantas cultivadas e de seus parentais selvagens (Tanksley *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1992). A detecção do polimorfismo entre indivíduos é baseada na diferença do tamanho de fragmentos de restrição do DNA, a qual é observada em auto-radiografias após a hibridização de uma sonda específica com uma membrana contendo o DNA digerido por uma dada enzima.

O marcador RFLP apresenta diversas vantagens, incluindo o grande número de marcadores disponíveis, a reprodutibilidade e a herança codominante. Por outro lado, a técnica é muito trabalhosa, cara, requer o uso freqüente de radioisótopos, de grande quantidade de DNA relativamente puro, envolvendo assim muitas etapas. Dessa forma, a automatização da técnica é um processo difícil e ainda não realizado (Newbury e Ford Lloyd, 1993). Além disso, o RFLP abrange apenas regiões do genoma representadas por seqüências únicas ou com pequeno número de cópias.

O marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990) é também muito usado, não só no estudo genético de plantas para identificação de cultivares (Hu e Quiros, 1991), como também em estudos filogenéticos, genealógicos (Heum e Helentjaris, 1993) e mapeamento genético (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1991).

A técnica é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, utilizando a reação de polimerização em cadeia (PCR) e oligonucleotídeos com seqüências de bases arbitrárias como *primers* para amplificação do DNA genômico. Os produtos da PCR são produzidos em regiões do genoma flanqueadas por dois sítios que apresentam complementaridade aos *primers*. Para que ocorra a amplificação, estes dois sítios devem estar a uma distância máxima de 4.000 pares de bases, uma vez que este é o limite para amplificação de fragmentos pela PCR. Os produtos da amplificação são analisados por eletroforese em géis de agarose corados com brometo de etídio.

As vantagens do RAPD incluem sua simplicidade, rapidez e pequena quantidade de DNA genômico necessário (Rafalski *et al.*, 1991; Waugh *et al.*, 1992), superando muitas das limitações da técnica de RFLP. Apesar disso, o RAPD é muito sensível às condições experimentais e de difícil reprodução entre laboratórios.

Marcadores do tipo microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Jeffreys *et al.*, 1985), são mais eficientes em detectar o polimorfismo. Microssatélites consistem numa subclasse de DNA repetitivo formado por pequenas seqüências (2 a 5 nucleotídeos) repetidas em *tandem*, tais como (AT)_n, (ATT)_n, etc. Devido a sua natureza repetitiva, esses marcadores geram um modelo complexo de bandas. Microssatélites têm sido amplamente utilizados para estudo da diversidade presente no genoma de plantas (Thomas e Scott, 1993; Roder *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994),

resultando em grande sucesso. Um alto nível de polimorfismo vem sendo revelado através dos microssatélites em soja (Akkaya *et al.*, 1992; Morgante e Olivieri, 1993; Rongwen *et al.*, 1995), em alface (Witsenboer *et al.*, 1997) e em trigo (Li *et al.*, 2000). Recentemente foram encontrados microssatélites para cana-de-açúcar (Cordeiro *et al.*, 2000), sendo observado polimorfismo para mais de 100 microssatélites analisados, cujos *primers* foram designados e avaliados em cinco diferentes cultivares de cana-de-açúcar.

2.4.2. AFLP

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) apresenta-se como uma técnica, em que o polimorfismo é detectado após uma reação da PCR (Zabeau e Vos, 1993; Lin e Kuo, 1995). Ele oferece a oportunidade de realizar estudos genéticos detalhados em um grande número de organismos e espécies, surgindo como uma poderosa ferramenta para o DNA *fingerprinting* e mapeamento genético (Thomas *et al.*, 1995). O número de polimorfismo observado por reação é muito maior que aquele revelado por RFLP ou RAPD. Com uma pequena quantidade de DNA, o AFLP é capaz de detectar mais de 50 locos independentes em uma única reação de PCR. Desta maneira, diminui-se o tempo gasto e minimizam-se os custos (Lin *et al.*, 1996).

A metodologia é baseada na amplificação seletiva, pela PCR, de fragmentos de restrição do DNA genômico digerido. A técnica envolve três passos: (i) digestão do DNA e ligação de adaptadores específicos; (ii) amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos de restrição; (iii) análise em gel dos fragmentos amplificados. O processo inicia-se quando adaptadores específicos são ligados em cada extremidade do fragmento de DNA clivado por enzimas de restrição. Estes adaptadores possuem seqüências específicas

complementares a diferentes *primers*, os quais além de conterem a sequência específica complementar à sequência dos adaptadores, contêm ainda de 1 a 3 nucleotídeos adicionais na sua extremidade 3'. Com isso, os *primers* somente irão se hibridizar com aqueles fragmentos que possuem sequências complementar à sua sequência arbitrária adicional. Uma subpopulação de fragmentos suficientemente pequenos será amplificada, para que, após fracionamento no gel de poliacrilamida de alta resolução, possam aparecer como bandas distintas. De modo geral, o AFLP pode ser considerado como um RAPD bastante melhorado, onde até 100 bandas polimórficas (cerca de 10 vezes mais do que RAPD) podem ser amostradas num único gel apresentando grande resolução. A técnica AFLP é de fácil reprodução entre laboratórios devido ao fato do *primer* usado para reação de PCR não ser de natureza randômica, como no caso do RAPD, mas sim, específicos para o adaptador. Isto permite o uso de condições mais estritas para o anelamento do *primer*, aumentando assim a especificidade da reação (Vos *et al.*, 1995).

Diferentes espécies vegetais já foram investigadas com sucesso quanto à diversidade genética utilizando o marcador AFLP. Smith *et al.* (1993, 1994) foram os primeiros a utilizarem esta técnica para avaliar 58 linhagens de milho, seguindo-se Becker *et al.* (1995), Meksem *et al.* (1995) e Thomas *et al.* (1995). Posteriormente foram analisadas variedades de soja (Maughan *et al.*, 1996), populações de chá da Índia e do Quênia (Paul *et al.*, 1997), germoplasma de girassol (Hongtrakul *et al.*, 1997), variedades de coco do Sri Lanka (Perera *et al.*, 1998) e *Pinus sylvestris* (Lerceteau e Szmidt, 1999), além de diversas espécies de plantas silvestres.

2.5. Análise dos Dados Moleculares

2.5.1. Medida de similaridade genética

Uma correta compreensão dos dados moleculares gerados por marcadores moleculares faz-se necessário para sua aplicação efetiva em estudos de diversidade. A análise das relações genéticas entre os genótipos começa com a construção de uma matriz de dados especificando as relações de cada marcador com cada genótipo. Esta matriz pode ser binária, baseada na presença e ausência de fragmentos de DNA amplificados (RAPD e AFLP) ou na modificação do tamanho dos fragmentos gerados pela mudança nos sítios de restrição (RFLP) ou no número de seqüências repetidas em tandem (microsatélites). Com base nestas variações obtém-se uma matriz, podendo ser de similaridade genética, como também de distância genética.

Existem diferentes caminhos para o cálculo das medidas de similaridade genética (SG) entre todos os possíveis pares de cultivares, com base nos marcadores moleculares obtidos (Hendrick, 1974), podendo a mesma ser estimada a partir da equação proposta por Dice (1945) e primeiro sugerida para dados de RFLP por Nei e Li (1979):

$$SG_{I,J} = 2 N_{I,J} / (N_I + N_J) \quad (\text{Equação 1})$$

Outra medida bastante utilizada no cálculo de similaridade genética baseia-se na fórmula de Jaccard (1908):

$$SG_{I,J} = N_{I,J} / (N_{I,J} + N_I + N_J) \quad (\text{Equação 2})$$

Em ambas, $SG_{I,J}$ representa a medida da similaridade genética entre os genótipos I e J; $N_{I,J}$ é o número total de bandas polimórficas comuns a I e J, e N_I e N_J corresponde ao número de bandas no genótipo I e J, respectivamente. O valor de SG reflete a proporção de

polimorfismos revelados por um marcador que não pode ser distinguida entre os genótipos. Um valor de 1 para SG indica que dois genótipos têm padrões idênticos de polimorfismo revelado por um marcador AFLP, enquanto que $SG = 0$ indica que dois genótipos não tem nenhum polimorfismo em comum.

A única diferença em ambos os coeficientes é que o de Dice, diferentemente do de Jaccard, atribui peso 2 à presença de bandas para compensar a falta de $N_{I,J}$. Tal atribuição pode melhorar a estimativa do índice entre cultivares que apresentem baixos níveis de similaridade genética, permitindo melhor diferenciação entre eles.

2.5.2. Métodos de agrupamento e coeficiente cofenético.

A similaridade genética entre os diferentes genótipos, obtida a partir da matriz de similaridade, pode ser analisada de várias maneiras. Uma forma baseia-se através da análise das Coordenadas Principais (PCO), na qual um gráfico bi ou tri dimensional no espaço pode ser usado para representar as distâncias. Neste gráfico, a distância geométrica entre os genótipos reflete as distâncias genéticas entre eles com um mínimo de distorção. Da mesma forma, a similaridade genética entre os genótipos é revelada pelo agrupamento deles, representado no gráfico (Gower, 1966).

Outra forma baseia-se na construção e análise de um dendrograma obtido a partir do agrupamento dos genótipos, o qual faz uma ligação entre os genótipos mais similares geneticamente. Os grupos dos genótipos são ligados progressivamente, até que todas as amostras analisadas sejam incluídas em um simples agrupamento. A análise de agrupamentos pode ser feita utilizando diferentes algoritmos, como o Método das Médias das Distâncias (UPGMA), o Método do Vizinho mais Próximo e o Método de Ward.

**4.1 ANALYSIS OF GENETIC SIMILARITY DETECTED BY AFLP AND
COEFFICIENT OF PARENTAGE AMONG GENOTYPES OF SUGAR CANE
(*Saccharum* spp.)**

Artigo a ser enviado para: *Theoretical and Applied Genetics*

ANALYSIS OF GENETIC SIMILARITY DETECTED BY AFLP AND COEFFICIENT OF PARENTAGE AMONG CULTIVARS OF SUGAR CANE (*Saccharum* spp.)

Milena de L. A. Lima^{1,2}; Antônio Augusto F. Garcia³; Karine M. Oliveira^{1,2}; Sizuo Matsuoka⁴; Hideto Arizono⁴; Cláudio L. de Souza Jr.⁵ and Anete P. de Souza^{1,2*}.

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

²Dept. Genética e Evolução – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

³Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), CP. 9, CEP 13400, Piracicaba, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Biotecnologia Vegetal (DBV), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), CEP 13600970, Araras, SP, Brasil.

⁵Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), CP 83, CEP 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil.

Abstract

Despite the economical importance of sugar cane, until the present date no studies have been carried out to determine the correlation of the molecular-based genetic similarity (GS) and the coefficient of parentage (f) estimates generated for cultivars. A comprehensive knowledge of the amount of genetic diversity in cultivars, used as parents in crossings, could improve the effectiveness of the breeding programs. In this study, amplified fragment length polymorphism (AFLP) and pedigree data were used to investigate the genetic relationship in a group of 4 *Saccharum* spp. clones (*S. officinarum*, *S. sinense* and *S. barberi*) and 79 cultivars (interspecific hybrids) used as parents in one of the Brazilian breeding programs. The objectives of this study were to (a) assess the level of genetic similarity among the sugar cane cultivars and (b) investigate the correlation between the AFLP-based GS and the f , based on pedigree information. Twenty-one primer combinations were used to obtain the AFLP molecular markers, generating a total of 2,331 bands, of which 1,121 were polymorphic, with a polymorphism rate of 50% for primer combination on average. GS were determined using Jaccard's similarity coefficient, and a final dendrogram was constructed using an unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA). AFLP-based GS ranged from 0.28 to 0.89, with a mean of 0.47, whereas f ranged from 0 to 0.503, with a mean of 0.057. Cluster analysis using GS divided the genotypes into related subgroups suggesting that there is important genetic relatedness among the cultivars. AFLP-based GS and f were significantly correlated ($r = 0.42$, $P < 0.001$), thus the largeness of this r value suggesting that AFLP data may help quantify more accurately the degree of relatedness among sugar cane cultivars.

Key words *Saccharum* spp. - AFLP markers - Genetic similarity - Coefficient of parentage.

Introduction

Modern sugar cane cultivars are largely the results of intercrossings of the first interspecific crossings carried out at the beginning of the century, involving essentially *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*. The hybridizations used a process known as "nobilization", which corresponds to a series of backcrosses to *S. officinarum*, the noble cane (Bremer 1961a). This nobilization proved to be the main step in genetic improvement of sugar cane, solving problems of susceptibility to diseases, while increasing production and adaptability (Roach 1972). However, as few parental cultivars participated in the initial crossings, concerns about the limited genetic base of modern sugar cane cultivars abound (Arceneaux 1968; Tai and Miller 1978; Roach and Daniels 1987; Lu et al 1994a; Deren 1995).

A breeding program depends on the complete knowledge and understanding of the genetic diversity of the available germplasm. Several methods have been used to investigate the genetic variation of this crop. The traditional ones, which combine agronomic and morphologic characteristics, were used in the beginning. Many of the vegetative characteristics are influenced by environmental factors, presenting continuous variation and a high degree of plasticity, and which many times do not reflect the real diversity of the *Saccharum* spp. germplasm. Coefficient of parentage (*f*) (Kempthorne 1957) is an important method to estimate the genetic diversity based on pedigree. It

indirectly measures the genetic diversity among cultivars by estimating, from pedigree records, the probability that alleles, in a locus, are identical by descent; however, assumptions made when calculating f regarding relatedness of ancestors, selection pressure, and genetic drift are generally not met. Its use has been widespread among self-fertilization species such as soybean (Cox et al. 1985a; Vello et al 1988), wheat (Cox et al. 1985b) and barley (Martin et al. 1991). In outcrossing species, modifications in methodology are necessary to minimize bias in the calculation of f , as was observed in the case of maize (Melchinger et al. 1991) and sugar cane (Chang and Lo 1993, Deren 1995).

Isoenzymes (Glaszmann et al. 1989) and molecular marker analyses, such as RFLP using heterologous probes (D'Hont et al. 1994), ribosomal DNA (Glaszmann et al. 1990) and low-copy nuclear sequences (Burnquist et al. 1992; Lu et al. 1994 a, b; Jannoo et al. 1999), are important strategies to assess sugar cane genetic diversity. All these methods showed a strong molecular differentiation between *S. officinarum* and *S. spontaneum*, revealing that the main part of diversity among sugar cane cultivars is the *S. spontaneum* fraction of the genome. As sugar cane species have a complex genome, it is necessary a large number of DNA markers to reveal the exact genetic diversity. This was possible through the use of the AFLP molecular marker (Amplified Fragment Length Polymorphism), which reveals a high number of polymorphic bands in a multiplex pattern (Vos et al. 1995). AFLP markers were first used to estimate the genetic distances among 58 maize lines (Smith et al. 1993, Smith et al. 1994), that was followed by studies to investigate the genetic diversity in several plant species (Hill et al. 1996, Maughan et al. 1996, Paul et al. 1997, Perera et al. 1998, Angiolillo et al. 1999, Amsellem et al. 2000), including sugar cane (Besse et al. 1998).

Since the relationship between AFLP-based GS and f estimates has not been determined for sugar cane cultivars yet, the objective of this study was to evaluate and to compare AFLP and pedigree-based genetic similarity estimates generated for 79 cultivars most of them commercial use for some time and place in the past or at the present time in Brazil, but including some newly released ones and others from overseas that are important progenitors and 4 *Saccharum* spp. clones (*S. officinarum*, *S. sinense* and *S. barberi*).

Materials and methods

Plant Material and DNA extraction

Seventy-nine sugar cane cultivars and four clones of *Saccharum* spp. (*S. officinarum*, *S. sinense* and *S. barberi*), were supplied by the Sugar Cane Breeding Program developed at the Federal University of São Carlos, Araras, SP. The cultivar selection for use in this work was done based on its previous and also recent economic importance in the Brazilian sugar cane production areas or importance as progenitors. The identification and the geographical origin of the 83 sugar cane genotypes used are presented in Table 1.

Young leaves were collected from each genotype, freeze-dried and ground to powder using a mechanical mill. Genomic DNA was extracted following the CTAB-method described by Hoisington et al. (1994). DNA concentration was estimated in comparison with known concentrations of lambda DNA in 0.8% agarose gel.

AFLP analysis

AFLP analysis profiles were performed as described by Vos et al. (1995), using the "AFLP Analysis Kit " supplied by Life Technologies (Gibco BRL, Gathersburg, MD., USA). Four hundred nanograms of genomic DNA were double-digested using both *EcoRI* and *MseI* enzymes, after which the fragmented DNA was linked to the specific adaptor for the enzymes mentioned above. For preselective amplification, 5µl of a 10-fold diluted ligation mixture was amplified for 20 cycles at 94°C for 30s, 56°C for 60s, 72°C for 60s, with primers carrying one selective nucleotide. *EcoRI* primers carrying three selective nucleotides were end-labeled with γ -[³³P]-ATP (4000Ci/mmol) using T4 Polynucleotide Kinase, and mixed with unlabelled *MseI* primer carrying three selective unmarked nucleotides and a 50 fold diluted DNA as a template for hot selective amplification. The second amplification was carried out by programming a Touchdown Cycle Profile (Don et al. 1991) as follows: 94°C for 30s, 65°C (-0.7°C/Cycle) for 30s; and 72°C for 60s during 12 cycles, until reaching the optimal annealing temperature of 56°C. At this temperature, 24 more cycles were achieved to complete the second amplification. All the amplifications were carried out in a PTCTM-100 programmable thermal controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA).

Twenty µl of stop formamide (98% formamide, 10mM EDTA, 0.025% xylene cyanol w/v, 0.025% bromophenol blue w/v), were added to the amplified PCR product, of which 3.5 µl were separated by electrophoresis on 6% polyacrylamide denaturing gel (38 x 35 cm sequencing gel in a Sequi-Gen electrophoresis apparatus, BIO-RAD, Richmond, CA) for 4h at 75W. The gel was transferred to a paper filter (Whatman 3MM), covered

with a PVC film and vacuum dried (583 Gel Dyer Model, Hydrotech Vacuum Pump, BIO-RAD). After drying, the gels were exposed for 10-15 days on β max HyperfilmTMMP (Armstrong Life Science, UK).

Genetic similarity estimation

Only polymorphic bands were used in the construction of a binary matrix, reflecting the presence and absence of the fragments obtained by AFLP, in the different genotypes. The estimate of genetic similarity (GS) among all the genotypes was calculated according to the Jaccard similarity coefficient (1908): $GS_{ij} = a/(a+b+c)$, where GS_{ij} is the measurement of genetic similarity between individuals i and j , a is the number of polymorphic bands present in both individuals, b is the number of bands present in i and absent in j and c is the number of bands present in j and absent in i . This definitions of similarity excludes bands that are absent in both individuals from the calculation.

The matrix of similarity was analyzed by the unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA), as suggested by Sneath and Sokal (1973). The co-phenetic value (r_{cor}) based on GS was calculated, which is a quantitative indication of the grouping analysis performance. All analyses were performed using NTSYS-PC software, version 2.0j (Exeter Software, NY; Rohlf 1993).

Bootstrap analysis

Dboot software (A. Coelho, personal communication), based on the bootstrap method (Efron 1981), was used to verify if the number of polymorphic AFLP markers, used for genetic similarity estimation, was enough to supply precise estimates among the genotypes (Tivang et al. 1994). The polymorphic markers were submitted to 100 samplings one by one, with a growing replacement of markers. Genetic similarities for each sample of markers were estimated obtaining 100 estimates of genetic similarity for each pair of genotypes. The average, the variance and the coefficient of variation were estimated for each one of those combinations. This procedure was repeated, each time, with a continuous growing number of markers, until the total number of polymorphic markers was reached. The number of markers and the mean coefficient of variation were used in the construction of a dispersion plot.

Coefficient of parentage

The calculation of coefficient of parentage (f), between two genotypes, as defined by Kempthorne (1957), is carried out between two genotypes and corresponds to the probability that alleles in a locus are identical by descent to alleles in the same locus in another cultivar. The coefficient of parentage values were calculated using the procedure “proc inbreeding” of the software SAS (version 6.12). In general, the assumptions suggested by Cox et al. (1985a) were adopted, and f was considered 0 among the remote

ancestors. For each genotype we assumed that the inbreed coefficient was 0, due to the heterozygous character of the genotypes of this culture (Chang and Lo 1993, Deren 1995).

Correlation coefficient

To determine the correlation level among the AFLP-based genetic similarity (GS) and the coefficient of parentage (f), an analysis of correlation was carried out, using Pearson's coefficient (r).

Results

Primers selection and AFLP analysis

The 64 primers combinations of AFLP Kit were evaluated with regard to their capacity to generate polymorphic bands, using a group of 12 genotypes randomly chosen from the 83 used in this study. Among the 64 primer combinations, 40 were selected on the basis of the presence of readable bands and on the high number of polymorphic bands. Among the 40 primer combinations, 21 of the best combinations were used to produce the AFLP profiles in this work (Table 2). From these 21 combinations, it was possible to discriminate each one of the 83 sugar cane genotypes. An example of the obtained AFLP profiles is shown in Fig. 1.

Each selected primer combination generated a high number of bands. A total of 2,331 fragments were identified, of which 1,121 were polymorphic, and used to estimate the genetic similarity between the sugar cane genotypes. An average of 50% polymorphism was obtained for each AFLP primer combination. The selected primers and the number of polymorphic fragments, revealed in each combination, are shown in Table 2.

The primer selection associated to the primer labeling using γ ATP³³ and a long exposition period, were fundamental factors for obtaining good AFLP profiles in sugar cane. This procedure increased the number of polymorphic fragments revealed and reduced the time spent on its obtention. Two concentrations of DNA were evaluated for AFLP reactions: 200ng and 400ng. The results did not present any significant variation with regard to the intensity of the AFLP bands. Primer labeling tests with α ATP³² and γ ATP³³ were carried out. The amplifications of the samples, using selective *EcoRI* primer with γ ATP³³, provided profiles of the bands with a far superior definition. The visualization of the polymorphic fragments was carried out after a 10 to 15 day autoradiographic exposition.

Genetic similarity, coefficient of parentage and cluster analysis

The results obtained by Jaccard's coefficient are presented in Fig. 2. The genetic similarity estimate varied from 0.28 (between SP79-1011 and IJ76-314) to 0.89 (between CP51-22 and SP70-1078), with a mean of 0.47 in the 3,403 combinations obtained, using the data from the AFLP molecular marker. On the other side, the coefficient of parentage varied from 0 to 0.503 (between NA56-79 and Co419), with a mean of 0.057.

for GS estimations, an analysis of around 800 polymorphic bands would be necessary. Using all the 1,121 polymorphic bands revealed in this work, the CV value was 4.29%, which is a dependable value for an appropriate GS estimation.

Correlation between genetic similarity and coefficient of parentage

The correlation (r) between genetic similarity and coefficient of parentage was highly significant ($P < 0.001$), although with a moderate to low value ($r = 0.42$). The dispersion graph (Fig. 4) showed that the points have a tendency to group together around a straight line, however four points representing the pairs of cultivars IAC82-2045 and SP79-6192, CP51-22 and SP70-1078, SP70-1284 and SP70-1423, RB855113 and RB845257 remained distant.

Discussion

AFLP analysis

The AFLP profiles were not sensitive to the modifications carried out in the DNA concentrations, which is in agreement with the results of Vos et al. (1995). The primers which had not been selected were discarded, due either to the high number of monomorphic bands revealed or, as observed for some primer combinations, due to the complete lack of amplification products. The importance of a previous selection of primers was shown by Qi

Genetic similarity, coefficient of parentage and correlation

The four clones of *Saccharum* spp. and the 79 cultivars (interspecific hybrids) studied, presented moderate genetic similarity values. The two *S. officinarum* clones, Badila and IJ76-314 presented a GS value of 0.47 which is very close to the values obtained by Jannoo et al. (1999) between clones from New Guinea. The highest values of genetic similarity observed between the cultivars (interspecific hybrids) were: 0.86 between SP70-1284 and SP70-1423; 0.86 between IAC82-2045 and SP79-6192; 0.87 between RB855113 and RB845257 and 0.88 between CP51-22 and SP70-1078.

The resulting dendrogram of the genotype grouping, based on GS (Fig. 2), revealed a general complex structure between cultivars when examined comparatively in terms of pedigree information. This is in agreement with the cultivar ploidy and its high heterozygosity, which allows the maintenance, in the genotypes, of a great number of alleles from ancestors incorporated in the initial interspecific crossings.

It was observed that there was a tendency for the cultivars to group together with others obtained from the same cross. For example, various SP80 cultivars, all obtained from a single hybridization carried out in 1980, formed a subgroup as indicated in the dendrogram (Fig. 2). This same tendency can be observed for most cultivars identified as SP70, SP71 and RB85.

Significant correlation, with low to moderate value, was observed ($r=0.42$) between the measurements of GS and f (Fig. 4). This result was also observed in other studies of correlation between GS and f . Graner et al. (1994) compared RFLP-based GS with coefficient of parentage estimates generated for a set of 48 barley cultivars, finding low

correlation for the winter type ($r=0.21$) and moderate for the spring type ($r=0.42$). Evaluating the correlation between isozyme-based GS and f estimates for wheat cultivars Cox et al. (1985b) obtained a value of $r=0.27$, while Tinker et al. (1993) demonstrated a moderate correlation of $r=0.61$ in barley, observed between RAPD-based GS and f estimates. Similar results were found in maize (Plaschke et al. 1995) comparing estimates of GS based on microsatellite markers and f ($r=0.55$). These results indicate that genetic similarity, based on molecular markers, has shown low to medium correlation with the coefficient of parentage based on pedigree data.

The dispersion graph, obtained from the correlation between the GS and f estimates between all the genotypes, showed a tendency to group values around the regression line (Fig. 4). However, the genotypes, which present the highest GS values, were those which had been placed far from the regression line. Among these are SP70-1284 and SP70-1423 (GS=0.86 and $f=0.12$), for which it is suggested that the low correlation was due to a greater genetic contribution from the female parent (CB41-76). Both cultivars come from the same female parent, however the male parent is unknown (they are originated in a polycrossing).

The high AFLP-based GS (0.86) observed between cultivars IAC82-2045 and SP79-6192 was not expected, as the pedigree information shows very far relatedness ($f=0.01$). This result brings the hypothesis the presence of an anotation error concerning the true progenitor due to polycross (Deren 1995).

The cultivars RB855113 and RB845257 (GS=0.87 and $f=0.25$) are the result of reciprocal crossing between SP70-1143 and RB72454 and the molecular data confirms the

high genetic similarity between them. The low value observed for f , was probably the result of error caused by suppositions used to calculate it.

The GS of 0.88 observed between cultivars CP51-22 and SP70-1078 was not expected, by means of pedigree analysis ($f=0.44$). It is known that the female parent of SP70-1078 is IAC48-65 which resulted from a polycross. Therefore, a possible explanation for the high value of GS observed is that the male progenitor of IAC48-65 cultivar could be CP51-22 or another clone very close to it.

Different hypothesis can be proposed to explain the low correlation between GS estimates and coefficient of parentage. The low to moderate correlation is probably due to unequal parental contribution (Deren 1995); gene concentration in each generation of crossing; the male parent in the polycrosses being the same or a very close cultivar or mistaken anotation of the parent during the generation of one of the two estimates. In the case of the GS estimates, its consistency depends on the number and localization of the markers used in the genome. In this study 1,121 markers used were sufficient to produce GS data with a variation below to 5% of probability (Fig. 3). Following the bootstrap method used, it can be observed that with the increase in the number of molecular markers the GS variance was reduced. AFLP profile reading errors can also result in a reduction in the correlation of GS and f . We tried to avoid this type of error as much as possible in this study by eliminating the reading of any fragment that presented doubts with regards presence or absence. Therefore, when these kinds of bands appeared they were considered “lost data”, and this information was included in the standard error calculated by bootstrap.

Coefficient of parentage, although highly informative in a breeding programme, presents inherent errors in its calculation, resulting in f values with some bias. This is in

part due to some genetic suppositions which are assumed in the calculation of f . It is assumed that all the ancestors are not closely related, which is not always true when the history of sugar cane cultivars is considered (Bremer 1961a). The supposition that the genotype receives the same amount of genes from each parent is questionable in the present case. Sugar cane is polyploid and highly heterozygotic, apart from the well known fact that when using *S. officinarum* as a female parent, its meiosis is not equivative, resulting in one parent's alleles having an advantage over the others (Bremer, 1961b). Another point to be considered during the calculation of f is the little known changes in the frequency of the alleles, due to the effect of genetic drift and selection process. Both the phenomena can influence the precision of f . As for example, the transmission of alleles, specially those that control qualitative characteristics with high heritability is clearly influenced by the intensity of selection in a breeding programme. This facts results in a bias in the contribution of the parent, stressing the favorable alleles for the character in the resulting progeny (Cox et al. 1985a, Souza and Sorrells 1989).

GS estimates obtained from molecular markers will provide more information than those available through pedigree information. The results here obtained are in agreement with those presented by Barret and Kidwell (1998), using wheat cultivars, where the values of the genetic diversity obtained from AFLP markers showed to be more useful than the coefficient of parentage, to identify cultivar combinations for crossings with maximum allele variation. Thus, it can be concluded that estimates of GS based on molecular markers may provide more accurate information to plant breeders, than the pedigree method, allowing breeders to more efficiently make dependable crossing for short term basis or to strategically plan the breeding programme in a long term basis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Maria Carolina Avanci (FAPESP grant TT-2 n° 98/15205-5) for technical support during the development of this research; Prof. Alexandre S. G. Coelho, Universidade Federal de Goiás/Goiana – GO, for supplying Dboot program and helping during bootstrap analysis; Fundação de Apoio Institucional da Universidade Federal de São Carlos/SP (FAI-UFSCar) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 98/01689-0) for financial support during the development of this research. Both M.L.A.L. and K.M.O. received TT3/MSI (98/10427-0 – 99/01347-5) and IC (98/11983-3) fellowships respectively from FAPESP. A.P.S., C.L.S.Jr. and S.M. are recipient of research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Amsellem L, Noyer JL, Le Bourgeois T, Hossaert-McKey M (2000) Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (*Rosaceae*) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Mol Ecol* 9: (4) 443-455
- Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 98: 411-421

- Arceneaux, G (1968) Cultivated sugar canes of the world and their botanical derivation. Proc Int Soc Sugar Cane Technol 12: 844-854
- Aumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9: 208-218
- Barret BA, Kidwell KK (1998) Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop Sci 38: 1271-1278
- Besse P, Taylor G, Carroll B, Berding N, Burner D, McIntyre CL (1998) Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. Genetica 104: 143-153
- Bremer G (1961a) Problems in breeding and cytology of sugar cane. Euphytica 10: 59-78
- Bremer G (1961b) Cytological crossing research of sugar cane. Euphytica 10: 229-243
- Burnquist WL, Sorrells ME, Tanksley S (1992) Characterization of genetic variability in *Saccharum* germplasm by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. XXI Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol 2:355-365
- Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, Van Wijk R, Motto M (1999) AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. Theor Appl Genet 99: 425-431
- Chang YS, Lo CC (1993) Genetic relationship among major sugar cane cultivars in Taiwan. Rept Taiwan Sugar Res Inst 140: 1-10

- Cox TS, Kiang YT, Gorman MB, Rogers DM (1985a) Relationships between coefficient of parentage and genetic similarity indices in the soybean. *Crop Sci* 25: 529-532
- Cox TS, Lookhart GL, Walker DE, Harrell LG, Albers LD, Rogers DM (1985b) Genetic relationships among hard red winter wheat cultivars as evaluated by pedigree analysis and gliadin polyacrylamide gel-electrophoretic patterns. *Crop Sci* 25: 1058-1063
- D'Hont A, Lu YH, Gonzales de Leon D, Feldmann P, Lanaud C, Glaszmann JC (1994) A molecular approach to unraveling the genetics of sugar cane, a complex polyploid of the *Andropogoneae* tribe. *Genome* 37: 222-230
- Deren CW (1995) Genetic base of U.S. mainland sugar cane. *Crop Sci* 35: 1195-1199
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Mattick JS (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008
- Efron B (1981) The bootstrap, the jackknife, and other resampling plans. *Soc Ind Appl Math*, Philadelphia
- Glaszmann JC, Fautret A, Noyer JL, Feldmann P, Lanaud C (1989) Biochemical genetic markers in sugar cane. *Theor Appl Genet* 78: 537-543
- Glaszmann JC, Lu YH, Lanaud C (1990) Variation of nuclear ribosomal DNA in sugar cane. *J Genet Breed* 44: 191-198
- Graner A, Ludwig WF, Melchinger AE (1994) Relationships among European barley germplasm: II. Comparisons of RFLP and pedigree data. *Crop Sci* 34: 1199-1205
- Hill M, Witsenboer H, Zabeau M, Vos P, Kesseli R, Michelmore R (1996) PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor Appl Genet* 93: 1202-1210

- Hoisington D, Khairallah M, González-de-León D (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT, Mexico, DF
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44: 223-270
- Jannoo N, Grivet L, Seguin M, Paulet F, Domaingue R, Rao PS, Dookun A, D'Hont A, Glaszmann JC (1999) Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. Theor Appl Genet 99: 171-184
- Kempthorne O (1957) An introduction to genetic statistics. John Wiley and Sons, Inc. New York
- Lu YH, D'Hont A, Paulet F, Grivet L, Arnaud M, Glaszmann JC (1994a) Molecular diversity and genome structure in modern sugar cane varieties. Euphytica 78: 217-226
- Lu YH, D'Hont A, Walker DIT, Rao PS, Feldmann P, Glaszmann JC (1994b) Relationships among ancestral species of sugar cane revealed with RFLP using single-copy maize nuclear probes. Euphytica 78: 7-18
- Martin JM, Blake TK, Hockett EA (1991) Diversity among North American spring barley cultivars based on coefficient of parentage. Crop Sci 31: 1137-1149
- Maughan PJ, Saghai Maroof MA, Buss GR, Huestis GM (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor Appl Genet 93: 392-401
- Melchinger AE, Messmer MM, Lee M, Woodman WL, Lamkey KR (1991) Diversity and relationships among US maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. Crop Sci 31: 669-678

- Paul S, Wachira FN, Powell W, Waugh R (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of India and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor Appl Genet* 94: 255-263
- Perera L, Russel JR, Provan J, McNicol J, Powell W (1998) Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. *Theor Appl Genet* 96: 545-550
- Plaschke J, Ganai MW, Roder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91: 1001-1007
- Qi X, Lindhout P (1997) Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 254: 330-336
- Roach BT (1972) Nobilisation of sugar cane. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 14: 206-216
- Roach BT, Daniels J (1987) A review of the origin and improvement of sugar cane. Copersucar Int Sugar Cane Breed Workshop. São Paulo: Copersucar, 1-31p
- Rohlf FJ (1993) NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0j. Exeter Publ, Setauket, NY
- Smith JSC, Zabeau M, Wright S (1993) Associations among inbred lines as revealed by RFLPs and by a thermocycling amplification methodology, amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Maize Genet Newsl* 67: 62-64
- Smith S, Luk S, Sobral B, Muhawish S, Peleman J, Zabeau M (1994) Associations among inbred lines of maize using RFLP and DNA amplification technologies (AFLP and AP-PCR), and correlations with pedigree, F1 yield and heterosis. *Maize Genet Newsl* 68: 45
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco

- Souza E, Sorrells ME (1989) Pedigree analysis of north american oat cultivars released from 1951 to 1985. *Crop Sci* 29: 595-601
- Tai P, Miller JD (1978) The pedigree of selected Canal Point (CP) varieties of sugar cane. *Proc Am Soc Sugar Cane Technol* 8: 34-39
- Tinker NA, Fortin MG, Mather DE (1993) Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor Appl Genet* 85: 976-984
- Tivang JG, Nienhuis J, Smith OS (1994) Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. *Theor Appl Genet* 89: 259-264
- Vello N A, Hiromoto D M, Azevedo-Filho A J B V (1988) Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. *Rev Bras Genet*, 11: 679-697
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van Der Lee T, Hornes M (1995) AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414

Table 1. Identification of the 83 sugar cane genotypes used in the pedigree and AFLP-based genetic similarity assessments.

Clone	Origin	Clone	Origin
Badila	New Guinea (<i>S. officinarum</i>)	RB765418	Republic of Brazil
CB36-24	Campos, Brazil	RB785148	Republic of Brazil
CB40-13	Campos, Brazil	RB806043	Republic of Brazil
CB40-77	Campos, Brazil	RB825336	Republic of Brazil
CB41-75	Campos, Brazil	RB83102	Republic of Brazil
CB45-155	Campos, Brazil	RB835019	Republic of Brazil
CB45-3	Campos, Brazil	RB835089	Republic of Brazil
CB46-47	Campos, Brazil	RB835486	Republic of Brazil
CB47-355	Campos, Brazil	RB845257	Republic of Brazil
CB49-260	Campos, Brazil	RB855035	Republic of Brazil
CB53-98	Campos, Brazil	RB855113	Republic of Brazil
Co290	Coimbatore, India	RB855156	Republic of Brazil
Co331	Coimbatore, India	RB855453	Republic of Brazil
Co419	Coimbatore, India	RB855536	Republic of Brazil
Co740	Coimbatore, India	RB855563	Republic of Brazil
Co997	Coimbatore, India	SP70-1005	São Paulo, Brazil
CP51-22	Canal Point, USA	SP70-1078	São Paulo, Brazil
CP53-76	Canal Point, USA	SP70-1143	São Paulo, Brazil
Ganda Cheni	Saretha, India (<i>S. barberi</i>)	SP70-1284	São Paulo, Brazil
IAC48-65	Campinas, Brazil	SP70-1423	São Paulo, Brazil
IAC50-134	Campinas, Brazil	SP70-3370	São Paulo, Brazil
IAC51-205	Campinas, Brazil	SP71-1406	São Paulo, Brazil
IAC52-150	Campinas, Brazil	SP71-6163	São Paulo, Brazil
IAC58-480	Campinas, Brazil	SP71-6180	São Paulo, Brazil
IAC64-257	Campinas, Brazil	SP71-6949	São Paulo, Brazil
IAC82-2045	Campinas, Brazil	SP71-799	São Paulo, Brazil
IAC82-3092	Campinas, Brazil	SP72-4928	São Paulo, Brazil
IAC83-4157	Campinas, Brazil	SP79-1011	São Paulo, Brazil
IAC86-2210	Campinas, Brazil	SP79-2233	São Paulo, Brazil
IAC87-3396	Campinas, Brazil	SP79-2312	São Paulo, Brazil
IJ76-314	Iryan, Java (<i>S. officinarum</i>)	SP79-2313	São Paulo, Brazil
L60-14	Louisiana, USA	SP79-6134	São Paulo, Brazil
Maneria	Pansahi, China (<i>S. sinense</i>)	SP79-6192	São Paulo, Brazil
NA56-79	Northern Argentina	SP80-1520	São Paulo, Brazil
POJ2878	Java, Indonesian	SP80-1816	São Paulo, Brazil
RB721012	Republic of Brazil	SP80-1836	São Paulo, Brazil
RB72454	Republic of Brazil	SP80-1842	São Paulo, Brazil
RB725828	Republic of Brazil	SP80-3280	São Paulo, Brazil
RB732577	Republic of Brazil	SP81-1763	São Paulo, Brazil
RB735275	Republic of Brazil	SP81-3250	São Paulo, Brazil
RB739359	Republic of Brazil	SP83-5073	São Paulo, Brazil
RB739735	Republic of Brazil		

Table 2. Number of polymorphic AFLP bands observed using twenty one AFLP primer combinations.

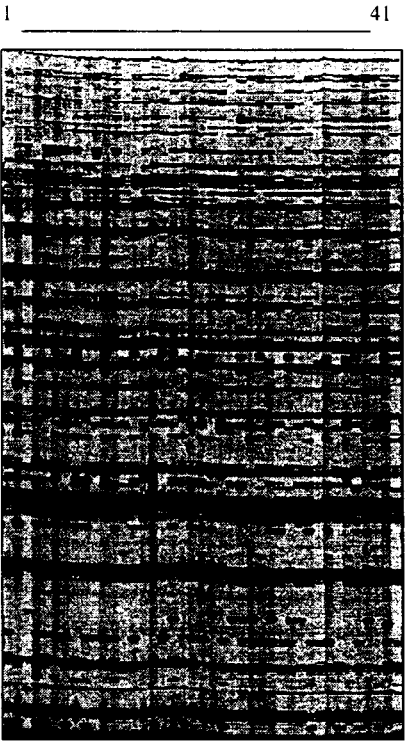
Primer combination	Total number of bands	Polymorphic bands	Polymorphism rate (%)
E + AAC/M + CAC	98	48	49
E + AAC/M + CAG	77	52	68
E + AAC/M + CTA	80	58	73
E + AAC/M + CTT	76	18	24
E + ACA/M + CTA	78	50	64
E + ACC/M + CAA	131	66	50
E + ACC/M + CAC	147	87	59
E + ACC/M + CAG	138	75	54
E + ACC/M + CTA	99	32	32
E + ACG/M + CAT	62	27	44
E + ACG/M + CTG	102	43	42
E + ACT/M + CAG	159	57	36
E + ACT/M + CAT	224	74	33
E + ACT/M + CTA	112	71	63
E + ACT/M + CTG	90	41	46
E + ACT/M + CTT	40	22	55
E + AGC/M + CAG	153	63	41
E + AGC/M + CAT	170	95	56
E + AGC/M + CTC	61	38	62
E + AGC/M + CTG	172	71	41
E + AGC/M + CTT	62	33	53
Total	2,331	Total 1,121	mean 50

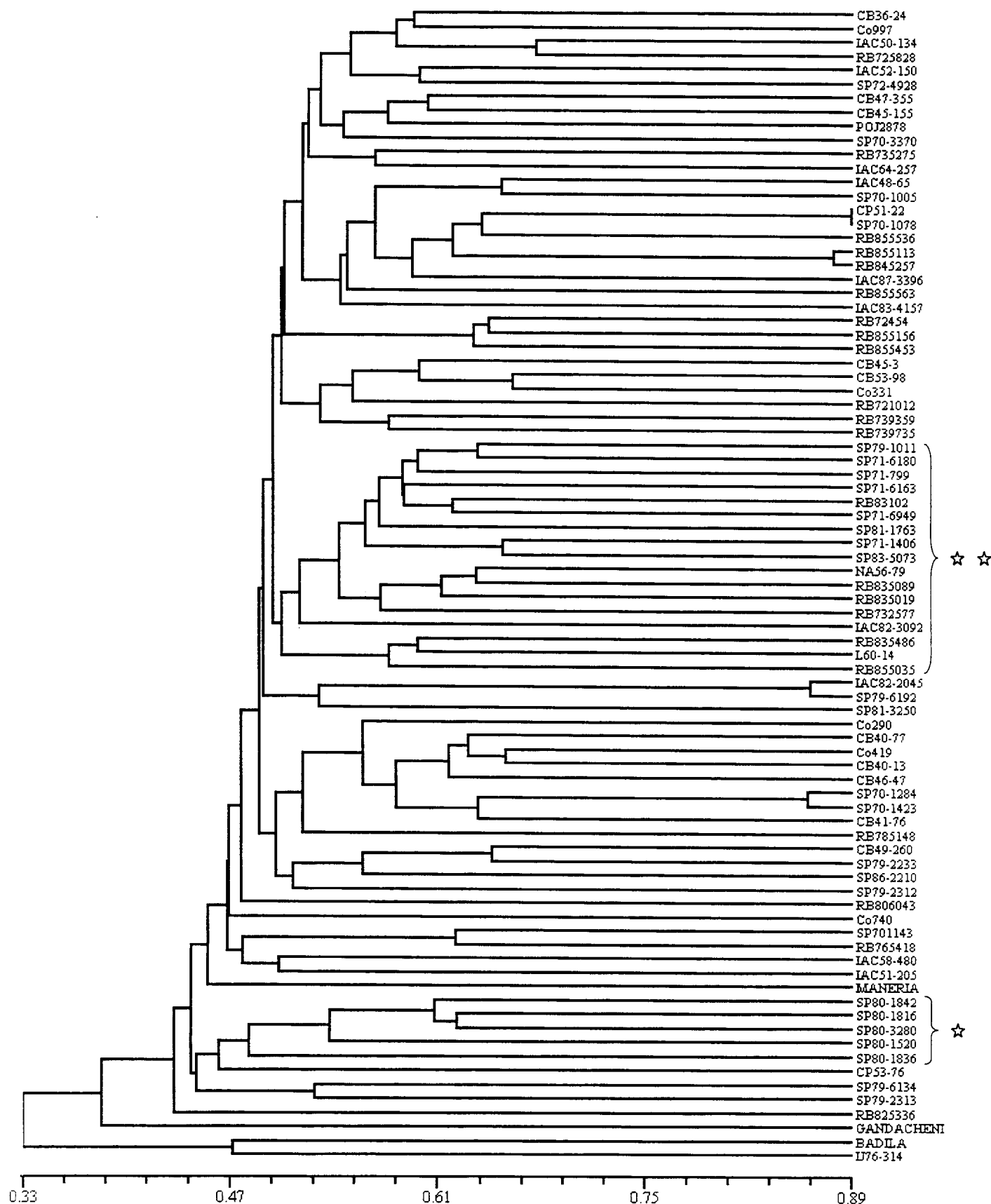
Figure 1. AFLP profiles of 41 sugar cane cultivars generated by E+ACT/M+CTA primer combination.

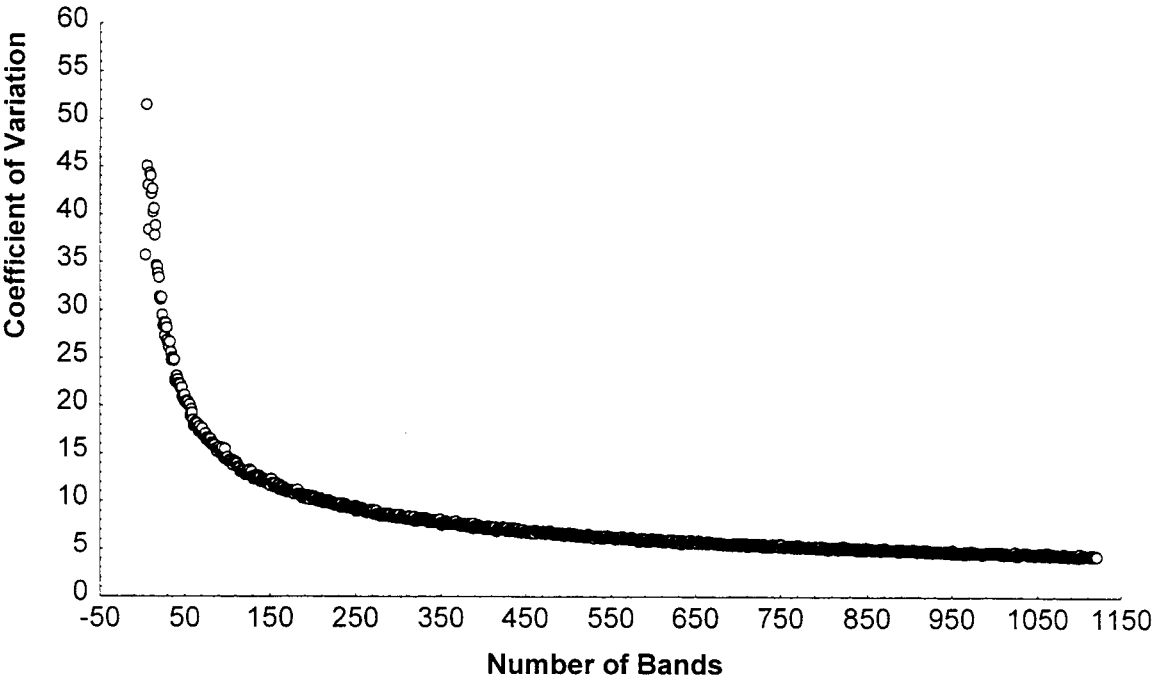
Figure 2. Dendrogram of the 83 sugar cane revealed by UPGMA cluster analysis of AFLP-based genetic similarity (Jaccard's coefficient) estimates ($r_{cof}=0.84$), using 1,121 AFLP polymorphic bands obtained by 21 primer combinations. Two stars indicates the group containing the NA56-79 cultivar and its offsprings; one star indicate the grouping of SP80 cultivars.

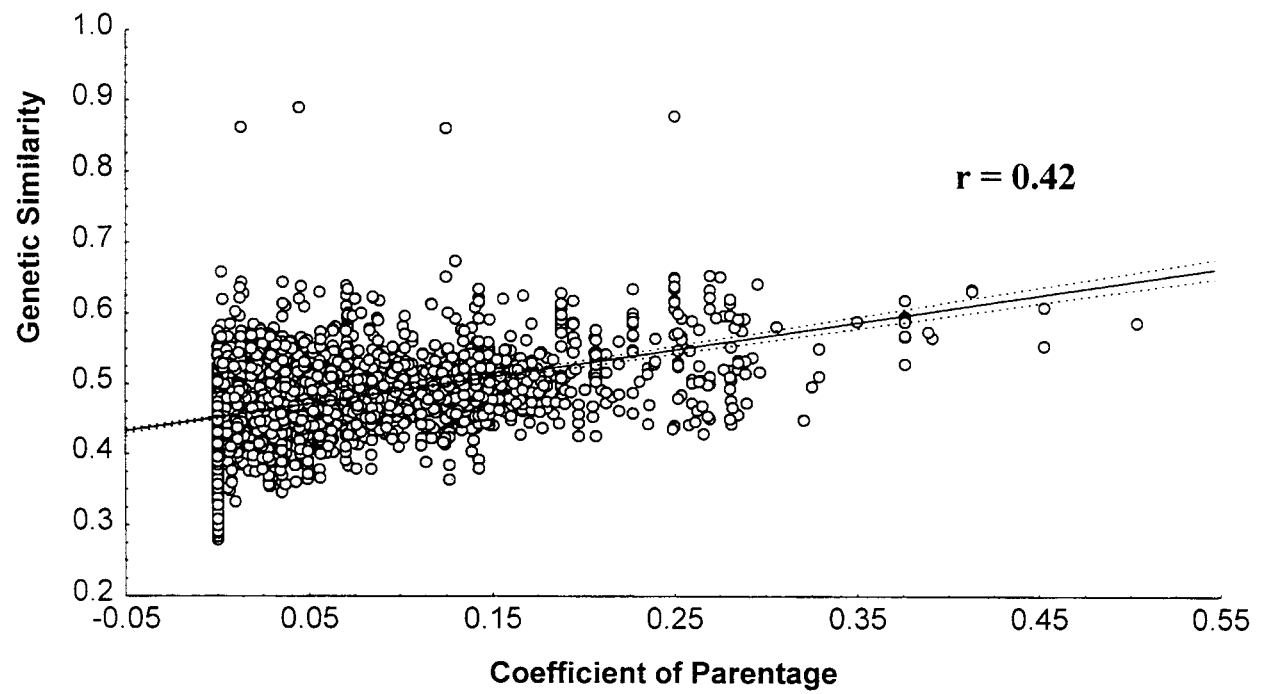
Figure 3. Plot of the coefficient of variation of the complement of Jaccard's coefficient among all accessions estimated by bootstrap analysis for subsamples with different numbers of AFLP bands.

Figure 4. Plot of AFLP-based genetic similarity (Jaccard's coefficient) and coefficient of parentage for 3,403 pairs of the sugar cane cultivars (Pearson's correlation $r=0.42$).

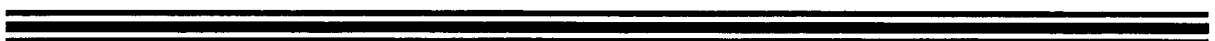








5. CONCLUSÕES



5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados pode-se concluir que:

- o marcador molecular AFLP foi bastante eficiente para analisar as relações genéticas entre genótipos de cana-de-açúcar, devido ao grande número, rapidez e confiabilidade do polimorfismo observado;
- obteve-se correlação altamente significativa ($P < 0,001$) entre os dados de similaridade genética a partir de AFLP e o coeficiente de parentesco (f), porém de valor moderado ($r = 0,42$);
- os valores das matrizes de similaridade dos marcadores AFLP e do f não foram exatamente concordantes. A estimativa da similaridade genética baseada em AFLP forneceu uma informação aparentemente mais precisa que aquela obtida através da genealogia;
- os resultados de similaridade genética obtidos indicaram que as variedades de cana-de-açúcar analisadas neste trabalho apresentam uma base genética aparentemente estreita;
- o marcador molecular do tipo AFLP é uma importante ferramenta para o conhecimento preciso da diversidade genética entre genótipos, permitindo aos melhoristas a realização de uma escolha racional dos parentais a serem utilizados em hibridações, nos programas de melhoramento genético, visando a expansão da base genética da cana-de-açúcar e obtenção de cultivares.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS



6. PERSPECTIVAS FUTUTRAS

A caracterização da similaridade genética utilizando marcadores moleculares permite aos melhoristas obter o conhecimento direto da diversidade genética, possibilitando uma melhor escolha dos parentais a serem utilizados em futuros cruzamentos. A escolha dos parentais mais divergentes pode maximizar a heterose e fornecer cultivares superiores aos utilizados atualmente, bem como auxiliar na ampliação da base genética desta espécie, contribuindo para o sucesso dos programas de melhoramento genético futuros. Assim, o uso dos marcadores moleculares constitui uma importante ferramenta para o planejamento eficaz de qualquer Programa de Melhoramento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Dunn, G. e Everett, B. C. (1992) An introduction to mathematical taxonomy. Cambridge, England. 152p.
- Eksomtramage, T.; Paulet, F.; Noyer, J. L.; Feldmann, P.; Glaszmann, J. C. (1992) Utility of isoenzymes in sugarcane breeding. *Sugar Cane*. **3**: 14-21.
- Falconer, D. S. (1989) *Introduction to quantitative genetics*. 3 ed. England: Longman Scientific e Technical. 437p.
- Garcia, A. F. G.; Matsuoka, S.; Souza Jr., C. L.; Souza, A. P.; Lima, M. L. A. (1999) Diversidade e base genética das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* L. spp.) brasileiras. In: *Anais do 45º Congresso Brasileiro de Genética*, Gramado, **22**: p.686.
- Glaszmann, J. C.; Noyer, J. L.; Fautret, A.; Feldmann, P.; Lanaud, C. (1989) Biochemical genetic markers in sugarcane. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 537-543.
- Gower, J. C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, **53**: 325-338.
- Grassl, C. O. (1964) Problems relating to the origin and evolution of wild and cultivated *Saccharum*. *Ind. J. Sugar Cane Res. Dev.* **8**: 106-116.
- Hallauer, A. R. e Miranda Filho, J. B. (1988) Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State Univ. Press, Ames. 468 p.
- Hendrick, P. W. (1974) Genetic similarity and distance: comments and comparisons. *Evolution*, **29**: 362-366.
- Heum, M. e Helentjaris, T. (1993) Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.*, **85**: 961-968.
- Hogarth, D. M.; Wu, K. K.; Heinz, D. J. (1981) Estimating variance in sugarcane using a factorial cross design. *Crop Sci.*, **21**: 21-25.

- Hongtrakul, V.; Huestis, G. M.; Knapp, S. J. (1997) Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, **95**: 400-407.
- Hu, J. e Quiros, C. F. (1991) Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.*, **10**: 505-511.
- Irvine, J. E. (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. *Theor. Appl. Genet.*, **98**: 186-194.
- Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, **44**: 223-270.
- Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. L. (1985) Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, **314**: 67-73.
- Jeswiet, J. (1925) Bijdrage tot de systematiek van het geslacht *Saccharum*. Mededeelingen Proef-station Java-suikerindustrie. 12: 391-404.
- Junqueira, A. A. e Dantas, B. (1964) A cana-de-açúcar no Brasil. In: Malavolta, E. *et al.* (eds.) *Cultura e adubação da cana-de-açúcar*. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, p. 27-60.
- Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K. V.; Ayad, W. G.; Hodgkint, T. (1997) Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *Technol. Boll. IPGRT*. pp5-47.
- Kempthorne, O. (1969) An introduction to genetic statistics. Iowa State Univ. Press. Ames. 545 p.
- Kuwada, Y. (1915) Uber die chromosomenzahl von *Zea mays*. L. *Bot. Mag.* **29**: 87.

- Lerceteau, E. e Szmidt, E. (1999) Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity*, **82**: 252 - 260.
- Li, Y. C.; Roder, M. S.; Fahima, T.; Kirzhner, V. M.; Beiles, A.; Korol, A. B.; Nevo, E. (2000) Natural selection causing microsatellite divergence in wild emmer wheat at the ecologically variable microsite at Ammiad, Israel. *Theor. Appl. Genet.*, **100**: 985-999.
- Lin, J. J. e Kuo, J. (1995) AFLP: a novell PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus*. **17**: 66-71.
- Lin, J. J.; Kuo, J.; Ma, J. (1996) A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3649-3650.
- Lu, Y. H.; D'Hont, A.; Walker, D. I. T.; Rao, P. S. (1994) Relationships among ancestral species of sugarcane revelead with RFLP using single-copy maize nuclear probes. *Euphytica*, **78**: 7-18.
- Machado Jr., G. R. (1987) Melhoramento da cana-de-açúcar. In: *Cana-de-açúcar cultivo e utilização*. Campinas, Fundação Cargil, cap.2, p.165-84.
- Malécot, G. (1969). The mathematics of heredity (trans. By Yermanos, D. M.) Freeman, San Francisco, C.A. 88p.
- Matsuoka, S. (1991) The contribution of man-made varieties to the sugar cane industry in São Paulo. *Ciência e Cultura*. **43**: 282-289.
- Matsuoka, S.; Arizono, H., Bassinelo, A. I.; Gheller, A. C. A.; Hoffmann, H. P.; Masuda, Y. (1995) Variedades superprecoces da cana-de-açúcar. *Álcool e Açúcar*, **78**: 22-30.
- Matsuoka, S.; Masuda, Y.; Arizono, H. (1990) Breeding procedures for resistance to sugar cane mosaic virus in Brazil. *Sugar Cane*, **3**: 12-16.

- Matsuoka, S.; Arizono, H.; Bassinello, A. I.; Garcia, A. F.; Gheller, A. C. A.; Giglioti, E. A.; Hoffmann, H. P.; Masuda, Y. (1998) Seis novas variedades RB de cana-de-açúcar. CCA/UFSCar, 24p.
- Matsuoka, S. (1999) Programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar. *STAB*, **17**: 36-37.
- Matsuoka, S.; Garcia, A. F.; Arizono, H. (1999) Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém, A. ed. *Melhoramento de espécies cultivadas*. 2.ed. Viçosa, UFV, p. 205-251.
- Maughan, P. J.; Saghai Maroof, M. A.; Buss, G. R.; Huestis, G. M. (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **93**: 392-401.
- Meksem, K.; Leister, D.; Peleman, J.; Zabeau, M.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1995) A high resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.*, **249**: 74-81.
- Miocque, J. Y. J. e Machado Jr., G. R. (1977) Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil. *Sugar Cane J.*, p.9-13.
- Morgante, M. e Olivieri, A. M. (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, **3**: 175-182.
- Mukherjee, S. K. (1950) Search for wild relatives of sugarcane in India. *Indian Sugar Cane J.*, **52**: 261-262.
- Mukherjee, S. K. (1957) Origin and distribution of *Saccharum*. *Bot. Gaz.*, **119**: 55-61.
- Naidu, N. M. e Sreenivasan, T. V. (1987) Conservation of sugarcane germplasm. In: *Copersucar International Sugar Cane Breed. Work*. Copersucar Technology Center, São Paulo, p. 33-53.

- Nei, M. e Li, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **796**: 5269-5273.
- Newbury, H. J. e Ford-Lloyd, B. V. (1993) The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant. Growth Reg.*, **12**: 43-51.
- Núcleo de Melhoramento/CCA-UFSCar (1992) Cinco novas variedades novas de RB de cana-de-açúcar para São Paulo. In: *Álcool e Açúcar*, Araras, **64**: 8-15.
- Panje, R. R. e Babu, C. N. (1960) Studies in *Saccharum spontaneum*. Distribution and geographical association of chromosome numbers. *Cytologia*. **25**: 152-172.
- Paul, S.; Wachira, F. N.; Powell, W.; Waugh, R. (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, **94**: 255-263.
- Peixoto, T. C. (1986) Estudo complementar ao melhoramento genético de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Piracicaba, SP, 119p. (Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).
- Perera, L.; Russel, J. R.; Provan, J.; McNicol, J. W.; Powell, W (1998). Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 545 - 550,.
- 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).
- Pommer, C. V. e Bastos, C. R. (1984) Genealogia de variedades IAC de cana-de-açúcar. Vulnerabilidade genética e necessidade de programas básicos de melhoramento. *Pesq. Agropec. Bras.*, **19**: 623-629.

- Prince, S. (1961) Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VII. Maternal chromosome, transmission by *S. officinarum* in intra and interspecific crosses. *Bot. Gazet.*, **122**: 298-305.
- Prince, S. (1965) Cytology of *Saccharum robustum* and related sympatric species and natural hybrids. *U. S. D. A. Techn. Bull.*, **1337**: 48.
- Prince, S. (1967) Interspecific hybridisation in sugarcane breeding. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, **12**: 1021-1026.
- Rafalski, J. A.; Tingey, S. V.; Williams, J. G. K. (1991) RAPD markers – a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech. News. Inform.*, **3**: 645-648.
- Roach, B. T. (1972) Chromosome numbers in *Saccharum edule*. *Cytologia*, **37**: 155-61.
- Roach, B. T. (1989) Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. *Proc. Austr. Soc. Sugar Cane Technol.*, p.34-47.
- Roder, M. S.; Plaschke, J.; Konig, S. U.; Borner, A.; Sorrells, M. A.; Tanksley, S. D.; Ganai, M. W. (1995) Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.*, **246**: 327-333.
- Rodgers, D. M.; Murphy, J. P.; Frey, K. J. (1983) Impact of plant breeding on the grain yield and genetic diversity of spring oats. *Crop Sci.*, **23**: 737-740.
- Rohlf, F. J. (1993) NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0j. Exeter Publ., Setauket, NY.
- Rongwen, J.; Akkaya, M. S.; Bhagwat, A. A.; Lavi, U.; Cregan, P. B. (1995) The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.*, **90**: 43-48.

- Smith, J. S.; Zabeau, M.; Wright, S. (1993) Associations among inbred lines as revealed by RFLPs and by a thermocycling amplification methodology, Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs). *Maize Genet.*, **67**: 62-64.
- Smith, J. S.; Luk, S.; Sobral, B.; Muhawish, S.; Peleman, J.; Zabeau, M. (1994) Associations among inbred lines of maize using RFLP and DNA amplification technologies (AFLP and AP-PCR), and correlations with pedigree, F1 yield and heterosis. *Maize Genet.*, **68**: 48.
- Sreenivasan, T. V.; Ahloowalia, B. S.; Heinz, D. J. (1987) Cytogenetics. Heinz, D. J. ed. In: *Sugarcane Improvement Through Breeding*. Amsterdam, Elsevier, p. 211-253.
- Sreenivasan, T. V. e Jagathesan, D. (1975) Meiotic abnormalities *Saccharum spontaneum* L. *Euphytica*, **24**: 543-9.
- Stevenson, G. C. (1965) *Genetics and breeding of sugar cane*. London, Longmans, 284p.
- Tai, P. Y. P.; Miller, J. D. (1978) The pedigree of selected Canal Point (CP) varieties of sugarcane. *J. Am. Soc. Sugar Cane Technol.*, **8**: 34-39.
- Tanksley, S. D.; Young, N. D.; Paterson, A. H.; Bonierbale, M. W. (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *BioTechnology*, **7**: 257-264.
- Thomas, M. R.; Scott, N. S. (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, **86**: 985-990.
- Thomas, C. M.; Vos, P.; Zabeau, M.; Jones, D. A.; Norcott, K. A.; Charwick, B. P.; Jones, J. D. G. (1995) Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium*. *Plant J.*, **8**: 785-794.

- Vello, N. A.; Hiromoto, D. M.; Azevedo-Filho, A. J. B. V. (1988) Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. *Rev. Bras. Genet.*, **11**: 679-697.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Lee, T.; Hornees, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. (1995) AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **21**: 4407-4414.
- Waldron, J. C. e Glasziou, K. T. (1972) Isoenzymes as a method of varietal identification in sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, **14**: 249-256.
- Wang, Z. Y.; Second, G.; Tanksley, S. D. (1992) Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, **83**: 565-581.
- Wang, Z.; Weber, J. L.; Zhong, G.; Tanksley, S. D. (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.*, **88**: 1-6.
- Waugh, R.; Baird, E.; Powell, W. (1992) The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. *Plant Cell Rep.*, **11**: 466-469.
- Welsh, J.; Honeycutt, R. J.; McClelland, M.; Sobral, B. W. S. (1991) Parentage determination in maize hybrids using the arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.*, **82**: 473-476.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6531-6535.
- Witsenboer, H.; Vogel, J.; Michelmore, R. W. (1997) Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome*, **40**: 923-936.

Zabeau, M. e Vos, P. (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application. number: 9240229.7. Publication number 0534858 A 1.